

**DESARROLLO DE UN
NANOMATERIAL
DESINFECTANTE POR MÉTODOS
BIGÉNICOS EXTRACELULARES A
PARTIR DE HONGOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**MAESTRIA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA EN INGENIERÍA
AMBIENTAL**

PRESENTA

Natyeli Alejandra Ortiz Tirado

DIRECTOR: OSCAR MANUEL RODRÍGUEZ NARVÁEZ

CODIRECTOR: JESÚS SALVADOR JAIME FERRER

ASESOR: DOMANCAR ORONA TAMAYO

LEÓN GUANAJUATO,
SEPTIEMBRE 12, 2024



**GOBIERNO DE
MÉXICO**



CONAHCYT
COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS



CIATEC

León, Gto., a 12 de septiembre de 2024.

Coordinación de Posgrado,
PICYT - CIATEC,
Guanajuato.

Los abajo firmantes miembros del Comité Tutorial de la alumna *Natyell Alejandra Ortiz Tirado*, una vez leída y revisada la Tesis titulada "*Desarrollo de un nanomaterial desinfectante por métodos biogénicos extracelulares a partir de hongos*", aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la alumna para aspirar al grado de Maestra en Ciencia y Tecnología en la Especialidad de Ingeniería Ambiental durante el Examen de Grado correspondiente.

Y para que así conste se firma la presente a los 12 días del mes de septiembre del año dos mil veinticuatro.

Dr. Oscar Manuel Rodríguez Narváez.
Director.

Dr. Jesús Salvador Jaime Ferrer.
Co-director.

Dr. Domancar Orona Tamayo.
Asesor.

EG-850-01-F13





GOBIERNO DE
MÉXICO



CONAHCYT
COMISIÓN NACIONAL DE
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



CIATEC

León, Gto., a 27 de septiembre de 2024.

Dra. Mariana Arce Osuna
Directora General
PICYT - CIATEC
León, Guanajuato.

Estimada Dra. Arce,

Los abajo firmantes miembros del Jurado de Examen de la alumna *Natyeli Alejandra Ortiz Tirado*, una vez leída y revisada la Tesis titulada "*Desarrollo de un nanomaterial desinfectante por métodos biogénicos extracelulares a partir de hongos*", aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por o la alumna para aspirar al grado de Maestra en Ciencia y Tecnología en la Especialidad de Ingeniería Ambiental durante el Examen de Grado correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente a los 27 días del mes de septiembre del año dos mil veinticuatro.



Dr. Alberto Quevedo Castro.
Presidente.



Dr. Alain Salvador Conejo Dávila.
Secretario.



Dr. Oscar Manuel Rodríguez Narváez.
Vocal.

EG-850-01-F14



2024
Felipe Carrillo
PUERTO

Resumen

En la última década, las nanopartículas han captado la atención por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, catalíticas, conductoras y ópticas. Estas características han permitido su aplicación en diversas áreas como la medicina, el tratamiento de aguas y la agricultura. Sin embargo, los métodos tradicionales de síntesis de NPs, aunque efectivos, presentan desafíos ambientales y económicos significativos, debido al uso de reactivos tóxicos y costosos. Esto ha impulsado la búsqueda de métodos de síntesis más sostenibles, destacando los métodos biogénicos que utilizan microorganismos y plantas como agentes reductores y estabilizadores. En este contexto, se evaluó la síntesis de AgNPs utilizando extractos del hongo filamentoso *Rhizopus stolonifer*. El objetivo fue identificar las condiciones óptimas para la formación de AgNPs mediante el uso de biomoléculas producidas por el hongo, como proteínas y polifenoles. Estas biomoléculas actúan como agentes reductores y estabilizantes durante la síntesis, proporcionando una cubierta que mejora la estabilidad de las nanopartículas. Los resultados mostraron que los hongos responden de manera independiente al estrés, y su producción de biomoléculas no depende exclusivamente del tiempo o condiciones específicas. Entre el tercer y undécimo día de cultivo, se observaron diferencias significativas en la estructura y madurez del hongo. El hongo de mayor madurez (día once) mostró mayor estabilidad en la producción de biomoléculas, lo que resultó en una menor variabilidad entre réplicas. Aunque no se encontraron diferencias significativas en la síntesis de nanopartículas entre los distintos días de cultivo, las condiciones de síntesis se pudieron estandarizar basándose en la concentración adecuada de proteínas y polifenoles. La proporción óptima para una síntesis eficiente fue de 5 a 33 veces más proteínas que polifenoles. Las nanopartículas resultantes mostraron tamaños y morfologías similares, a pesar de ligeras variaciones en los espectros UV-vis. Las pruebas de desinfección demostraron que las AgNPs fueron altamente efectivas contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, logrando una eliminación bacteriana del 100% incluso con factores de dilución de 4 y 8, respectivamente, sin que las diferencias en las nanopartículas afectaran significativamente su eficiencia. En conclusión, la síntesis biogénica de AgNPs con extractos de *R. stolonifer* es un método prometedor para la producción de nanopartículas antimicrobianas sostenibles, debido a su capacidad para producir resultados consistentes y eficientes en la desinfección bacteriana.

Palabras clave: síntesis biogénica, hongos filamentosos, nanopartículas de plata, biomoléculas.

Abstract

In the last decade, nanoparticles have garnered attention for their antibacterial, antifungal, catalytic, conductive, and optical properties. These characteristics have enabled their application in various fields such as medicine, water treatment, and agriculture. However, traditional methods of NP synthesis, while effective, present significant environmental and economic challenges due to the use of toxic and costly reagents. This has driven the search for more sustainable synthesis methods, with biogenic methods emerging as promising alternatives that utilize microorganisms and plants as reducing and stabilizing agents. In this context, the synthesis of silver nanoparticles using extracts from the filamentous fungus *Rhizopus stolonifer* was evaluated. The objective was to identify the optimal conditions for AgNP formation through the use of biomolecules produced by the fungus, such as proteins and polyphenols. These biomolecules act as reducing and stabilizing agents during synthesis, providing a coating that enhances the stability of the nanoparticles. The results showed that fungi respond independently to stress, and their biomolecule production does not exclusively depend on time or specific stress conditions. Between the third and eleventh day of cultivation, significant differences in the structure and maturity of the fungus were observed. The more mature fungus (day eleven) exhibited greater stability in biomolecule production, resulting in less variability between replicates. Although no significant differences were found in nanoparticle synthesis across different cultivation days, the synthesis conditions could be standardized based on the appropriate concentration of proteins and polyphenols. The optimal ratio for efficient synthesis was found to be 5 to 33 times more proteins than polyphenols. The resulting nanoparticles displayed similar sizes and morphologies despite slight variations in UV-vis spectra. Disinfection tests demonstrated that AgNPs were highly effective against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, achieving 100% bacterial elimination even with dilution factors of 4 and 8, respectively, without significant differences in nanoparticle performance. In conclusion, the biogenic synthesis of AgNPs with *R. stolonifer* extracts is a promising method for producing sustainable antimicrobial nanoparticles, as it consistently yields efficient results in bacterial disinfection.

Keywords: Biogenic synthesis, filamentous fungi, silver nanoparticles, biomolecules

Agradecimientos

Al concluir este arduo y desafiante camino que ha sido el desarrollo de mi tesis de maestría, es inevitable sentir una gran satisfacción por el logro alcanzado. Sin embargo, al reflexionar de manera objetiva, me doy cuenta de que este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo constante de muchas personas que han estado a mi lado, brindándome su tiempo, esfuerzo y comprensión.

En primer lugar, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi pareja, quien ha sido mi mayor apoyo a lo largo de este proceso. Gracias por tu paciencia inagotable, por ser mi refugio en los momentos difíciles y por creer en mí, incluso cuando yo dudaba. Tu amor y aliento han sido fundamentales para mantenerme firme en los momentos más complicados.

A mi familia, quiero agradecerles de corazón por su apoyo incondicional y por estar siempre presentes. A mis padres, por inculcarme desde pequeño los valores de la perseverancia y el esfuerzo, y por enseñarme que los sueños se alcanzan con dedicación y trabajo. A mis primos y amigos, por su ánimo constante y por estar siempre dispuestos a escucharme y brindarme palabras de aliento.

Asimismo, quiero agradecer a mis compañeros de trabajo, quienes no solo han compartido conmigo el día a día en el ámbito profesional, sino que también han sido una fuente invaluable de apoyo y camaradería, convirtiéndose en mi segunda familia. Agradezco profundamente su compañía y apoyo a lo largo de cada paso.

Finalmente, extendiendo mi gratitud a todas las instituciones y personas que, de una u otra forma, hicieron posible este proyecto. A todos ellos, gracias por ayudarme a transformar una idea en realidad. Especialmente el apoyo de CONAHCYT por haberme otorgado la beca con No. CVU: 1233340. Este apoyo fue fundamental para continuar con mis estudios e investigaciones, y estoy profundamente agradecido por la confianza depositada en mí. Gracias a su apoyo, logré contribuir al avance del conocimiento en mi área.

Este logro no es solo mío, sino de todos ustedes.

Índice general

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1 ANTECEDENTES.....	1
1.2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	2
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	2
1.4 OBJETIVOS.....	4
1.4.1 <i>Objetivo general</i>	4
1.4.2 <i>Objetivos específicos</i>	4
1.5 HIPÓTESIS.....	4
2 MARCO TEÓRICO	5
2.1 SÍNTESIS BIOGÉNICA	5
2.1.1 <i>Uso de plantas como agente biológico</i>	5
2.1.2 <i>Uso de microorganismos como agentes biológicos</i>	15
2.2 APLICACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS SINTETIZADAS BIOGÉNICAMENTE	28
2.2.1 <i>Procesos de desinfección</i>	28
3 METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN.....	42
3.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL HONGO FITOPATÓGENOS	42
3.2 PREPARACIÓN DE EXTRACTO DE HONGO.....	42
3.3 SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA	42
3.4 PRUEBAS DE DESINFECCIÓN.....	43
3.5 CARACTERIZACIÓN.....	43
3.5.1 <i>Cinética de crecimiento y reproducción de biomasa del hongo R. stolonifer</i>	43
3.5.2 <i>Cuantificación de proteínas de los extractos de hongo por el método de Kjeldahl Gunnig-Arnold</i>	44
3.5.3 <i>Cuantificación de Demanda Química de Oxígeno (DQO) de los extractos de hongo</i>	44
3.5.4 <i>Cuantificación de proteínas de los extractos de hongo con el método Bradford</i>	44
3.5.5 <i>Cuantificación de polifenoles de los extractos de hongo con el método Folin-Ciocalteu</i>	45
3.5.6 <i>Caracterización de los extractos de hongo y seguimiento de la producción biogénica de AgNPs por espectroscopia IR</i>	45
3.5.7 <i>Análisis estadístico de correlación</i>	46
3.5.8 <i>Caracterización de morfología, tamaño y composición de las AgNPs biogénicamente sintetizadas</i> ... 46	
4 RESULTADOS	47
4.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL HONGO R. STOLONIFER.....	47
4.2 PRUEBAS PRELIMINARES CON DIFERENTES HONGOS	48
4.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE BIOMASA DEL HONGO R. STOLONIFER	49
4.3.1 <i>Caracterización por infrarrojo de los extractos de hongo R. stolonifer con tres días de crecimiento</i>	50
4.3.2 <i>Cuantificación de proteínas y polifenoles de los extractos de hongo R. stolonifer con tres días de crecimiento</i>	53
4.3.3 <i>Caracterización por infrarrojo de los extractos de hongo R. stolonifer con once días de crecimiento</i> 55	
4.3.4 <i>Cuantificación de proteínas y polifenoles de los extractos de hongo R. stolonifer con once días de crecimiento</i>	56
4.4 SÍNTESIS DE AGNPs CON EXTRACTOS DEL HONGO R. STOLONIFER CON TRES Y ONCE DÍAS DE CRECIMIENTO .	58

4.5	ANÁLISIS DE CORRELACIÓN ESTADÍSTICA ENTRE LOS POLIFENOLES Y LAS PROTEÍNAS CUANTIFICADAS DE LOS EXTRACTOS DEL HONGO <i>R. STOLONIFER</i> CON TRES Y ONCE DÍAS DE CRECIMIENTO.....	60
4.5.1	<i>Validación de las Ecuaciones de correlación para la predicción de proteínas y polifenoles de los extractos de hongo R. stolonifer con tres y once días de crecimiento</i>	64
4.6	ANÁLISIS DE CONCENTRACIONES Y RELACIONES OPTIMAS DE PROTEÍNAS Y POLIFENOLES PARA LA FORMACIÓN DE AGNPs CON EXTRACTOS DE HONGO DE LOS EXTRACTOS DEL HONGO <i>R. STOLONIFER</i> CON TRES Y ONCE DÍAS DE CRECIMIENTO	71
4.7	ANÁLISIS DE LOS ESPECTROS UV-VIS DE LAS AGNPs BIOGÉNICAMENTE SINTETIZADAS CON EXTRACTOS DEL HONGO <i>R. STOLONIFER</i> CON TRES Y ONCE DÍAS DE CRECIMIENTO	75
4.7.1	<i>Caracterización de las AgNPs biogénicamente sintetizadas con extractos de hongo R. stolonifer con tres y once días de crecimiento</i>	77
4.8	PRUEBAS DE DESINFECCIÓN POR MICRODILUCIONES DE AGNPs BIOGÉNICAMENTE SINTETIZADAS POR EL HONGO <i>R. STOLONIFER</i> CON TRES Y ONCE DÍAS DE CRECIMIENTO	83
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	85
5.1	CONCLUSIONES	85
5.2	RECOMENDACIONES	86
6	REFERENCIAS	87

Índice de Figuras

Figura 1. Cultivos purificados de hongos aislados de frutos enfermos; a) <i>Aspergillus</i> spp., b) <i>Penicillium</i> spp., c) <i>P. italicum</i> y d) <i>R. Stolonifer</i>	47
Figura 2. Cinética de producción de biomasa del hongo <i>R. stolonifer</i> cultivado en PDA.	49
Figura 3. Espectros FT-IR de los diferentes extractos de hongo <i>R. stolonifer</i> con tres días de crecimiento.	52
Figura 4. Espectros UV de los diferentes extractos de hongo <i>R. stolonifer</i> con tres días de crecimiento.	53
Figura 5. Concentración de polifenoles cuantificada de los diferentes extractos de hongo <i>R. stolonifer</i> con tres días de crecimiento.	54
Figura 6. Concentración de proteínas cuantificada de los diferentes extractos de hongo <i>R. stolonifer</i> con tres días de crecimiento.	55
Figura 7. Espectros UV de los diferentes extractos de hongo <i>R. stolonifer</i> con tres días de crecimiento.	56
Figura 8. Comparación entre las concentraciones de polifenoles obtenidas de los extractos E3 y E11.	57
Figura 9. Comparación entre las concentraciones de proteínas obtenidas de los extractos de hongo con tres días (E3) y once días (E11) de crecimiento.	58
Figura 10. Comparación entre la predicción y el valor real de a) polifenoles con la ecuación (1) y b) Proteínas con la ecuación (2).	63
Figura 11. Comparación entre las concentraciones de polifenoles obtenidas de los extractos de hongo con tres días (E3) y once días (E11) de crecimiento utilizando la Ec. (1).	64
Figura 12. Comparación entre las concentraciones de polifenoles obtenidas de extractos de hongo E3 y E11 a diferentes tiempos de estrés.	67
Figura 13. Comparación entre las concentraciones de proteínas obtenidas de extractos de hongo E3 y E11 a diferentes tiempos de estrés.	68
Figura 14. Comparación entre la predicción y el valor real de a) polifenoles con la ecuación (1) y b) Proteínas con la ecuación (2) utilizando los resultados obtenidos con los nuevos extractos.	69
Figura 15. Rangos de espectros UV-vis de las AgNPs sintetizadas; a) Rango 1: 435-425 nm, b) Rango 2: 455-446 nm, c) Rango 3: 445-437 nm y d) Rango 4: 435-425 nm	76
Figura 16. Espectros FT-IR de los extractos del hongo <i>R. stolonifer</i> y las AgNPs biogénicamente sintetizadas.	77
Figura 17. HRTEM de la muestra seleccionada del rango 1; S3-524.	79
Figura 18. HRTEM de la muestra seleccionada del rango 1; a) S3-24a, b) S11-24c y c) S11-48c.	80
Figura 19. HRTEM de la muestra seleccionada del rango 2; a) S11-827 y b) S3-320.	81
Figura 20. HRTEM de la muestra seleccionada del rango 2; a) S11-824 y b) S3-430.	81
Figura 21. Resultados de las pruebas de desinfección de las AgNPs sintetizadas con extractos de hongo <i>R. stolonifer</i> ; a) Rango 1- muestra S3-524, b) Rango 2- muestra S11-830, c) Rango 3- muestra S11-827, d) Rango 3- muestra S3-320, e) Rango 4- muestra S3-430 y f) Rango 4- muestra S11-824.	84

Índice de Tablas

Tabla 1. Producción de extractos para el método biogénico basado en plantas para la síntesis de nanopartículas.	8
Tabla 2. Síntesis de nanopartículas biogénicas de origen vegetal.	12
Tabla 3. Síntesis biogénica basada en microorganismos.	18
Tabla 4. Síntesis de nanopartículas biogénicas a partir de microorganismos.	24
Tabla 5. Actividad antibacteriana de nanopartículas sintetizadas biogénicamente.	31
Tabla 6. Actividad antifúngica de nanopartículas sintetizadas biogénicamente.	40
Tabla 7. Resultados de las pruebas preliminares para la formación de AgNPs biogénicamente sintetizadas con diferentes extractos de hongo.	48
Tabla 8. Resultados de la síntesis de AgNPs con extractos de hongo R. stolonifer con tres días de crecimiento después de 24 h de reacción.	59
Tabla 9. Resultados de la síntesis de AgNPs con extractos de hongo R. stolonifer con tres días de crecimiento después de 24 h de reacción.	59
Tabla 10. Resultados seleccionados para el análisis de correlación de correlación en el programa statgraphics.	60
Tabla 11. Concentración de polifenoles y proteínas cuantificados de 10 extractos de hongo R. stolonifer con tres y once días de crecimiento a diferentes tiempos de estrés.	65
Tabla 12. Resultados de la síntesis de AgNPs con extractos E3 y E11 a diferentes tiempos de estrés después de 24 h de reacción.	70
Tabla 13. Recopilación de todos los resultados de la síntesis de AgNPs con extractos de hongo R. stolonifer con tres y once días de crecimiento a diferentes tiempos de estrés después de 24 h de reacción.	72
Tabla 14. Resultados de síntesis de AgNPs con extractos de hongo con tres y once días de crecimiento fuera del rango viable.	74
Tabla 15. Resultados de síntesis de AgNPs con extractos de hongo con tres y once días de crecimiento fuera del rango viable.	78
Tabla 16. Resultados de síntesis de AgNPs con extractos de hongo con tres y once días de crecimiento fuera del rango viable.	81

Glosario

NPs	Nanopartículas
AgNPs	Nanopartículas de Plata
AgNO ₃	Nitrato de plata
FT-IR	Infrarrojo por transformada de Fourier
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
MO	Microorganismos
ZOI	Zona de Inhibición
CIM	Concentraciones inhibitorias mínimas
CBM	Concentración bactericida mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ROS	Especies reactivas de oxígeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
ATR	Atenuación total de reflexión
E3	Extractos de hongo <i>R. stolonifer</i> con tres días de crecimiento
E11	Extractos del hongo <i>R. stolonifer</i> con once días de crecimiento
SPR	Resonancia de Plasmón Superficial

1 Introducción y Objetivos

1.1 Antecedentes

En la última década, las nanopartículas (NPs) han capturado la atención de la comunidad científica y de diversas industrias gracias a sus extraordinarias propiedades químicas y físicas. Estas incluyen capacidades antibacterianas, antifúngicas, magnéticas, catalíticas, conductoras, ópticas y de transporte, que abren un vasto abanico de aplicaciones potenciales. Para evitar el riesgo generado por la contaminación biológica, se han desarrollado diversos tratamientos de desinfección, los cuales han mostrado altas eficiencias. Sin embargo, gran parte de estos procesos de desinfección son poco sustentables y peligrosos para el ambiente, debido a que algunas sustancias como el cloro, cloramina u ozono generan subproductos tóxicos como cloro residual libre o trihalometanos [1]. Dichos subproductos, se han reportado como un riesgo para la salud humana y medio ambiente, debido a que son promotores de cáncer y generan problemas ambientales como golpes de calor y aumento en la intensidad de fenómenos hidrometeorológicos como inundaciones y sequías [2]. Tomando en cuenta lo anterior, se ha demostrado que las NPs pueden mejorar la eficiencia en industrias como la medicina, el tratamiento de aguas y la agricultura, contribuyendo al tratamiento de enfermedades y a la reducción de costos en fertilización. Sin embargo, a pesar de sus numerosas ventajas, la producción a gran escala de nanopartículas enfrenta desafíos significativos. Los métodos tradicionales de síntesis requieren reactivos y condiciones que no solo tienen un alto costo, sino que también presentan un impacto negativo considerable en el ambiente. Esta situación ha llevado a los investigadores a explorar métodos de síntesis ecológicos, que se consideran alternativas no tóxicas que permitan sustituir los productos químicos tóxicos por productos naturales que actúen como agentes reductores, recubrimiento y estabilizadores durante la síntesis de materiales.

Entre los métodos de síntesis verde, los métodos de síntesis biogénica se destacan por su uso de compuestos naturales, como microorganismos y plantas, para obtener biomoléculas. Estas biomoléculas, que incluyen polifenoles, vitaminas, aminoácidos e hidratos de carbono, se emplean como reactivos para sintetizar nanopartículas; además, proporcionan una cubierta que mejora la estabilidad de las NPs. A pesar de su potencial, los métodos biogénicos aún no se comprenden completamente, en parte porque no se ha determinado la interacción precisa entre las biomoléculas y los materiales metálicos o el impacto de estas biomoléculas en las propiedades químicas y físicas de las nanopartículas. Por lo tanto, en la presente tesis se pretende caracterizar el método biogénico

con hongos filamentosos *R. stolonifer* para identificar las mejores condiciones enfocadas en las biomoléculas para la formación de nanopartículas de plata (AgNPs) y su caracterización para la aplicación como desinfectante de bacterias presentes en agua.

1.2 Definición del problema

La contaminación biológica del agua y la mala gestión de las aguas residuales promueven la proliferación de microorganismos patógenos, como las bacterias *E. coli*, *S. typhi*, *Shigella spp.*, y *Vibrio cholerae*. Estos patógenos representan una grave amenaza para la salud humana, ya que son causantes de diversas enfermedades intestinales [3,4]. Tradicionalmente, para abordar esta problemática se han utilizado tratamientos de desinfección convencionales, como la cloración y la ozonización. Sin embargo, estos métodos suelen generar subproductos tóxicos, como el cloro residual libre y los trihalometanos, que son perjudiciales tanto para la salud humana como para el medio ambiente [1]. Por ello, las NPs emergen como una solución innovadora y prometedora debido a sus propiedades únicas, como alta reactividad y superficie específica, así como un potencial para mejorar los procesos de desinfección de agua. Además, se ha demostrado que ciertas NPs poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas, lo que las hace efectivas contra una amplia gama de patógenos; generando una alternativa segura y eficiente (e.g., minimizar la generación de subproductos tóxicos). No obstante, la implementación de nanopartículas en tratamientos de agua enfrenta desafíos, como la producción a gran escala de NPs con métodos tradicionales debido a que estos son costosos y ambientalmente dañinos. Por ello, la investigación se ha centrado en métodos de síntesis biogénica, que utilizan compuestos naturales para crear nanopartículas de manera sostenible, es decir, reducen el impacto ambiental y mejoran la estabilidad y efectividad de las NPs mediante el uso de biomoléculas como agentes estabilizadores y reductores.

1.3 Justificación

La desinfección mediante el uso de nanopartículas metálicas, especialmente nanopartículas de plata, oro, cobre, zinc y hierro, ha emergido como una alternativa viable por sus destacadas propiedades químicas y físicas (e.g., tamaño, forma, conductividad eléctrica, propiedades antimicrobianas y estabilidad) que las convierten en eficaces agentes antimicrobianos. Las NPs de plata, en particular, han demostrado ser efectivas en la inactivación de microorganismos, ya que pueden interactuar directamente con las células microbianas, causando alteraciones físicas en la membrana celular y generando productos como especies reactivas de oxígeno o iones metálicos

disueltos que resultan en daño celular. Además, su uso puede evitar la generación de subproductos tóxicos típicos de los métodos de desinfección convencionales. Sin embargo, la síntesis de estas nanopartículas plantea problemas ambientales significativos, dado que a menudo se utilizan productos químicos tóxicos como el hidróxido de sodio, 1-octadeceno, yoduro de germanio (II y IV) y metanol. Por ello, el desarrollo de métodos biocompatibles, como la síntesis biogénica de nanopartículas metálicas, se ha convertido en una necesidad urgente para superar estas desventajas ambientales.

La síntesis biogénica, que utiliza agentes biológicos para la producción de nanopartículas, ofrece numerosas ventajas, incluyendo biocompatibilidad, baja toxicidad y una mayor actividad antibacteriana y antifúngica. Además, se ha reportado que las nanopartículas sintetizadas mediante métodos biogénicos pueden adquirir propiedades medicinales de los agentes biológicos utilizados, aumentando así su efectividad. Asimismo, este puede llevarse a cabo a través de dos mecanismos principales: la síntesis intracelular y la síntesis extracelular. En la síntesis intracelular, el precursor del metal se introduce en el cultivo micelial y se internaliza en la biomasa, requiriendo posteriormente la extracción de las nanopartículas mediante tratamientos químicos, centrifugación y filtración; mientras que, para la síntesis extracelular, el precursor del metal se añade al filtrado acuoso de biomoléculas fúngicas, resultando en la formación de nanopartículas libres en la dispersión.

Entre los diferentes métodos de síntesis biogénica, el uso de hongos ha sido el más reportado debido a su gran tolerancia a los metales, facilidad de manipulación y cultivo, y su capacidad para segregar grandes cantidades de enzimas extracelulares que reducen las sales metálicas a nanopartículas. Estos organismos, además de ser fáciles de cultivar en condiciones de laboratorio, presentan una alta eficiencia en la biosíntesis de nanopartículas con características específicas. En particular, hongos como el *Rhizopus stolonifer* han mostrado un gran potencial en este campo. Este hongo, conocido por su rápida proliferación y capacidad para tolerar ambientes con altos niveles de metales, ha demostrado ser efectivo en la producción de nanopartículas de diversos metales, incluyendo plata, oro y cobre. Además, el uso de hongos no solo es una alternativa más ecológica y sostenible en comparación con los métodos químicos tradicionales, sino que también permite la producción de nanopartículas con propiedades únicas, derivadas de la naturaleza biológica del proceso de síntesis. Por lo tanto, el presente trabajo se centra en la caracterización y análisis del método de síntesis biogénica extracelular de nanopartículas de plata utilizando diferentes hongos del que destaco el hongo *R. stolonifer*. Se investigará la relación entre las biomoléculas o metabolitos segregados por este hongo y la formación de nanopartículas de plata, cuantificando proteínas y polifenoles y caracterizando las AgNPs mediante diversos métodos. Posteriormente, se

evaluará la eficacia de las AgNPs sintetizadas en la desinfección de microorganismos, con el objetivo de demostrar su viabilidad como una alternativa ecológica y eficiente para la desinfección del agua.

1.4Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Sintetizar nanopartículas de plata utilizando un método biogénico extracelular a partir de hongos fitopatógenos aislados de la costa para su aplicación en la desinfección de bacterias modelo.

1.4.2 Objetivos específicos

- Seleccionar los hongos fitopatógenos aislados de la costa útil para la síntesis de nanopartículas de plata a partir de la síntesis biogénica extracelular.
- Caracterizar el extracto acuoso del hongo seleccionado para identificar algunas de las biomoléculas implicadas en la síntesis biogénica.
- Determinar las características estructurales de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir del hongo seleccionado.
- Relacionar la cantidad de biomoléculas con la formación de nanopartículas de plata sintetizadas a partir del hongo seleccionado.
- Determinar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas a partir del hongo seleccionado contra una bacteria modelo gram negativa y una gram positiva.

1.5Hipótesis

Las biomoléculas segregadas en medio acuoso por diferentes hongos fitopatógenos mezcladas con nitrato de plata (AgNO_3) podrían lograr reducir los iones de plata de esta sal metálica en nanopartículas de plata con propiedades derivadas de las biomoléculas, y se pueden aplicar para la desinfección de bacterias gram negativa y gram positiva.

2 Marco Teórico

2.1 Síntesis biogénica

La síntesis biogénica de nanopartículas se ha convertido en un tema de interés porque los reactivos de síntesis (e.g., agentes reductores, agentes de recubrimiento y estabilizadores) se obtienen a partir de biomoléculas o metabolitos (e.g., proteínas, polifenoles, flavonoides y taninos) producidos a partir de compuestos naturales (e.g., plantas, hongos, bacterias y algas) [5]. Además, se ha descrito como sencillo y rentable en comparación con las técnicas de síntesis más tradicionales [6]. Por lo tanto, los métodos biogénicos podrían dividirse principalmente en dos basados en el compuesto natural utilizado, a base de plantas y a base de microorganismos.

2.1.1 Uso de plantas como agente biológico

La síntesis biogénica con plantas se divide en preparación del extracto (Tabla 1) y síntesis de nanopartículas (Tabla 2). La preparación del extracto se destaca como el paso principal para la síntesis de nanopartículas porque se obtienen diferentes compuestos de extracción dependiendo de los procesos realizados, y cada una de las diferentes biomoléculas afecta a los procesos de síntesis [7]. Por ejemplo, los procesos de extracción con disolventes afectan a los fitoquímicos extraídos porque se solubilizarán biomoléculas específicas dependiendo de la polaridad del disolvente utilizado [8,9].

La Tabla 1 muestra que los procesos de infusión son los procesos de extracción más reportados debido a que la adición de calor reduce el tiempo de extracción necesario [10,11] en comparación con la temperatura ambiente [12,13]. También, se muestra que las infusiones a base de agua son las más utilizadas porque se buscaba evitar el uso de reactivos, pero algunos autores añadieron solventes como líquidos iónicos y etanol para incrementar biomoléculas específicas como los flavonoides y compuestos fenólicos, respectivamente [8,9,14,15]. Sin embargo, la adición de disolventes al proceso de extracción reduce el objetivo del método biogénico, que es evitar reactivos para el método de síntesis. Por lo tanto, mejorar el método de infusión utilizando otras alternativas de calentamiento es una línea de investigación a desarrollar ya que algunos autores han

reportado que tecnologías como los procesos asistidos por microondas reducen el riesgo de pérdida de componentes bioactivos viables en comparación con el calentamiento convencional [14,16].

De ahí se destaca que se consiguen diferentes tipos y concentraciones de biomoléculas en el extracto dependiendo de los procesos de extracción, y para cada extracto se producen diferentes nanopartículas. Por ejemplo, De Lima Barizão et al. [17] reportaron extractos de tallos de remolacha y hojas de calabaza para la producción de nanopartículas de óxido de hierro. Los autores determinaron la concentración polifenólica de cada extracto y observaron que las hojas de calabaza tenían una concentración mayor que los tallos de remolacha. Esta información se comparó con las características de las nanopartículas, y se observó que el material generado con el extracto de hoja tenía forma redondeada y mayor tamaño que las sintetizadas utilizando extracto de remolacha, concluyendo que mayores dosis de polifenoles conducen a partículas de mayor tamaño. Además, comparando los informes, se determina que algunos compuestos fitoquímicos, como los polifenoles, tienen más de una interacción, ya que, dependiendo del extracto producido, se ha informado de que actúan como agentes reductores [18], estabilizadores de terpenoides o saponinas [19] o incluso no participan en la síntesis directa [20]. Destacando que ninguna biomolécula específica tiene un único propósito en la síntesis, podría haber grupos funcionales más específicos (e.g., grupo carbonilo o hidroxilo) que permitan la síntesis de nanopartículas [21]. Sin embargo, pocos autores han informado sobre la caracterización de los extractos y su efecto en el proceso de síntesis [9,15,17,18,22-27]. Esto muestra una importante laguna de información que debe ser subsanada, ya que, si no se comprende la interacción del extracto, no es posible replicar el método biogénico y no se puede conseguir el escalado.

Como se ha descrito, la identificación de biomoléculas es un paso primordial para comprender los métodos biogénicos. A pesar de los pocos informes en los que se realizó un análisis de extractos, muchos de ellos tienen el inconveniente de que el análisis se realizó principalmente utilizando el infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) identificando las biomoléculas y las posibles interacciones entre las biomoléculas y las nanopartículas debido a los desplazamientos de señales específicas [18,28,29]. No obstante, las señales podían proceder de múltiples biomoléculas, por lo que no se podía realizar una identificación adecuada. Por lo tanto, una línea de investigación relevante a desarrollar es una caracterización más amplia de los fitoquímicos. Por ejemplo, debería utilizarse la cromatografía de gases o la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), ya que identifica los compuestos fitoquímicos específicos [19,30]. También, técnicas espectroscópicas como el método de Folin-Ciocalteu, el ensayo de Bradford, la cuantificación de taninos usando cloruro férrico, o la cuantificación de flavonoides usando cloruro de aluminio podrían ser utilizadas porque permiten en un amplio para una mejor comprensión de la cantidad de compuestos

fitoquímicos en el extracto y de eso generar una vía de mecanismos de síntesis de hipótesis [24,26,31].

Tabla 1. Producción de extractos para el método biogénico basado en plantas para la síntesis de nanopartículas.

Metal	Materia prima/Especie	Proceso de extracción	Condiciones de extracción	Referencia
α -Fe ₂ O ₃	Hojas/ <i>Laurus nobilis</i>	Infusión	[Biomasa]=0.1 g mL ⁻¹ T=70° C t=10 min 500 rpm	[10]
α -Fe ₂ O ₃	Hojas / <i>Carica papaya</i>	Infusión	[Biomasa]=0.02 g mL ⁻¹ T=80° C t=30 min	[11]
γ -Fe ₂ O ₃	Frutos/ <i>Ficus carica</i>	Infusión	[Biomasa]= 0.066 g mL ⁻¹ T=100 ° C t=1 h	[32]
Fe ₂ O ₃	Frutos/ <i>Cynometra ramiflora</i>	Infusión	[Biomasa]= 0.1 g mL ⁻¹	[33]
FeO	Hojas/ <i>Moringa oleifera</i>	Infusión	[Biomasa]= 0.1 g mL ⁻¹ T = 80° C t = 1 h	[34]
FeO	Flores/ <i>Avicennia marina</i>	Infusión	[Biomasa]=0.05 g mL ⁻¹ t = 5 min	[35]
maghemita / goethita	Tallo/ <i>Beta vulgaris</i>	Infusión	[Biomasa]=0.06 g mL ⁻¹ T = 80°C t = 2 h	[17]
maghemita / goethita	Hojas/ <i>Cucurbita moschata</i>	Infusión	[Biomasa]=0.06 g mL ⁻¹ T=80° C t = 2 h	[17]
Fe ₃ O ₄ y α -Fe ₂ O ₃	Hojas/ <i>Mentha Pulegium</i>	Infusión	[Biomasa]=0.1 g mL ⁻¹ T=25° C t = 24 h	[12]
Fe ₃ O ₄ y α -Fe ₂ O ₃	Hojas/ <i>Pheonix dactylifera</i>	Maceración / Metanol	[Biomasa]=0.125 g mL ⁻¹ V _{agua} /V _{metanol} =1:8 t = 12 h*	[36]
α -Fe ₂ O ₃ y γ -Fe ₂ O ₃	Hojas/	Infusión	[Biomasa]=0.1 g mL ⁻¹	[37]

	<i>Platanus orientalis</i>		T = 70°C t = 30 min [Biomasa]=0.05 g mL ⁻¹	
α -Fe ₂ O ₃ y γ -Fe ₂ O ₃	Hojas/ <i>Ficus carica</i>	Infusión	T = 80°C t = 1 h [Biomasa]=0.1 g mL ⁻¹	[38]
Ag	Hojas/ <i>Azadirachta indica</i>	Infusión	T = 70 °C t = 10 min	[8]
Ag	Hojas/ <i>Azadirachta indica</i>	Maceración / Etanol	[Biomasa]=0.1 g mL ⁻¹ t = 12 h	[8]
Ag	Fruta/ <i>Allium cepa</i>	Infusión	[Biomasa]=0.5 g mL ⁻¹ t = 8 min	[39]
Ag	Raíces/ <i>Chlorophytum comosum</i>	Infusión	[Biomasa]=0.1 g mL ⁻¹ T = 70 °C t = 10 min	[8]
Ag	Raíces/ <i>Chlorophytum comosum</i>	Maceración / Etanol	[Biomasa]=0.1 g mL ⁻¹ t = 12 h*	[8]
Ag	Semillas/ <i>Linum usitatissimum</i>	Extracción por microondas	[Biomasa]=0.05 g mL ⁻¹ t = 5 min Solución de etanol = 70% v/v	[16]
Ag	Raíces/ <i>Helicteres isora</i>	Maceración / Etanol	[Biomasa]=0.01 g mL ⁻¹ t = 12 h 120 rpm	[13]
Au	Hojas/ <i>Jasminum auriculatum</i>	Infusión	T = 80 °C t = 30 min	[29]
Au	Hojas/ <i>Alpinia nigra</i>	Infusión	[Biomasa]=0.028 g mL ⁻¹ T = 50°C t = 30 min	[18]
Au	Hojas/ Oil palm	Maceración / Líquido iónico (con temperatura)	[Biomasa]=0.05 g mL ⁻¹ Líquido iónico = 2% w/v T = 70 °C t = 15 min	[9]

Au	Frutos/ <i>Prunus nepalensis</i>	Infusión	[Biomasa]=0.05 g mL ⁻¹ T = 60 °C t = 10 min	[24]
ZnO	Hojas/ <i>Thymbra spicata</i>	Infusión	[Biomasa]=0.2 g mL ⁻¹ T = 80°C t = 15 min	[40]
ZnO	Hojas/ <i>Citrus limon</i>	Infusión	[Biomasa]=0.266 g mL ⁻¹ T = 60°C t = 4h	[28]
ZnO	Semillas/ <i>Nigella sativa</i>	Infusión	[Biomasa]=0.2 g mL ⁻¹ T = 80 °C t = 20 min 100 rpm	[41]

La Tabla 2 muestra que la mayoría de las síntesis con plantas de nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos se realizan preparando una solución precursora de 1 mM y 0,1 M, dependiendo del material utilizado. Esto muestra un vacío de información importante en la interacción entre la solución de extracto y el precursor, ya que algunos autores, como Ifran et al. [9], informaron de que la concentración inicial de extracto para las NPs de oro tiene un rango en el que se podría producir debido a la concentración más baja (0.76 mM), el proceso de síntesis no se pudo iniciar, pero el aumento de la concentración inicial (es decir, 3.81 mM) genera un mayor rendimiento de reacción se logró. Otros, como Abdullah et al. [36], discutieron que las concentraciones de precursores para nanopartículas de óxido de hierro sólo se logran variaciones morfológicas (es decir, un aumento en la concentración que resulta en la disminución del tamaño medio de las nanopartículas) y no el rendimiento.

La modificación de la temperatura para mejorar la producción de NPs se ha reportado para procesos de síntesis química porque reduce los tiempos de síntesis y permite algunas vías de reacción [42-44]. Lo mismo se observa para la síntesis biogénica con plantas (ver Tabla 2) en la que se ha reportado que las altas temperaturas (>50° C) para NPs de oro aumentaron el valor de absorbancia, ya que ayuda en el proceso de reducción utilizando extracto de flores de *L. japonica* y de frutos de kokum [45,46]. Asimismo, la síntesis de NPs de plata utilizando extracto de hoja de *R. cordifolia* requiere un mínimo de 60° C [27]. Sin embargo, como se ha descrito, el calor modifica la estructura química de una biomolécula, lo que pone de manifiesto que la alta temperatura podría tener dos vías para el método biogénico: aumentar las reacciones (e.g., la reducción) y cambiar la estructura de la biomolécula, permitiendo la reacción. Por lo tanto, entender el efecto de la temperatura en ambas vías evitando una se muestra como una línea de investigación a desarrollar. Por ejemplo, el calentamiento por microondas no modifica las biomoléculas en el extracto [14,16], y algunos autores reportaron que la asistencia por microondas mejoró la generación de NPs (e.g., Au y Pd) [9,47].

Como paso final para la síntesis biogénica con plantas, varios autores reportaron que realizaron un lavado, ya sea con agua o alcohol, y dejaron secar o calcinaron la muestra con la materia orgánica y las NPs [21,33,48]. Este último paso tiene como objetivo conseguir una NP sin materia orgánica, y podría ser utilizado. Sin embargo, la calcinación podría ser una desventaja para el método porque se ha reportado que la calcinación modifica las propiedades químicas y físicas (e.g., tamaño y estado de oxidación, respectivamente) [49], evitando que se obtenga la NP original sintetizada. Por lo tanto, la investigación debería centrarse en el desarrollo de métodos que eliminen o degraden la materia orgánica sin modificar las NP.

Tabla 2. Síntesis de nanopartículas biogénicas de origen vegetal.

Metal	Materia prima/Especie	Condiciones de síntesis	Referencia
α -Fe ₂ O ₃	Hojas / <i>Carica papaya</i>	[FeCl ₃ *6H ₂ O] = 0.1 M 1:1 V _{precursor} /V _{extracto} T = RT t = 30 min pH = 11	[48]
α -Fe ₂ O ₃	Cascara / Banana	[FeCl ₃] = 0.1 M 1:1 V _{precursor} /V _{extracto} T = 80 °C t = 1 h	[12]
γ -Fe ₂ O ₃	Fruto / <i>Ficus carica</i>	[FeCl ₃] = 0.14 M 1:1 V _{precursor} /V _{extracto} t = 2 h	[32]
Fe ₃ O ₄ y α -Fe ₂ O ₃	Hojas / <i>Mentha Pulegium</i>	[FeCl ₃] = 0.01, 0.04, 0.07 and 0.1 M 10:1 V _{precursor} /V _{extracto} T = 75° C t = 1 h	[12]
Fe ₃ O ₄ y α -Fe ₂ O ₃	Hojas / <i>Pheonix dactylifera</i>	[FeCl ₃] = 0.01, 0.02 and 0.03M 1:1 V _{precursor} /V _{extracto} [HCl] = 0.01M T = 70° C t = 1h	[36]
α -Fe ₂ O ₃ y γ -Fe ₂ O ₃	Hojas / <i>Platanus orientalis</i>	Fe(NO ₃) ₃ *9H ₂ O = 0.25 M T = 25 °C t = 1 h	[37]
α -Fe ₂ O ₃ y γ -Fe ₂ O ₃	Hojas / <i>Ficus carica</i>	[FeCl ₃ *6H ₂ O] = 0.01M 5:2 V _{precursor} /V _{extracto} T = 70° C pH = 11 t = 1 h	[38]

Ag	Hojas / <i>Azadirachta indica</i>	[AgNO ₃] = 1 mM 9:1 V _{precursor} /V _{extracto} T = RT t = 48 h	[8]
Ag	Fruto / <i>Allium cepa</i>	[AgNO ₃] = 0.1 mM 10:1 V _{precursor} /V _{extracto} T = 60-65°C	[39]
Ag	Raices / <i>Chlorophytum comosum</i>	[AgNO ₃] = 1 mM 9:1 V _{precursor} /V _{extracto} T = RT t = 48 h	[8]
Ag	Hojas / <i>Gardenia thailandica</i>	[AgNO ₃] = 1 mM 9:1 V _{precursor} /V _{extracto} T = RT t = 12 h*	[15]
Ag	Semillas / <i>Linum usitatissimum</i>	[AgNO ₃] = 0.9 mM [Extracto] = 20% V _{extracto} /V _{agua} T = 75°C t = 2 días	[16]
Au	Hojas / <i>Jasminum auriculatum</i>	[HAuCl ₄ *3H ₂ O] = 1 mM 9:1 V _{precursor} /V _{extracto} T = RT t = 1 h	[29]
Au	Hojas / Oil palm	[HAuCl ₄] = 0.76 – 3.81 mM 2:1 V _{precursor} /V _{extracto} t = 90 s	[9]
ZnO	Hojas / <i>Thymbra spicata</i>	Microondas = 2450 MHz, 800W [Zn(O ₂ CCH ₃) ₂] = 1 mM 5:1 V _{precursor} /V _{extracto} T = RT	[40]
ZnO	Hojas /	[Zn(NO ₃) ₂ *6H ₂ O] = 0.448 M	[28]

	<i>Citrus limon</i>	3:8 $V_{\text{precursor}}/V_{\text{extracto}}$ t = 25 min 300 rpm T = 70° C t = 3 h	
ZnO	Hojas / <i>Thymbra spicata</i>	[Zn(O ₂ CCH ₃) ₂] = 1 mM 5:1 $V_{\text{precursor}}/V_{\text{extracto}}$ T = RT	[40]
ZnO	Semillas / <i>Nigella sativa</i>	[Zn(NO ₃) ₂] = 0.05 M 10:1 $V_{\text{precursor}}/V_{\text{extracto}}$ t = 20 min	[40]
MgO	Hojas / <i>Amaranthus tricolor</i>	[Mg(NO ₃) ₂] = 0.001M T = 60° C pH = 3 –11 t = 10 min	[28]
Pd	Semillas / <i>Lantana trifolia</i>	[PdCl ₂] = 10 mM 2:9 and 1:9 $V_{\text{precursor}}/V_{\text{extracto}}$ Microondas = 700 W	[47]
	Semillas / <i>Lantana trifolia</i>	T _{agitación} = 2 h t _{microondas} = 2 min	

*12 h : Una noche de espera.

2.1.2 Uso de microorganismos como agentes biológicos

Como la síntesis biogénica con plantas, la síntesis biogénica basada en microorganismos no utiliza reactivos tóxicos, y se ha informado de que las NPs tienen propiedades como biocompatibilidad, baja toxicidad y mayor actividad antibacteriana y antifúngica [50,51]. Las síntesis con microorganismos se basan en el uso de diferentes aislados de microorganismos unicelulares o multicelulares (e.g., levaduras, bacterias, hongos y algas) de varios entornos (e.g., suelo, agua, aire, plantas y humanos) [52-54]. Además, se han descrito dos vías de producción, la intracelular y la extracelular. El mecanismo intracelular utiliza la biomasa de los microorganismos, haciendo que los iones interactúen con la pared celular microbiana utilizando proteínas y enzimas como mediadores para producir nanopartículas (es decir, los iones se reducen dentro de la célula). En cambio, en el mecanismo extracelular no interviene el propio microorganismo, sino sólo enzimas y proteínas secretadas desde la superficie de la célula microbiana; la síntesis tiene lugar fuera de la célula utilizando un sobrenadante con metabolitos secretados extracelularmente para reducir los iones y producir nanopartículas [50,55-57].

Los microorganismos utilizados para la producción de NPs son importantes porque a pesar de que todos ellos tienen propiedades que les permiten generar metabolitos interna y externamente, el mecanismo de reducción de iones para sintetizar NPs depende de la capacidad del microorganismo para secretar eficientemente enzimas y proteínas. Por ejemplo, las bacterias secretan una baja concentración de biomoléculas, generando que éstas sean utilizadas principalmente para métodos intracelulares [52]. Los hongos liberan importantes concentraciones y cantidades de biomoléculas, destacando la aplicación del método extracelular [58,59]. Sin embargo, pocos informes realizaron un análisis profundo de la vía de producción de las NPs, ya que la mayoría de ellos informaron de que, si existe biomasa, se trata únicamente de un mecanismo intracelular. No obstante, Gopinath et al. [60] reportaron la síntesis de AgNP utilizando sobrenadante y biomasa (es decir, extra e intracelular, respectivamente) de *Pseudomonas putida* MVP2 aislada del suelo, destacando que las AgNP se sintetizaron principalmente en la membrana externa de la bacteria mostrando que, a pesar de la presencia de biomasa, su mecanismo es sólo extracelular. Por lo tanto, se debe realizar un análisis más profundo de los mecanismos de la vía intra y extracelular. Hasta ahora, se ha informado de que la vía extracelular utiliza un sobrenadante y la vía intracelular utiliza biomasa, pero no se ha podido realizar un efecto sinérgico o ningún proceso intracelular.

La Tabla 3 muestra los diferentes microorganismos (MO) y condiciones utilizadas para la síntesis con microorganismo. Se muestra que las bacterias (e.g., *P. stewartii*, *P. putida* MVP2, *B. paramycooides*) son las más utilizadas porque son MO modelo con una condición de crecimiento estandarizada y corta (e.g., menos de 24 h) [52,56, 61-63]. Sin embargo, tiene la desventaja de que muchos son patógenos humanos (e.g., *P. aeruginosa*) cuyo uso es peligroso [64]. Por lo tanto, los hongos se destacan en la síntesis de microorganismos porque el utilizado tiene menos efectos negativos para la salud humana. Además, tiene una variedad importante de especies peligrosas que las bacterias (e.g., levaduras y hongos) que se pueden aislar, conservar y manipular fácilmente [59,65]. Sin embargo, como muestra la Tabla 3, se han desarrollado pocos informes. Por lo tanto, aumentar la investigación de síntesis biogénica con microorganismos basada en hongos es una línea de investigación importante.

Se ha informado de que el mecanismo intracelular es un método interesante de síntesis de NPs, pero tiene desventajas importantes, como que la MO debe aislarse y purificarse debido a que la sal metálica interactúa directamente con la MO. La biomasa se prepara (e.g., el preinóculo) seleccionando las condiciones óptimas para el crecimiento del microorganismo (e.g., el agar apropiado). Por ejemplo, la selección del agar nutriente debe realizarse porque se debe utilizar un agar halófilo si se quiere aislar la actinobacteria *S. xinghaiensis* OF1 [66]. Además, si se quiere realizar una liberación selectiva de metabolitos a partir de la levadura *P. pastoris*, se utiliza un medio de complejo metanol tamponado con un 0,5% de metanol para promover la expresión de proteínas [67]. Por último, el mecanismo intracelular tiene un paso de purificación y liberación de las NPs de la célula (e.g., la calcinación), lo que aumenta el coste del método intracelular [50]. Por lo tanto, como muestra la Tabla 3, el mecanismo extracelular es el más reportado. Sin embargo, la mejora del proceso del mecanismo intracelular es una línea de investigación a desarrollar porque esto también podría ser una ventaja a pesar de las desventajas críticas, como la MO aislada. Después de todo, el escalado mediante la generación de un biorreactor utilizando una MO aislada ha sido profundamente reportado [68-70].

Los mecanismos extracelulares son más reportados que los intracelulares (ver Tabla 3) debido a los cortos tiempos de reacción y a la facilidad de los métodos [57]. Sin embargo, la metodología del extracto muestra una desventaja importante para la replicación porque pocos estudios describen la producción del extracto centrándose en la biomasa utilizada, como por ejemplo si se realiza para la preinoculación y las dosis de biomasa. La falta de información reduce el posible proceso de escalado y determina si utilizando el mismo método, pero con diferentes MOs se obtienen NPs similares.

Para la producción de extractos, la MO debe someterse a condiciones de estrés (e.g., cultivada en una solución libre de nutrientes) para inducir la formación de biomoléculas específicas y evitar la formación de otras [71-73]. Por ejemplo, un pH diferente activa las reductasas entre las enzimas oxidorreductasas [63]. Asimismo, un medio acuoso inerte (e.g., agua destilada) genera biomoléculas como lípidos al promover un estado de estrés en el microorganismo [54,61,63,66]. Además, se producen diferentes biomoléculas a diferentes concentraciones utilizando el mismo microorganismo porque cada uno tiene un metabolismo diferente [58,74]. Por lo tanto, debe realizarse un análisis de las biomoléculas producidas en las diferentes condiciones de estrés para identificar las biomoléculas (e.g., enzimas, proteínas, azúcares y carbohidratos) en el extracto. Sin embargo, pocos estudios han intentado cuantificar y correlacionar las biomoléculas producidas para la formación de nanopartículas sintetizadas biogénicamente, evitando determinar el mecanismo de producción para poder detectar las principales biomoléculas implicadas y, a partir de ahí, utilizar condiciones de estrés específicas para estandarizar la producción de NPs.

Tabla 3. Síntesis biogénica basada en microorganismos.

Metal	Microorganismo/Especie	Mecanismo	Condiciones de preinoculación	Condiciones para preparación de extracto	Referencia
Ag	Levadura / <i>R. glutinis</i>	Extracelular	MGYP T = 25° C t = 72h.	Agua destilada estéril [Biomasa] = 50 g L ⁻¹ T = 25° C t = 48 h	[65]
Ag	Levadura / <i>R. mucilaginosa</i>				
Ag	Levadura / <i>P. pastoris</i>	Extracelular	BMMY T = 28° C t = 48 h	Agua Milli-Q [Biomasa] = 4g L ⁻¹ pH = 9	[67]
Ag	Bacteria / <i>Pantoea stewartii</i> (H2)				
Ag	Bacteria / <i>Priestia aryabhatai</i> (H3)	Intracelular	Medio de cultivo anaeróbico T = 37° C t = 48 h 200 rpm	NA	[63]
Ag	Bacteria / <i>Pseudomonas indica</i> S. Azhar	Extracelular	Medio de cultivo T = 36° C t = 48 h 120 rpm	Agua destilada T = 34° C t = 24 h	[56]
Ag	Bacteria / <i>Pseudomonas putida</i> MVP2.	Extracelular	NA	LB T = 37° C t = 24 h 160 rpm	[60]
Ag	Bacteria / <i>P. aeruginosa</i>	Extracelular	NA	LB T = 37° C t = 24 h 130 rpm	[64]
Ag	Bacteria /	Extracelular	NA	MRS	[75]

	<i>L. pentosus</i> S6			T = 37° C t = 24 h	
	Bacteria / <i>L. crustorum</i> F11				
	Bacteria / <i>L. plantarum</i> F22				
	Bacteria / <i>L. paraplantarum</i> KM1				
Ag	Zeta / <i>Agaricus bisporus</i> (blanco)	Extracelular	NA	Agua destilada [Biomasa] = 10 g L ⁻¹ t = 24 h	[58]
	Zeta / <i>Agaricus bisporus</i> (café)				
Ag	Zeta / <i>G. lucidum</i>	Extracelular	NA	Agua Milli-Q [Biomasa]= 10 g L ⁻¹ T = 60° C t = 3 h	[68]
Ag	Hongo / <i>R. stolonifer</i>	Extracelular	MGYP T = 40° C t = 3 days 180rpm	Agua desionizada t = 72 h	[76]
Ag	Hongo / <i>T. ljubarskyi</i>	Extracelular	NA	Caldo de extracto de malta T = 32° C pH = 6.0 t = 5 dias 200 rpm	[77]
Ag ₂ O	Hongo / <i>G. enigmaticum</i>	Extracelular	NA	Agua desionizada	[53]

<i>Ulva lactuca</i>			[Biomasa]=10 g L ⁻¹ t=1 h	
Ag	Antinobacteria / <i>S. xinghaiensis</i> OF1	Extracelular	Caldo en nutrientes halófilos T = 27° C pH = 8.5 t = una semana 150 rpm	Agua destilada T = 27° C t = 48 h [66]
Au	Micro alga / <i>Halymania dilatata</i>	Extracelular	NA	Agua milli-Q [Biomasa]= 20 g L ⁻¹ T = 60° C t = 20 min [78]
Au	Levadura / <i>Magnusiomyces ingens</i> LH-F1	Intracelular	Medio aeróbico [Biomasa] = 2.2 g L ⁻¹ T = 30° C	NA [59]
CuO	Alga marina / <i>Ulva lactuca</i>	Extracelular	NA	Agua desionizada [Biomasa] = 60 g L ⁻¹ t=1 h [53]
CuO	Micro alga / <i>Anabaena cylindrica</i>	Extracelular	NA	Agua desionizada estéril [Biomasa] = 50 g L ⁻¹ T = 50° C t = 30 min [79]
MgO	Bacteria / <i>Actinomycetes</i>	Extracelular	MGYP T = 30° C t = 72 h	Agua desionizada estéril [Biomasa] = 200 g L ⁻¹ T = 30° C t = 72 h 150 rpm [71]
MgO	Bacteria /	Extracelular	NA	Caldo nutritivo [52]

	<i>B. paramycooides</i>			T = 35° C t = 48 h	
TiO ₂	Bacteria / <i>Bacillus subtilis</i> ATCC- 6633	Extracelular	NA	Caldo nutritivo T=28° C t=24 h 150 rpm	[62]
ZnO	Bacterial / <i>Shewanella sp.</i>	Intracelular	Medio de cultivo t=24h	NA	[61]
Ag-Cu	Alga marina / <i>Ulva lactuca</i>	Extracelular	NA	Agua desionizada [Biomasa]=10 g L ⁻¹ t =1 h	[53]

La Tabla 4 muestra las condiciones de síntesis de las NPs utilizando los diferentes mecanismos de MO (es decir, extra e intracelular). Se observa que se ha utilizado una amplia gama de condiciones experimentales; por ejemplo, la concentración del precursor (es decir, la sal metálica) oscila entre 0.1 y 10 mM, los tiempos de reacción entre 20 min y 168 h, y con o sin foto asistencia (es decir, bajo luz u oscuridad). A partir de esto, se genera que no se pueden determinar condiciones estrechas para producir una NP con propiedades específicas (e.g., tamaño de partícula y morfología), y se podría lograr una falta de método estandarizado para la síntesis biogénica con microorganismos.

En la Tabla 4, observamos el siguiente paso de la síntesis, que sería la adición de la sal metálica precursora, que, en interacción con las biomoléculas secretadas o la biomasa, permitirá una reacción ascendente para formar nanopartículas metálicas mediante procesos de oxidación/reducción. Para el mecanismo extracelular, la interacción entre las biomoléculas y el precursor es un efecto clave a identificar, ya que biomoléculas como enzimas, azúcares y carbohidratos contienen grupos químicos (e.g., grupos amino, sulfhídrico y carboxilo) que generan la formación y estabilización de las NPs [71] y otras reducen y generan agentes de recubrimiento para estabilizar las NPs (e.g., polifenoles y proteínas) [80]. Por ejemplo, Gudikandula et al. [77] informaron de una enzima específica dependiente del nitrato de α -NADPH en la síntesis in vitro como la principal biomolécula responsable de la formación de nanopartículas. Sin embargo, pocos informes identifican y cuantifican las biomoléculas, destacando el informe de Adeeyo & Odiyo [51], donde los autores utilizaron el proceso de mutagénesis (es decir, irradiación UV) durante un máximo de 14 días como condición de estrés en un cultivo en crecimiento activo del hongo *L. edodes* silvestre en una placa de PDA para promover la formación específica de exopolisacáridos (EPS). Los autores cuantificaron la cantidad de EPS e identificaron los diferentes EPS, como arabinosa (50.65%), manosa (19.20%), manitol (15.58%), fructosa (7.96%), trehalosa (6.49%), y otros (e.g., glucurónico, xilosa, galactosa y glucosa) en porcentajes bajos (≤ 0.11). Se confirmó que el EPS era el responsable de la formación de nanopartículas de plata, ya que sólo el EPS logró la formación óptima en los experimentos con y sin el proceso de mutagénesis. Por lo tanto, la identificación y cuantificación de biomoléculas es un experimento importante para entender en qué condiciones (e.g., cantidad y tipo de metabolito o biomolécula) se consigue la producción de NPs, principalmente para el proceso de escalado.

A pesar de las diferentes NPs producidas por procesos químicos, como muestra la Tabla 4, las nanopartículas de plata son las más reportadas para la síntesis biogénica con

microorganismos, lo que podría atribuirse a la gran cantidad de conocimiento y comprensión de este metal, ya que permite un seguimiento más fiable de la reacción mediante diferentes técnicas cuantitativas y casi todas las AgNPs han sido discutidas a fondo [81,82]. Sin embargo, se han desarrollado pocos informes para otras NPs metálicas (e.g., oro, cobre, zinc, puntos cuánticos, titanio y magnetita) y algunas NPs bimetálicas (e.g., Ag-Cu) [53], pero se informa de la falta de información sobre el mecanismo de síntesis, el proceso y las condiciones. Por lo tanto, aumentar la síntesis de NPs metálicas utilizando MO es una importante línea de investigación a desarrollar, así como las aplicaciones que éstas podrían tener (e.g., tratamiento de aguas).

Tabla 4. Síntesis de nanopartículas biogénicas a partir de microorganismos.

Metal	Microorganismo/Especie	Mecanismo	Condición de síntesis	Referencia
Ag	Levadura / <i>R. glutinis</i>	Extracelular	[AgNO ₃] = 1 mM 9:1 (V Ext./V Prec.) T = 25° C	[65]
	Levadura / <i>R. mucilaginosa</i>		t = 168 h	
Ag	Levadura / <i>P. pastoris</i>	Extracelular	[AgNO ₃] = 2 mM T = 80° C t = 120 min	[67]
Ag	Bacteria / <i>Pantoea stewartii</i> (H2)	Intracelular	[AgNO ₃] = 1 mM [Biomasa] = 20 g L ⁻¹ T = 60° C	[63]
	Bacteria / <i>Priestia aryabhatai</i> (H3)		pH = 10 Sin luz	
Ag	Bacteria / <i>Pseudomonas indica</i> S. Azhar	Extracelular	[AgNO ₃] = 1 mM Extracto = 100 mL T = 36° C t = 24 h 150 rpm Sin luz	[56]
Ag	Bacteria / <i>Pseudomonas putida</i> MVP2.	Extracelular	[AgNO ₃] = 1 mM t = 20 min	[60]
Ag	Bacteria / <i>P. aeruginosa</i>	Extracelular	[AgNO ₃] = 10 mM 2:1 (V Ext./V Prec.) T = 37° C t = 72 h Sin luz	[64]
Ag	Bacteria / <i>L. pentosus</i> S6	Extracelular	[AgNO ₃] = 0.1 mM	[75]
	Bacteria / <i>L. crustorum</i> F11		1:9 (V Ext./V Prec.) T = 37° C t = 72 h	

	Bacteria / <i>L. plantarum</i> F22		Sin luz	
	Bacteria / <i>L. paraplantarum</i> KM1			
Ag	Zeta / <i>Agaricus bisporus</i> (blanco)	Extracelular	[AgNO ₃] = 5 mM T = 24 h	[58]
Ag	Zeta / <i>Agaricus bisporus</i> (café)			
Ag	Zeta / <i>L. Edodes</i>	Extracelular	[AgNO ₃] = 1 mM [EPS] = 200 g L ⁻¹ 1:5 (V Ext./V Prec.) T=28° C t=24 h	[51]
Ag	Zeta / <i>G. lucidum</i>	Extracelular	[AgNO ₃] = 5 mM 1:1 (V Ext./V Prec.) T = 60° C t=24 h	[68]
Ag	Hongo / <i>R. stolonifer</i>	Extracelular	[AgNO ₃] = 1 mM T = 40° C t = 48 h 180 rpm	[76]
Ag	Hongo / <i>T. ljubarskyi</i>			
Ag	Hongo / <i>G. enigmaticum</i>	Extracelular	[AgNO ₃] = 1 mM 1:1 (V Ext./V Prec.) T = 32° C t = 12 h 200 rpm Sin luz	[77]
Ag ₂ O	Alga marina / <i>Ulva lactuca</i>	Extracelular	[AgNO ₃] = 1 mM 3:7 (V Ext./V Prec.) t = 10 min	[53]

Ag	Antinobacteria / <i>S. xinghaiensis</i> OF1	Extracelular	[AgNO ₃] = 1 mM t = 3 días	[66]
Au	Micro alga / <i>Halymania dilatata</i>	Extracelular	[HAuCl ₄] = 1 M T = 60° C t = 9 a 12 h	[78]
Au	Levadura / <i>Magnusiomyces ingens</i> LH-F1	Intracelular	[HAuCl ₄] = 1 mM [Biomasa] = 2.2 g L ⁻¹ T = 30° C t = 24 h	[59]
CuO	Alga marina / <i>Ulva lactuca</i>	Extracelular	[CuSO ₄] = 9 mM 3:7 (V Ext./V Prec.) [NaOH] = 0.2 M t = 2 h	[53]
CuO	Micro alga / <i>Anabaena cylindrica</i>	Extracelular	[CuSO ₄ *5H ₂ O] = 1 mM T = 60° C t = 24 h pH = 8.2 900 rpm	[79]
MgO	Bacteria / <i>Actinomycetes</i>	Extracelular	[Mg(NO ₃) ₂ 6H ₂ O] = 1 M 9:1 (V Ext./V Prec.) T = 80° C pH = 5 t = 24 h	[71]
MgO	Bacteria / <i>Bacillus paramycoides</i>	Extracelular	[MgSO ₄] = 4 mM 1:1 (V Ext./V Prec.) 0.2% isopropanol 0.2% Polivinilpirrolidona	[52]

TiO ₂	Bacteria / <i>Bacillus subtilis</i> ATCC-6633	Extracelular	[Ti(OH) ₂] = 0.025 M 8:2 (V _{Ext.} /V _{Prec.}) T= 60° C t = 20 min	[62]
ZnO	Bacteria / <i>Shewanella sp.</i>	Intracelular	[ZnSO ₄ ·7H ₂ O] = 10 mM t = 24 h 37 rpm	[61]
Ag-Cu	Alga marina / <i>Ulva lactuca</i>	Extracelular	[CuSO ₄]=9 mM [AgNO ₃]= 1 mM 4:6 (V _{Ext.} /V _{Prec.}) [NaOH]=0.2 M t = 2 h	[53]

2.2 Aplicación de las nanopartículas sintetizadas biogénicamente

2.2.1 Procesos de desinfección

Las NPs sintetizadas por métodos biogénicos han sido reportadas con alta eficiencia antimicrobiana (e.g., antibacteriana y antifúngica) a bajas concentraciones en comparación con agentes antibacterianos comerciales (e.g., antibióticos) debido al efecto sinérgico de las NPs y los compuestos orgánicos unidos a ellas (e.g., proteínas y polifenoles) [64,83,84]. Por lo tanto, se analizó el proceso de desinfección, pero se destacó que las principales aplicaciones reportadas son la actividad antibacteriana (Tabla 5) y fúngica (Tabla 6). Para ello, se muestra poca información sobre otros estudios de MO, como los virus [85], los cuales, tras la pandemia de COVID-19, la generación de nuevas tecnologías para su tratamiento es una importante línea de investigación a desarrollar.

Para la cuantificación de la eficiencia de eliminación bacteriana, se han descrito dos métodos para determinar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas: i) la zona de inhibición (ZOI) y ii) las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) y bactericidas (CBM) mediante el método estándar de microdilución en caldo [75]. Sin embargo, para generar datos que puedan mostrar una mejor actividad antibacteriana, se informa principalmente del método de microdilución, según el protocolo M27-A3 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [65] para obtener la CIM y la CBM. La CMI es la concentración mínima de nanopartículas necesaria para que no haya crecimiento bacteriano visible [41], mientras que la CBM es la concentración mínima de nanopartículas necesaria para inactivar o eliminar la mayoría de los inóculos de una cepa bacteriana específica [53]. Por lo tanto, la Tabla 5 muestra los informes en los que las NPs fueron sintetizadas por el método biogénico, y la eficiencia de desinfección fue reportada por MC y MBC. Sin embargo, se identificó que el uso de la ZOI fue principalmente en los que se utilizaron NPs por con plantas, mostrando que la aplicación de la desinfección utilizando NPs por plantas debe realizarse por el método de microdilución para comparar justamente con las NPs por MO y determinar el efecto del compuesto orgánico en la eficiencia de la desinfección [6,8,10,19,28,29,34,40,48,86,87].

Para la aplicación antibacteriana (Tabla 5), se destaca que las NPs metálicas más reportadas fueron las de plata, lo cual es de esperar porque se ha reportado que tienen una alta eficiencia antibacteriana a bajas concentraciones. Sin embargo, comparando con las Tablas de síntesis

(Tablas 1 a 4) y el profundo estudio sobre las NPs de plata (AgNPs), se destaca que las AgNPs fueron un modelo de NPs para demostrar si diferentes extractos de plantas y microorganismos podrían ser utilizados para la síntesis biogénica debido a la bien reportada y definida vía de producción, métodos de cuantificación y eficiencia del proceso de desinfección [81,82]. No obstante, deberían sintetizarse otras NPs metálicas de menor coste (e.g., Fe) para poder ampliar el proceso de desinfección, ya que, como se ha señalado, el efecto sinérgico de la materia orgánica y las NPs metálicas mejora las propiedades antimicrobianas [50,51].

El tamaño y la morfología de las nanopartículas influyen significativamente en su eficacia antibacteriana, por ejemplo, Mansoor et al. [62] observaron que las líneas celulares absorbían más fácilmente las NPs pequeñas de forma irregular que las grandes de forma esférica, mientras que Al-Dbass et al. [58] observaron que las NPs de forma triangular tendían a interactuar mejor con la membrana bacteriana que las NPs de forma esférica o de barra. No obstante, en el caso de las NPs producidas por el método biogénico, los componentes bioactivos derivados de la síntesis biogénica están implicados porque las NPs están recubiertas por las biomoléculas que poseen o mejoran las propiedades antibacterianas [29,48]. Como ejemplo, se observó en la Tabla 5 que las bacterias son más sensibles a las NPs sintetizadas utilizando microorganismos que a las que utilizan extracto de plantas, lo que demuestra que las biomoléculas de los microorganismos podrían tener una mayor interacción con las NPs para mejorar la actividad antibacteriana. Sin embargo, no existen informes que comparen cómo las diferentes biomoléculas (es decir, procedentes de plantas o de microorganismos) afectan a las propiedades antibacterianas por sinergismo o modificación del tamaño y la morfología, lo que sigue siendo una importante laguna por cubrir.

La Tabla 5 muestra que el método de síntesis biogénica más utilizado es el basado en microorganismos. El microorganismo utilizado no sólo afecta al tamaño y la morfología, sino también a las propiedades químicas, como la actividad antibacteriana, ya que, como informaron Tufail et al. [64], utilizando NPs de la misma bacteria (e.g., *P. aeruginosa* MN900691) la eficacia antibacteriana (es decir, MIC y MBC) es similar. Sin embargo, las NPs de diferentes MO (e.g., *P. aeruginosa* MN900691 y *E. coli* MT448673) modificaron la actividad antibacteriana, requiriendo una mayor o menor concentración de NPs. Por lo tanto, es preciso colmar una importante laguna de información identificando el efecto del agente biológico en los procesos de desinfección y el efecto sinérgico con las NPs. Asimismo, determinar los agentes biológicos que alcanzaron las mejores condiciones antibacterianas para estandarizar y escalar el proceso. Además, para la aplicación antibacteriana (Tabla 5), destaca que la mayoría de las bacterias modelo eran para la salud humana y patógenas para

las plantas debido al impacto en el nexo agua-alimentación. Sin embargo, para la desinfección, el modelo bacteriano debe seleccionarse por la composición química de la pared celular (es decir, las bacterias son grampositivas o gramnegativas) [71] porque las grampositivas tienen capas externas adicionales de lipopolisacáridos y peptidoglicanos que dificultan el paso de las nanopartículas a la membrana citoplasmática, lo que les permite resistir más daños. Por el contrario, los gramnegativos no tienen [18,68] generando una interacción eficiente de las NPs.

La Tabla 5 muestra que algunas nanopartículas son eficaces para bacterias gramnegativas y grampositivas porque algunos autores informaron de cargas superficiales opuestas entre la nanopartícula generada (producida por el material y el agente de recubrimiento) y la pared celular de las bacterias modelo, lo que a su vez permite una interacción óptima [16,25,71]. No obstante, existe un importante vacío de información sobre los mecanismos que implican la actividad antibacteriana de las nanopartículas sintetizadas biogénicamente, ya que se centran en la interacción de las NPs con las proteínas y las membranas celulares bacterianas [58]. Por ejemplo, la permeación de la pared celular, en la que las nanopartículas se unen a la superficie de las bacterias, normalmente por afinidad electrostática, lo que le permite alterar la permeabilidad de la membrana celular y finalmente atravesarla, provocando la muerte celular [16,25,29,39,66,71,77]; o las especies reactivas de oxígeno (ROS) por sus siglas en inglés producidas por las nanopartículas inducen estrés oxidativo y causan daños en la pared celular y los lípidos, al tiempo que afectan a la síntesis de ADN y proteínas y producen la apoptosis [48,58,64,65]. Por lo tanto, comprender la vía de desinfección de las NPs producidas mediante un método biogénico analizando el sinergismo de las NPs y los compuestos orgánicos (e.g., el núcleo) es una laguna que hay que cubrir.

Tabla 5. Actividad antibacteriana de nanopartículas sintetizadas biogénicamente.

Metal	Método de síntesis biogénica	Bacteria	Gram	MIC, mg mL ⁻¹	MBC, mg mL ⁻¹	Referencia
Ag	Microorganismo / <i>P. pastoris</i> spent medium	<i>B. cereus</i>	+	6	6	[67]
Ag	Microorganismo / <i>P. pastoris</i> spent medium	<i>E. coli</i> O157:H7	-	0.19	1.52	[67]
Ag	Microorganismo / <i>P. putida</i> MPV2	<i>P. aeruginosa</i>	-	7.5	9	[60]
Ag	Microorganismo / <i>P. putida</i> MPV2	<i>E. coli</i>	-	6.75	8	[60]
Ag	Microorganismo / <i>P. putida</i> MPV2	<i>S. aureus</i>	+	9	12.5	[60]
Ag	Microorganismo / <i>P. putida</i> MPV2	<i>B. cereus</i>	+	10.25	14	[60]
Ag	Microorganismo / <i>P. putida</i> MPV2	<i>H. pylori</i> J99	-	15	18.5	[60]
Ag	Microorganismo / <i>P. putida</i> MPV2	<i>H. pylori</i> NCTC 11673	-	25	25	[60]
Ag	Microorganismo / <i>P. putida</i> MPV2	<i>H. pylori</i> UM66	-	14.5	18	[60]
Ag	Microorganismo / <i>P. aeruginosa</i> MN900691	<i>P. aeruginosa</i> MN900691	-	3.6	4.3	[64]
Ag	Microorganismo / <i>P. aeruginosa</i> MN900691	<i>E. coli</i> MT448673	-	3.3	4.6	[64]

Ag	Microorganismo / <i>P. aeruginosa</i> MN900691	<i>B. subtilis</i> MN900684	+	3.3	4.6	[64]
Ag	Microorganismo/ <i>P. aeruginosa</i> MN900691	<i>B. licheniformis</i> MN900686	+	2.6	4.6	[64]
Ag	Microorganismo / <i>E. coli</i> MT448673	<i>P. aeruginosa</i> MN900691	-	6	7	[64]
Ag	Microorganismo / <i>E. coli</i> MT448673	<i>E. coli</i> MT448673	-	8.6	11.6	[64]
Ag	Microorganismo/ <i>E. coli</i> MT448673	<i>B. subtilis</i> MN900684	+	6	10.3	[64]
Ag	Microorganismo/ <i>E. coli</i> MT448673	<i>B. licheniformis</i> MN900686	+	6.7	8.3	[64]
Ag	Microorganismo / <i>B. subtilis</i> MN900684	<i>P. aeruginosa</i> MN900691	-	6.3	6.6	[64]
Ag	Microorganismo / <i>B. subtilis</i> MN900684	<i>E. coli</i> MT448673	-	5.6	6.3	[64]
Ag	Microorganismo / <i>B. subtilis</i> MN900684	<i>B. subtilis</i> MN900684	+	4.6	5.6	[64]
Ag	Microorganismo / <i>B. subtilis</i> MN900684	<i>B. licheniformis</i> MN900686	+	5.6	6.6	[64]

Ag	Microorganismo / <i>B. licheniformis</i> MN900686	<i>P. aeruginosa</i> MN900691	-	7.7	8.7	[64]
Ag	Microorganismo / <i>B. licheniformis</i> MN900686	<i>E. coli</i> MT448673	-	6	7.3	[64]
Ag	Microorganismo / <i>B. licheniformis</i> MN900686	<i>B. subtilis</i> MN900684	+	5.4	6.5	[64]
Ag	Microorganismo / <i>B. licheniformis</i> MN900686	<i>B. licheniformis</i> MN900686	+	4.7	5.6	[64]
Ag	Microorganismo / <i>G. lucidum</i>	<i>S. aureus</i>	+	>1,000	>1,000	[68]
Ag	Microorganismo / <i>G. lucidum</i>	<i>B. cereus</i>	+	250	500	[68]
Ag	Microorganismo / <i>G. lucidum</i>	<i>E. coli</i>	-	250	1,000	[68]
Ag	Microorganismo / <i>G. lucidum</i>	<i>P. aeruginosa</i>	-	500	<500	[68]
Ag	Microorganismo / <i>S. xinghaiensis</i> OF1	<i>E. coli</i> ATCC 8739	-	64	64	[66]
Ag	Microorganismo / <i>S. xinghaiensis</i> OF1	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	-	256	256	[66]
Ag	Microorganismo / <i>S. xinghaiensis</i> OF1	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	-	16	32	[66]

Ag	Microorganismo / <i>S. xinghaiensis</i> OF1	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	+	256	384	[66]
Ag	Microorganismo / <i>S. xinghaiensis</i> OF1	<i>B. subtilis</i> PCM 2021	+	64	64	[66]
Ag	Planta / <i>F. assafoetida</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	10	10	[25]
Ag	Planta / <i>F. assafoetida</i>	<i>E. faecalis</i> ATCC 25922	+	50	50	[25]
Ag	Planta / <i>F. assafoetida</i>	<i>E. coli</i> ATCC 11700	-	50	100	[25]
Ag	Planta / <i>F. assafoetida</i>	<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311	-	10	100	[25]
Ag ₂ O	Microorganismo / <i>U. lactuca</i>	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	+	0.062	0.125	[53]
Ag ₂ O	Microorganismo / <i>U. Lactuca</i>	<i>L. acidophilus</i> CH-2	+	0.062	0.125	[53]
Ag ₂ O	Microorganismo / <i>U. Lactuca</i>	<i>S. aureus</i> ATCC6538	+	0.5	0.25	[53]
Ag ₂ O	Microorganismo / <i>U. Lactuca</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	0.25	0.25	[53]
Ag ₂ O	Microorganismo / <i>U. Lactuca</i>	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	+	0.125	0.125	[53]
Ag ₂ O	Microorganismo / <i>U. Lactuca</i>	<i>K. pneumoniae</i> KY856924	-	0.5	0.5	[53]
Ag ₂ O	Microorganismo/ <i>U. Lactuca</i>	<i>Acinetobacter</i> KY856930	-	1	1	[53]
Ag ₂ O	Microorganismo / <i>U. Lactuca</i>	<i>E. coli</i> KY856932	-	0.5	0.5	[53]

Ag ₂ O	Microorganismo/ <i>U. Lactuca</i>	<i>E. coli</i> KY856933	-	0.062	0.125	[53]
Ag ₂ O	Microorganismo / <i>U. Lactuca</i>	<i>Enterobacter</i> KY856934	-	0.062	0.125	[53]
Ag ₂ O	Microorganismo / <i>U. lactuca</i>	<i>E. aerogenes</i>	-	0.5	1	[53]
Au	Planta / <i>A. nigra</i>	<i>B. subtilis</i>	+	350	600	[18]
Au	Planta / <i>A. nigra</i>	<i>E. coli</i>	-	300	400	[18]
CuO	Microorganismo / <i>U. Lactuca</i>	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	+	0.25	0.5	[53]
CuO	Microorganismo/ <i>U. Lactuca</i>	<i>L. acidophilus</i> CH-2	+	0.25	-	[53]
CuO	Microorganismo / <i>U. Lactuca</i>	<i>S. aureus</i> ATCC6538	+	0.25	-	[53]
CuO	Microorganismo/ <i>U. Lactuca</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	0.25	-	[53]
CuO	Microorganismo / <i>U. Lactuca</i>	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	+	0.25	-	[53]
CuO	Microorganismo / <i>U. Lactuca</i>	<i>K. pneumoniae</i> KY856924	-	0.25	-	[53]
CuO	Microorganismo/ <i>U. Lactuca</i>	<i>Acinetobacter</i> KY856930	-	0.25	-	[53]
CuO	Microorganismo / <i>U. Lactuca</i>	<i>E. coli</i> KY856932	-	0.25	-	[53]
CuO	Microorganismo / <i>U. lactuca</i>	<i>E. coli</i> KY856933	-	0.25	0.25	[53]
CuO	Microorganismo / <i>U. Lactuca</i>	<i>Enterobacter</i> KY856934	-	0.25	-	[53]
CuO	Microorganismo / <i>U. lactuca</i>	<i>E. aerogenes</i>	-	0.25	-	[53]

CuO	Microorganismo / <i>A. cylindrica</i>	<i>E. coli</i>	-	20	40	[79]
MgO	Microorganismo/ <i>Actinomycetes</i>	<i>E. coli</i>	-	25	50	[71]
MgO	Microorganismo / <i>Actinomycetes</i>	<i>P. vulgaris</i>	-	20	55	[71]
MgO	Microorganismo / <i>Actinomycetes</i>	<i>S. typhimorium</i>	-	25	50	[71]
MgO	Microorganismo / <i>Actinomycetes</i>	<i>S. flexneri</i>	-	24	40	[71]
MgO	Microorganismo / <i>Actinomycetes</i>	<i>K. pneumonia</i>	-	20	45	[71]
MgO	Microorganismo / <i>Actinomycetes</i>	<i>S. aureus</i>	+	15	35	[71]
MgO	Microorganismo / <i>Actinomycetes</i>	<i>S. pneumonia</i>	+	40	50	[71]
MgO	Microorganismo / <i>Actinomycetes</i>	<i>B. cereus</i>	+	25	45	[71]
ZnO	Planta / <i>N. sativa</i>	<i>L. monocytogenes</i>	+	512	-	[41]
ZnO	Planta / <i>N. sativa</i>	<i>E. coli</i>	-	256	-	[41]
Ag-CuO	Microorganismo / <i>A. cylindrica</i>	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	+	0.25	0.5	[53]
Ag-CuO	Microorganismo / <i>A. cylindrica</i>	<i>L. acidophilus</i> CH-2	+	0.25	0.25	[53]
Ag-CuO	Microorganismo / <i>A. cylindrica</i>	<i>S. aureus</i> ATCC6538	+	0.25	-	[53]
Ag-CuO	Microorganismo / <i>A. cylindrica</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	0.125	0.5	[53]
Ag-CuO	Microorganismo / <i>A. cylindrica</i>	<i>S. epidermidis</i>	+	0.125	-	[53]

Ag-CuO	Microorganismo / <i>A. cylindrica</i>	<i>K. pneumoniae</i>	-	0.25	-	[53]
Ag-CuO	Microorganismo / <i>A. cylindrica</i>	<i>Acinetobacter</i>	-	0.25	-	[53]
Ag-CuO	Microorganismo / <i>A. cylindrica</i>	<i>E. coli</i> KY856932	-	0.125	0.25	[53]
Ag-CuO	Microorganismo / <i>A. cylindrica</i>	<i>E. coli</i> KY856934	-	0.25	-	[53]
Ag-CuO	Microorganismo / <i>A. cylindrica</i>	<i>Enterobacter</i>	-	0.25	-	[53]
Ag-CuO	Microorganismo / <i>A. cylindrica</i>	<i>E. aerogenes</i>	-	0.25	-	[53]
Ag-ZnO	Planta / <i>C. monogyna</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	200	200	[88]
Ag-ZnO	Planta / <i>C. monogyna</i>	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 9997	-	50	100	[88]
Ag-ZnO	Planta / <i>C. monogyna</i>	<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	-	12.5	50	[88]
Ag-ZnO	Planta / <i>C. monogyna</i>	<i>P. vulgaris</i> ATCC 6380	-	50	100	[88]
Ag-ZnO	Planta / <i>C. monogyna</i>	<i>S. mitis</i> ATCC 6249	+	12.5	25	[88]
Ag-ZnO	Planta / <i>C. monogyna</i>	<i>S. salivarius</i> ATCC 1448	+	100	200	[88]
Ag-ZnO	Planta / <i>C. monogyna</i>	<i>S. faecalis</i> ATCC 15753	+	12.5	50	[88]
Ag-ZnO	Planta / <i>C. monogyna</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 16538	+	200	400	[88]

La Tabla 6 muestra los informes de actividad antifúngica. Se observa que se ha notificado una amplia variedad de hongos. Sin embargo, los más notificados fueron *Aspergillus spp* y *Candida spp* porque *Candida spp* suelen ser levaduras inofensivas que se encuentran en la microbiota humano, pero desarrollan resistencia a los tratamientos antifúngicos convencionales (e.g., fluconazol voriconazol) [89-91]; mientras que *Aspergillus spp* son hongos patógenos filamentosos [90,92]. No obstante, deben utilizarse informes que incluyan otros hongos patógenos de plantas, animales y humanos (e.g., *R. microsporus*, *P. aphanidermatum*, *M. racemosus*, *S. racemosum* y *P. crustosum*) para identificar la posible resistencia de los hongos al tratamiento de desinfección con NPs. También, a pesar del mismo informe que utilizó diferentes hongos con las mismas NPs [19,29], tal como fue reportado por Alowaiesh [19], donde los autores sintetizaron nanopartículas de Ag utilizando extracto de Oliva y probaron varias cepas fúngicas. La zona de inhibición (ZOI) más baja se mostró contra *C. glabrata* (es decir, levadura), mientras que la mayor se observó contra *A. flavus* (es decir, hongos filamentosos); ninguno realizó un análisis que describiera el efecto de las NPs sobre los distintos hongos, lo cual es relevante porque tienen morfología, metabolismo y reproducción diversos, lo que los hace más o menos resistentes a los antibióticos [93-95]. Por ejemplo, los hongos filamentosos son hongos multicelulares con estructuras visibles, lo que les permite cubrir grandes áreas y descomponer la materia orgánica rápidamente o infectar las plantas durante la cosecha y post-cosecha de frutos, generando que, aunque el antibiótico pueda atacar efectivamente a los hongos filamentosos, estos poseen diversos mecanismos de defensa que reducen su eficacia [94,96]. A su vez, las levaduras son hongos unicelulares que se reproducen por división celular y sólo son capaces de crecer en lugares con nutrientes disponibles en solución, lo que constituye un mecanismo más efectivo contra los antibióticos en comparación con otros hongos y actualmente representa un desafío clínico, principalmente debido a su adaptabilidad genética y mutaciones [97-99].

La Tabla 6 muestra que, a pesar de varios experimentos, estos son de pocos reportes resaltando un vacío crítico de información sobre aplicaciones de desinfección de hongos. Por ejemplo, se utilizaron las NPs metálicas porque, como muestra la Tabla 6, destaca que sólo se informó de Au, Fe y Ag, evitando otros metales con propiedades desinfectantes, como Cu y Zn. Por lo tanto, las NPs metálicas y de óxidos metálicos deben ser sintetizadas utilizando un método biogénico y aplicadas para la actividad antifúngica para llenar el vacío. Además, a partir de las NPs ya reportadas, se muestra que no se pudo realizar una comparación justa debido a que se realizaron diferentes procesos de síntesis para generarla. Por ejemplo, se ha informado de que la actividad antifúngica óptima está relacionada con el tamaño de las NPs debido a que las nanopartículas de menor tamaño permiten una mejor interacción con la

membrana celular [37,75]. Además, los procesos de síntesis modificaron las propiedades químicas, como el recubrimiento biológico que mejoró la unión entre las proteínas y la membrana celular [87,100] o aumentó la eficacia antimicrobiana de las nanopartículas [29]. Por lo tanto, el mecanismo de la actividad antifúngica de las nanopartículas sintetizadas biogénicamente es una laguna importante que hay que cubrir porque, como se ha descrito, las teorías propuestas tienden a parecerse a las de la actividad antibacteriana de las nanopartículas (e.g., penetración en la membrana celular, producción de ROS) [65,75,87] o los autores atribuyen la actividad antimicrobiana a la capacidad de las nanopartículas para interferir en la bomba proteica de células fúngicas específicas [18,56].

Tabla 6. Actividad antifúngica de nanopartículas sintetizadas biogénicamente.

Metal	Método de síntesis biogénica	Hongo	[NP], $\mu\text{g mL}^{-1}$	ZOI, mm	Referencia
Ag	Microorganismo/ <i>P. indica</i>	<i>R. microsporus</i>	400	38	[56]
Ag	Microorganismo/ <i>P. indica</i>	<i>M. racemosus</i>	400	19	[56]
Ag	Microorganismo/ <i>P. indica</i>	<i>S. racemosum</i>	400	24	[56]
Ag	Planta/ Olive	<i>C. rugosa</i>	100	31	[19]
Ag	Planta/ Olive	<i>C. albicans</i>	100	31	[19]
Ag	Planta/ Olive	<i>P. crustosum</i>	100	35	[19]
Ag	Planta / Olive	<i>A. flavus</i>	100	34	[19]
Ag	Planta / Olive	<i>C. glabrata</i>	100	26	[19]
Ag	Planta / Olive	<i>A. niger</i>	100	30	[19]
Au	Planta / <i>J. auriculatum</i>	<i>A. fumigatus</i>	100	4	[29]
Au	Planta / <i>J. auriculatum</i>	<i>C. albicans</i>	100	4	[29]
Au	Planta / <i>J. auriculatum</i>	<i>T. viride</i>	100	5	[29]
Au	Planta / <i>J. auriculatum</i>	<i>L. lecanii</i>	100	5	[29]
Iron oxide	Planta / <i>P. guajava</i>	<i>C. tropicalis</i>	50,000	15	[87]
Iron oxide	Planta / <i>P. guajava</i>	<i>C. albicans</i>	50,000	13	[87]
Fe ₃ O ₄	Planta / <i>E. herita</i>	<i>A. fumigatus</i>	30,000	21.67	[100]
Fe ₃ O ₄	Planta / <i>E. herita</i>	<i>A. niger</i>	30,000	18.67	[100]
Fe ₃ O ₄	Planta / <i>E. herita</i>	<i>Arthographis cuboidea</i>	30,000	25.33	[100]

α -Fe ₂ O ₃ y γ -Fe ₂ O ₃	Planta / <i>P. orientalis</i>	<i>M. piriformis</i>	100	26	[37]
α -Fe ₂ O ₃ y γ -Fe ₂ O ₃	Planta / <i>P. orientalis</i>	<i>A. niger</i>	100	16	[37]

3 Metodología de Investigación

3.1 Aislamiento y purificación del hongo fitopatógenos

A partir de un trozo fruto enfermo de yaca (*Artocarpus heterophyllus*), carambolo (*Averrhoa carambola*), tomate roma (*Solanum lycopersicum* 'Roma') y mango Manila (*Mangifera indica*) se aislaron diferentes hongos en agar papa-dextrosa (PDA) con antibiótico (amperamida) para evitar la contaminación por bacterias y se incubo a temperatura ambiente ($28 \pm 1^\circ \text{C}$). Para su purificación se hizo un seguimiento con microscopio Labomed Lx-400 y se realizaron resiembras cada tercer día hasta observar una cepa pura. El hongo aislado se almaceno a -40°C con glicerol al 10% para mantener la pureza.

3.2 Preparación de extracto de hongo

Se prepararon los extractos en tubos con tapa Falcon de 50 mL estériles con 45 mL de agua destilada estéril y se saturaron con cada hongo (biomasa), para ello se raspo la superficie del agar sin romper el mismo para logar extraer la máxima cantidad de biomasa pura y se dejó en agitación a 120 rpm de 2 a 96 h. Por último, se filtraron con membrana milipore de 0.45 μm y equipo de filtración con bomba de vacío en condiciones estériles conservando el sobrenadante. La biomasa recolectada durante la filtración se utilizó para la cuantificación de peso seco. El filtrado resultante se almaceno a 4°C .

3.3 Síntesis de nanopartículas de plata

Para la síntesis de AgNPs, al extracto de hongo (sobrenadante) se le añadió nitrato de plata (AgNO_3) a una concentración final de 1 mM y se dejó en agitación a 120 rpm a temperatura ambiente ($28 \pm 1^\circ \text{C}$) durante un máximo 24 h, o hasta que se presentó un cambio de color visible. Una vez terminada la síntesis se almaceno la solución a 4°C .

3.4 Pruebas de desinfección

Para determinar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata sintetizadas se utilizó la técnica de microdiluciones para determinar el MIC, según el protocolo M27-A3 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [65] utilizando de bacteria modelo gram negativa *E. coli* ATCC 8739 y bacteria modelo gram positiva *S. aureus* ATCC 6538 incubada por 4 o 5 horas en caldo nutritivo. Para ello, en una microplaca de 96 pocillos se realizaron columnas diluciones seriadas de cada muestra añadiendo en los pozos de la columna número uno 200 μ L de cada solución con AgNPs por triplicado, desde la columna dos hasta la columna diez se diluyó cada solución con AgNPs con caldo nutritivo con un factor de dilución de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 y 512, respectivamente, la columna once y doce se utilizaron para controles negativo y positivo de la prueba. Por último, se añadieron 100 μ L de inóculo bacteriano y se añadió a los pozos desde la columna uno hasta la columna once. Las microplacas se incubaron por 24° C y se determinó la actividad antimicrobiana según la turbidez de cada dilución en comparación con los controles negativos y positivos.

3.5 Caracterización

3.5.1 Cinética de crecimiento y reproducción de biomasa del hongo *R. stolonifer*

Se realizó la curva de cinética de crecimiento y producción de biomasa del hongo *Rhizopus Stolonifer* para reportar el aumento de la biomasa respecto al tiempo. Para ello, se realizó la cinética de crecimiento mediante el aumento de diámetro cada 24 h hasta alcanzar el máximo de diámetro de la caja Petri. Para la producción de biomasa se utilizó la técnica de peso seco, donde se recolectó una muestra de hongo en papel filtro en diferentes días de crecimiento y se dejaron secar a 100° C por 24 h. Los experimentos se hicieron por cuadruplicado. Por otra parte, se realizó la misma técnica de peso seco para cuantificar la biomasa recolectada después de la preparación del extracto del hongo con 3 y 11 días de crecimiento.

3.5.2 Cuantificación de proteínas de los extractos de hongo por el método de Kjeldahl Gunnig-Arnold

Se utilizó 1 ml de muestra por duplicado en matraces Kjeldahl. En los matraces con la muestra se añadió 0.1 g de sulfato cúprico, 2.5 g de sulfato de potasio y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. El matraz se colocó en el digestor Kjeldahl y se calentó hasta que presentó un cambio de color a verde y posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Una vez que las muestras estuvieron a temperatura ambiente, se agregaron 200 mL de agua destilada, 25 mL de NaOH al 40% y 5 mL de sulfuro de sodio al 10%. Posteriormente, se conectó al sistema de destilación del digestor Kjeldahl, junto con un matraz Erlenmeyer de 400 mL con 75 mL de ácido bórico al 4%. A la solución se le agregaron tres gotas del indicador rojo de metilo y se dejó destilar hasta que la solución cambiará de color morado a verde. Por último, se tituló el destilado contenido en el matraz con una solución de HCl a 0.1 N hasta que hubo un cambio de color de verde a morado.

3.5.3 Cuantificación de Demanda Química de Oxígeno (DQO) de los extractos de hongo

Se utilizó 2.5 mL de muestra por duplicado en tubos de ensayo de 10 mL y se incluye una muestra de agua destilada estéril como blanco. Se añadió en cada tubo 3.5 mL de solución ácida y 1.5 mL de solución digestora de rango alto, se cerraron todos los tubos y se agitaron. Se colocaron todos los tubos con muestra incluyendo el blanco en el reactor a 150°C por dos horas. Pasadas las dos horas, se dejó enfriar la muestra y se midió la absorción en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

3.5.4 Cuantificación de proteínas de los extractos de hongo con el método Bradford

Se cuantificó con el método Bradford con algunas modificaciones. Se toman 10 μ L de muestra mezclado con 200 μ L de solución Bradford 1:4, la detección de proteínas se mide

en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm y se utiliza como curva de calibración la proteína Albúmina de suero bovino (BSA).

3.5.5 Cuantificación de polifenoles de los extractos de hongo con el método Folin-Ciocalteu

Se utilizó el método Folin-Ciocalteu con algunas modificaciones. Se tomaron 3 μL de cada extracto mezclado y se adicionan 237 μL de agua destilada, 15 μL del reactivo de Folin al 10% y finalmente 45 μL de carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 15%. La detección de polifenoles se mide en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm y se utiliza como curva de calibración un compuesto fenólico simple como lo es el ácido gálico.

3.5.6 Caracterización de los extractos de hongo y seguimiento de la producción biogénica de AgNPs por espectroscopia IR

Se caracterizaron los extractos antes y después de la adición de AgNO_3 , para ello, se liofilizaron 3 mL de cada muestra para la obtener de un polvo fino, los cuales se caracterizaron mediante espectroscopia de infrarrojo codificado por transformada de Fourier (FT-IR) en un equipo Thermo Scientific, NICOLET IS10. Los espectros fueron adquiridos empleando la técnica de atenuación total de reflexión (ATR) con 16 barridos y una resolución de 2 cm^{-1} . Por otra parte, se le dio seguimiento a la producción de AgNPs mediante un barrido de absorción (200 a 700 nm) utilizando un espectrofotómetro ultravioleta-visible (Thermo scientific, evolution 300 UV-vis). Se tomaron 3 mL de muestra en celdas de cuarzo previamente esterilizadas con una solución de etanol al 70 % de todos los extractos antes y después de 24 h de la adición de AgNO_3 .

3.5.7 Análisis estadístico de correlación

Una vez obtenidos los resultados de la cuantificación de proteínas y polifenoles de los extractos preparados y los resultados del seguimiento a la síntesis de AgNPs, se utilizó un análisis de correlación Pearson lineal y un análisis de correlación Spearman no paramétrico con el objetivo de buscar si existe una relación entre las proteínas y polifenoles de los extractos, dicho análisis se realizó en el programa STATGRAPHICS. Posteriormente, para comprobar los resultados del análisis de correlación se prepararon diez extractos más utilizando siete y tres hongos con tres y once días de crecimiento respectivamente en tubos Falcon de 50 mL estériles con 45 mL de agua destilada estéril y se saturaron con el hongo *R. Stolonifer* como se describe previamente y se dejaron en agitación a 120 rpm de 30 min a 46 h. Transcurridos los primeros 30 min se tomaron 8 mL del sobrenadante con jeringa estéril y se filtró con filtro milipore de 0.45 μm para jeringa y se almacenó en tubos con tapa de 5 mL a 4° C, se tomaron muestras de la misma manera a las 20, 24, 27 y 46 h. Los filtrados se almacenaron a 4° C.

3.5.8 Caracterización de morfología, tamaño y composición de las AgNPs biogénicamente sintetizadas

La composición elemental de las AgNPs se determinó mediante microscopía electrónica en un equipo JEOL para microanálisis JSM-7610F operando con un voltaje de 2kV y un espectro de energía dispersiva de rayos X (EDS) acoplado. Mientras que la morfología y tamaño se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM Hitachi 7700, Tokio, Japón) operada a 100 kV. Las muestras analizadas fueron dispersadas en agua en la superficie de una rejilla de cobre con soporte de carbono formvar lacey, tamaño de malla 200, usando escalas de 100, 50 y 20 nm.

4 Resultados

4.1 Aislamiento y purificación de hongos

El hongo *Aspergillus spp.* (figura 1.a) se aisló de un fruto infectado de tomate roma (*Solanum lycopersicum* 'Roma'), el hongo *Penicillium spp.* (figura 1.b) se aisló de un carambolo enfermo (*Averrhoa carambola*). Ambos hongos fueron caracterizados por su morfología macroscópica y microscópica característica. Por últimos a partir del fruto infectado de yaca (*Artocarpus heterophyllus*) (Figura 1.a) se aisló el hongo *R. Stolonifer* (figura 1.d) el hongo fitopatógeno de la familia del *Rhizopus* fue identificado por Contreras et al., (2022) [101]. Por otra parte, se consiguió del cerapio de hongos del Instituto Tecnológico de Tepic el hongo *P. italicum* (figura 1.c). Todos los hongos fueron incubados en agar papa-dextrosa a 25°C, con un crecimiento de 5-7 días en promedio para cubrir toda el área de la placa Petri.

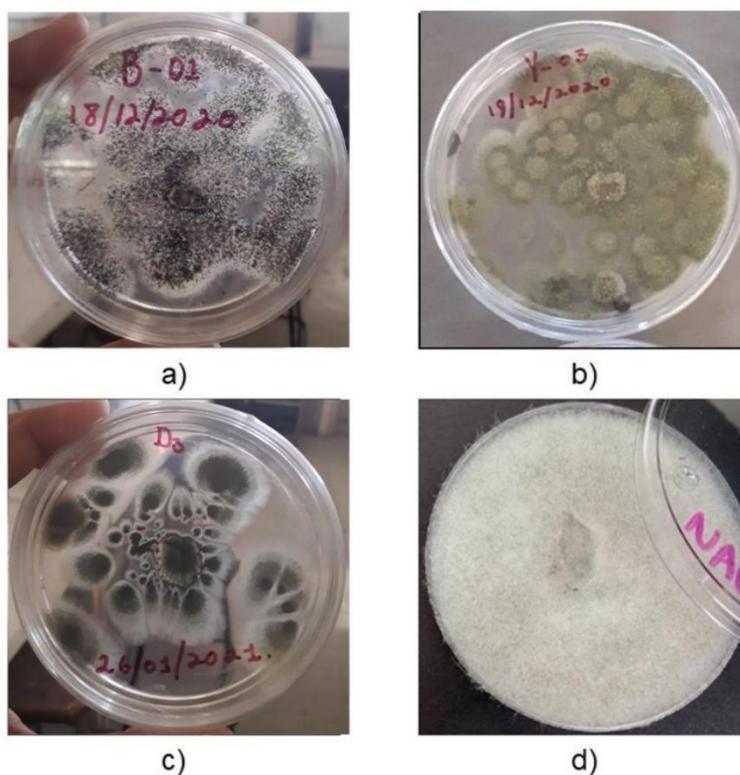


Figura 1. Cultivos purificados de hongos aislados de frutos enfermos; a) *Aspergillus spp.*, b) *Penicillium spp.*, c) *P. italicum* y d) *R. Stolonifer*.

4.2 Pruebas preliminares con los diferentes hongos

Con el objetivo de seleccionar un extracto de hongo adecuado para la formación de nanopartículas de plata (AgNPs), se prepararon 200 mL de extracto de cada hongo, siguiendo la metodología descrita para la preparación de extractos, y se sometieron a agitación constante durante 72 horas. Posteriormente, se tomaron muestras de los extractos para la cuantificación de la demanda química de oxígeno (DQO) y proteínas. Al volumen restante de cada extracto se le añadió una solución de AgNO_3 con una concentración de 3 mM, dejándolo en reposo en condiciones de oscuridad por 48 horas, con el fin de observar un cambio de color característico de la formación de AgNPs, que indicaría un tono naranja.

Los resultados preliminares se presentan en la Tabla 7. En cuanto al DQO, se observó una similitud entre los extractos, con la excepción del hongo *Rhizopus stolonifer*, donde podemos atribuir una baja producción de biomasa en comparación con los demás hongos para explicar esta diferencia. Sin embargo, en términos de contenido de proteínas, *Penicillium italicum* presentó el valor más bajo (0.10%), mientras que el extracto de *R. stolonifer* registró un 0.28% similar a la mayoría, lo que podría estar parcialmente relacionado con la actividad enzimática y otras actividades metabólicas relacionadas con las condiciones aplicadas.

Tabla 7. Resultados de las pruebas preliminares para la formación de AgNPs biogénicamente sinterizadas con diferentes extractos de hongo.

Hongo	Tiempo de agitación, h	DQO, $\text{mgO}_2 \text{ L}^{-1}$	Proteínas, %	Respuesta a la biosíntesis de AgNPs
<i>Aspergillus spp.</i>		173,600	0.26	Ligero cambio de color a amarillo
<i>Penicillium spp.</i> , <i>P. italicum</i>	72	185,266.67 205,600	0.25 0.10	Ligero cambio de color a amarillo Sin cambios
<i>R. Stolonifer</i>		58,933.33	0.28	Cambio de color a naranja

Al proceder con la síntesis de AgNPs, no todos los hongos mostraron ser efectivos. Los extractos de *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* presentaron un ligero cambio de color, mientras que *R. stolonifer* mostró el cambio de color más intenso, lo que se puede atribuir a la formación de AgNPs. Este comportamiento indica que los extractos de *R. stolonifer* son los más eficientes para la formación de AgNPs utilizando una metodología simple y bajo

condiciones ambientales. Por lo que, se seleccionó el hongo *R. stolonifer* para continuar trabajando la síntesis de nanopartículas de plata.

4.3 Cinética de crecimiento y producción de biomasa del hongo *R. stolonifer*

Una vez seleccionado el hongo se realizó una cinética de crecimiento del hongo y se determinó por medio de dos experimentos, en el primero se cuantificó el crecimiento radial del hongo en caja de Petri. Para ello, primero se midió el diámetro de la muestra cultivada, es decir, se determinó un diámetro inicial conocido para posteriormente observar el aumento del diámetro. Se alcanzó el máximo del diámetro en dos días debido al crecimiento radial de las hifas. Como segundo método para la determinación de cinética de crecimiento, se realizó la cinética de biomasa (Tabla S1 y figura 2). En la Tabla S1 y la figura 2 se muestra un comportamiento no lineal con respecto del tiempo, resaltando que el máximo de biomasa registrado fue en el día tres con 0.180 g; posteriormente la cantidad de biomasa osciló entre 0.10 y 0.17 g aproximadamente, esto se atribuye a que el hongo crece en una superficie finita por lo que tiene un punto máximo de crecimiento y producción de biomasa.

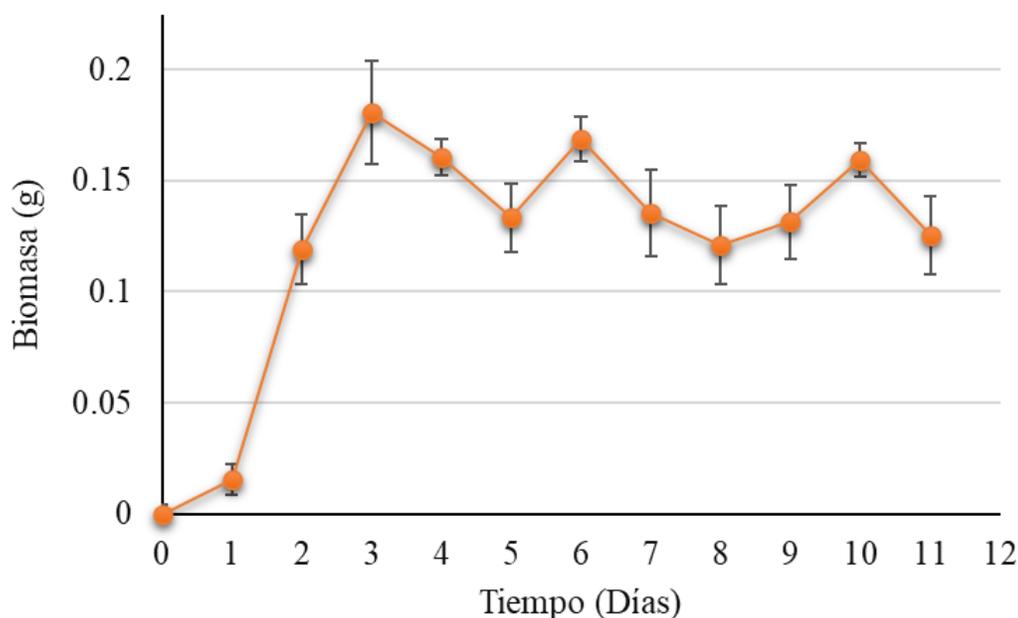


Figura 2. Cinética de producción de biomasa del hongo *R. stolonifer* cultivado en PDA.

La biomasa obtenida del día tres se relaciona con la aparición de los esporangios, conocidos por ser las partes portadoras de esporas para su reproducción lo que marca el inicio de la fase crecimiento exponencial, mostrando un máximo de biomasa correspondiente a un rápido crecimiento y expansión micelial, por lo tanto después del día tres se puede asumir que empieza la producción de esporas representando otra fase de crecimiento, además en la figura 2 se puede observar cómo hay días de producción de biomasa que presentan una gran barra de erros, este tipo de comportamiento se atribuye principalmente a la reacción del hongo como individuo a las condiciones y medios de incubación así como a su fase de crecimiento. Además, si consideramos que la fase exponencial de un hongo filamentoso suele durar desde el día tres hasta el día cinco, y se considera que de los días seis al once el hongo está en su fase estacionaria, se puede relacionar a lo observado desde el día siete hasta el día once donde se observó un polvo negro fino presente en la superficie correspondiente a la madurez o saturación de los esporangios que suelen romperse liberando las esporas en forma de un polvo negro. A partir de lo anteriormente descrito, para la preparación de extractos se seleccionó el hongo del día tres y el día once que corresponden al inicio de la fase exponencial, lo que significa que tanto la estructura y morfología esta casi completa; mientras que el día 11, al ser el último día de la fase estacionaria, la biomasa contiene los esporangios que están llenos de esporas, lo que permitirá evaluar dos variables, la madurez del hongo y la influencia de la esporas en la producción de AgNPs así como su reacción a las condiciones de estrés para la preparación de los extractos. Es decir, podemos indagar en si existe diferencias entre la presencia y ausencia de esporas en la preparación de extractos, así como la edad del hongo y si este tiene alguna relevancia para la óptima formación de AgNPs.

4.3.1 Caracterización por infrarrojo de los extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento

Todos los extractos de hongos preparados fueron caracterizados para la identificación de biomoléculas mediante métodos espectroscópicos UV-Vis y FT-IR, Todas las muestras analizadas se mantuvieron en estado líquido, excepto para el análisis por espectrofotometría de FT-IR, para el cual se requirió separar 3 mL del extracto y someterlo a un proceso de liofilización, obteniendo así un polvo. En esta primera parte, se abordan exclusivamente los extractos preparados con un hongo con tres días de crecimiento. En este punto, ya hemos determinado que se observa una estructura casi completa antes de la producción de esporas. Este análisis es fundamental para entender el desarrollo y comportamiento del hongo en esta fase de su ciclo de vida y su reacción a las condiciones de estrés sometidos.

En la Figura 3 se muestran las muestras liofilizadas de extractos de hongo *R. stolonifer*, resaltando que estas presentaron espectros parecidos. Además, se identificaron 9 señales presentes en todos los espectros. Alrededor de los 3,280 cm^{-1} (a) se observa una banda ancha que se puede atribuir a los enlaces N-H de aminos o enlaces peptídicos. En las líneas b, c y d que van desde 2,960 a 2,850 cm^{-1} se presentan varios tipos de señales que se suelen atribuir a las vibraciones asimétricas y simétricas de los enlaces C-H de los grupos metilo y metileno. Las líneas e y f, que están alrededor de 1,400 cm^{-1} también se atribuye a vibraciones de deformación de los enlaces C-H de los grupos metilo y metileno y a la deformación simétrica de los grupos carboxilatos (COO^-), además de atribuirse a vibraciones de los enlaces C=O de los grupos carbonilo y carboxilatos asimétricos. La línea g, ubicada alrededor de 1,250 cm^{-1} se puede atribuir al estiramiento de los enlaces C-O en fosfatos o ésteres. La línea h ubicada alrededor de los 1,070 cm^{-1} , se suele atribuir tanto a estiramientos de los enlaces C-O y C-C, así como a vibraciones de los enlaces C-N, por último, la línea i ubicada alrededor de los 650 cm^{-1} atribuido a las vibraciones fuera del plano de los enlaces N-H y C=O. la recopilación de estas señales en especial las de las líneas a, b, c, e, g, h e i, son relacionados a los grupos funcionales presentes en muchas proteínas, ácidos grasos y lípidos [102] por lo que se puede asumir que los extractos contienen algunas de estas tres biomoléculas en concentraciones abundantes.

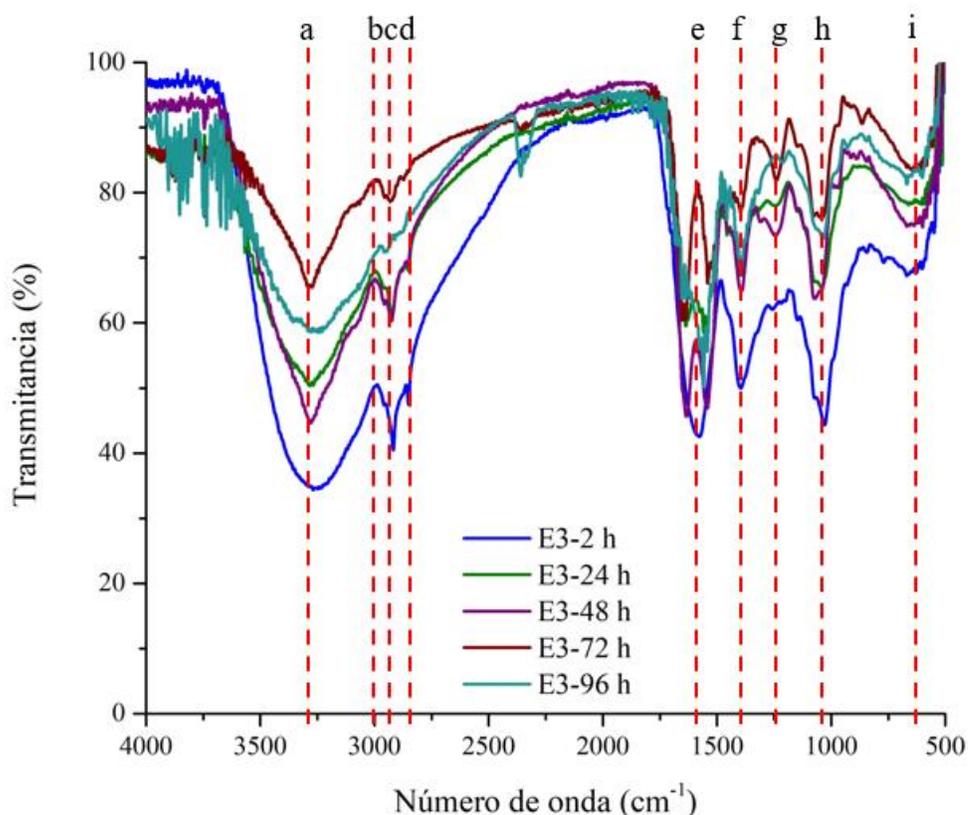


Figura 3. Espectros FT-IR de los diferentes extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento.

Para la caracterización mediante espectroscopia de UV-vis se hizo un barrido de 190 nm a 350 nm (Figura 4). La Figura 4 muestra una señal en común alrededor de 260 nm que va aumentando de intensidad desde las 2 hasta las 48 h, a partir de las 72 h se observan dos señales que van aumentando de intensidad hasta las 96 h. La señal única presente en 260 nm aproximadamente se atribuye a compuestos fenólicos simples ya que presentan una única señal entre 220 y 280 nm [103] que contienen π sistemas conjugados con grupos hidroxifenólicos, dicha señal se modifica respecto al tiempo a partir de las 72 h lo que sugiere que estos grupos fenólicos se están teniendo un cambio de transiciones electrónicas lo que indica la oxidación o modificación a compuestos derivados de grupos fenólicos simples.

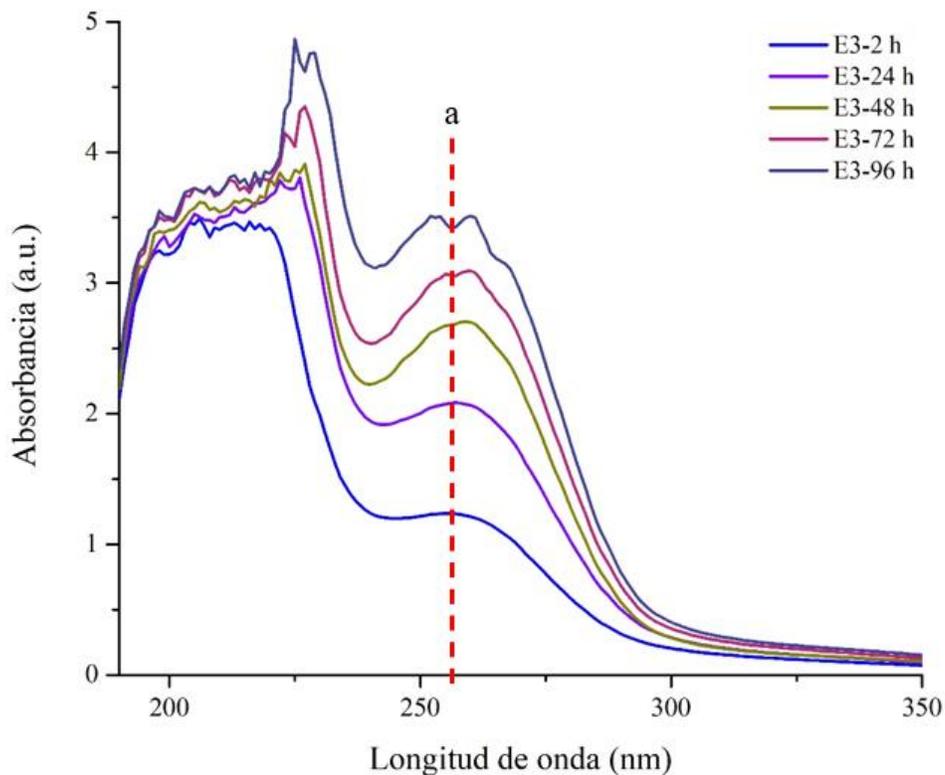


Figura 4. Espectros UV de los diferentes extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento.

4.3.2 Cuantificación de proteínas y polifenoles de los extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento

La Tabla S2 muestra que los resultados entre réplicas presentan una gran variabilidad por los valores de desviación estándar reportados. Además, en la Figura 5 se observa que las barras de error son tan grandes como el mismo valor promedio y se superponen, indicando que no hay diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas en los diferentes tiempos de estrés. Esta variabilidad entre réplicas está relacionada con la respuesta individual del hongo a las condiciones de estrés, es decir, los polifenoles se producen en los hongos filamentosos como respuesta a condiciones de estrés ambiental, por ejemplo, la disponibilidad de nutrientes; esto con la finalidad de que estos compuestos actúen como

antioxidantes y protejan a las células fúngicas del daño oxidativo causado por estas condiciones [104]. Además, los polifenoles confieren ventajas adaptativas en situaciones específicas, ayudando a los hongos a adaptarse a condiciones ambientales particulares y a protegerse de amenazas externas [105]. Por lo tanto, tomando en cuenta los resultados observados en la Figura 5 y Tabla S2, se sugiere que la cantidad de polifenoles producidos no está definida directamente por el tiempo de estrés.

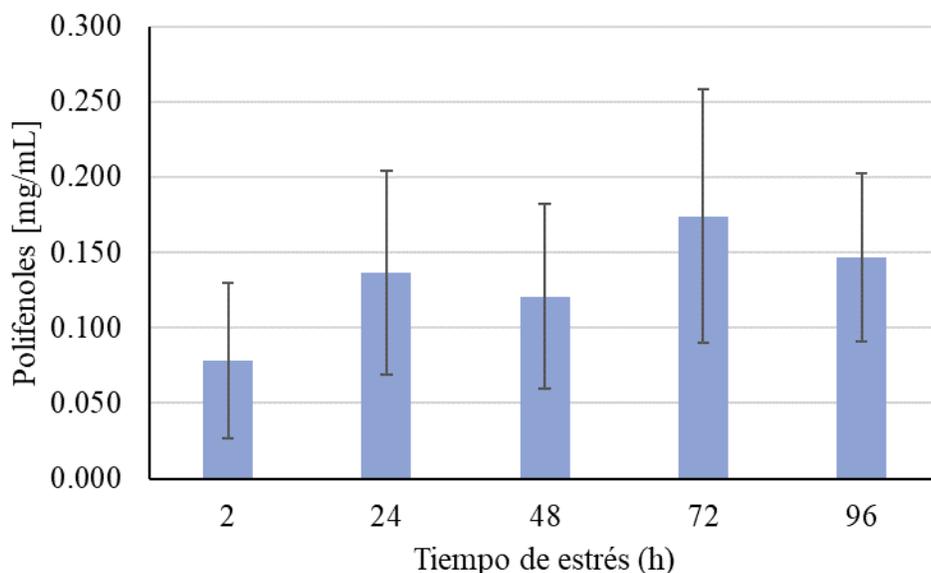


Figura 5. Concentración de polifenoles cuantificada de los diferentes extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento.

Como se puede observar en la Tabla S3 y Figura 6, los resultados entre réplicas presentan de nuevo una considerable variabilidad como lo visto anteriormente. Indicando que no hay diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas en los diferentes tiempos de estrés, excepto a las 48 horas, donde se registró la mayor concentración de proteínas. La variabilidad de las proteínas entre réplicas, al igual que los polifenoles, está relacionada con la respuesta individual del hongo a las condiciones de estrés. No obstante, particularmente el *Rhizopus*, como muchos hongos, produce proteínas de respuesta al estrés que ayudan a la célula a sobrevivir bajo condiciones adversas; por ejemplo, neutralizan los radicales libres y previenen el daño oxidativo [106]. Entre estas proteínas se incluyen las proteínas HSP (Heat Shock Proteins) que ayudan a proteger otras proteínas de la desnaturalización y asisten en el correcto plegamiento de proteínas bajo condiciones de estrés térmico [107]. Además, las proteínas involucradas en la producción de metabolitos secundarios pueden tener funciones defensivas o de comunicación [104]. Esto sugiere que la cantidad de proteínas producidas

varía de manera significativa según el tiempo de exposición al estrés. Sin embargo, en la figura 6 los tiempos de 2, 24, 72 y 96 horas de estrés, presentan barras de error sin diferencias significativas en la producción de proteínas. Tomando en cuenta lo descrito anteriormente, se determina que el tiempo de exposición al estrés puede influir en la producción de proteínas y polifenoles en el hongo *Rhizopus*, es decir, la respuesta es variable y depende de la condición específica del estrés y del hongo. Esto subraya la importancia de considerar tanto las respuestas individuales como las condiciones ambientales al estudiar la producción de metabolitos en hongos filamentosos.

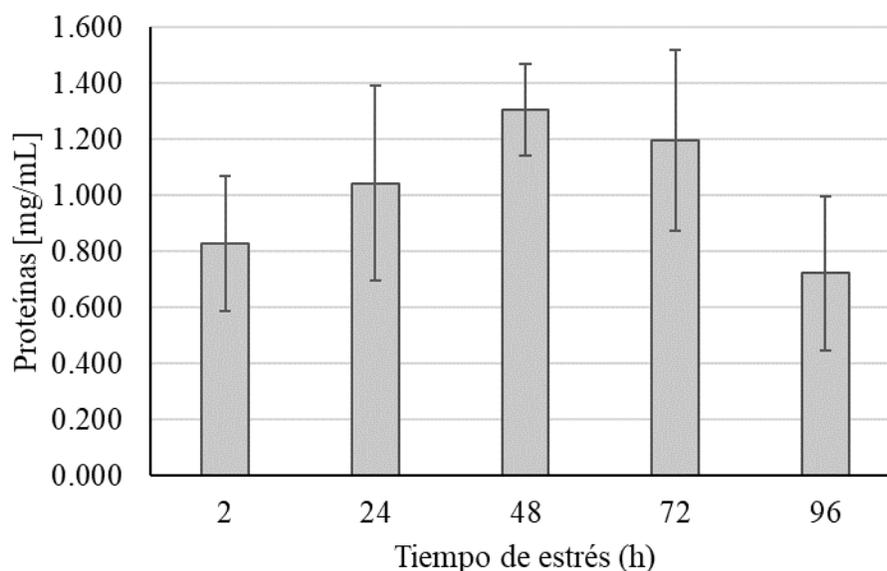


Figura 6. Concentración de proteínas cuantificada de los diferentes extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento.

4.3.3 Caracterización por infrarrojo de los extractos de hongo *R. stolonifer* con once días de crecimiento

En esta parte, se abordan exclusivamente los extractos preparados con un hongo con once días de crecimiento, momento en el cual el hongo alcanza su máximo punto de esporulación, donde ya contiene esporas en comparación con el día tres. El análisis se enfoca en identificar las diferencias entre estos dos momentos de crecimiento y después poder ver su impacto en la síntesis.

Al igual que en los extractos con tres días de crecimiento (Figura 7), en la Figura 7 se observa una señal única presente alrededor de 260 nm, la cual se atribuye a compuestos fenólicos simples. Según Geană et al. (2019) [103], estos compuestos presentan una única señal entre 220 y 280 nm debido a los sistemas π conjugados con grupos hidroxifenólicos. A diferencia de los extractos del día 3 (Figura 3), la señal en los extractos no se modifica con el tiempo, sino que solo aumenta en intensidad, lo que sugiere una mejor estabilidad de estos grupos fenólicos simples.

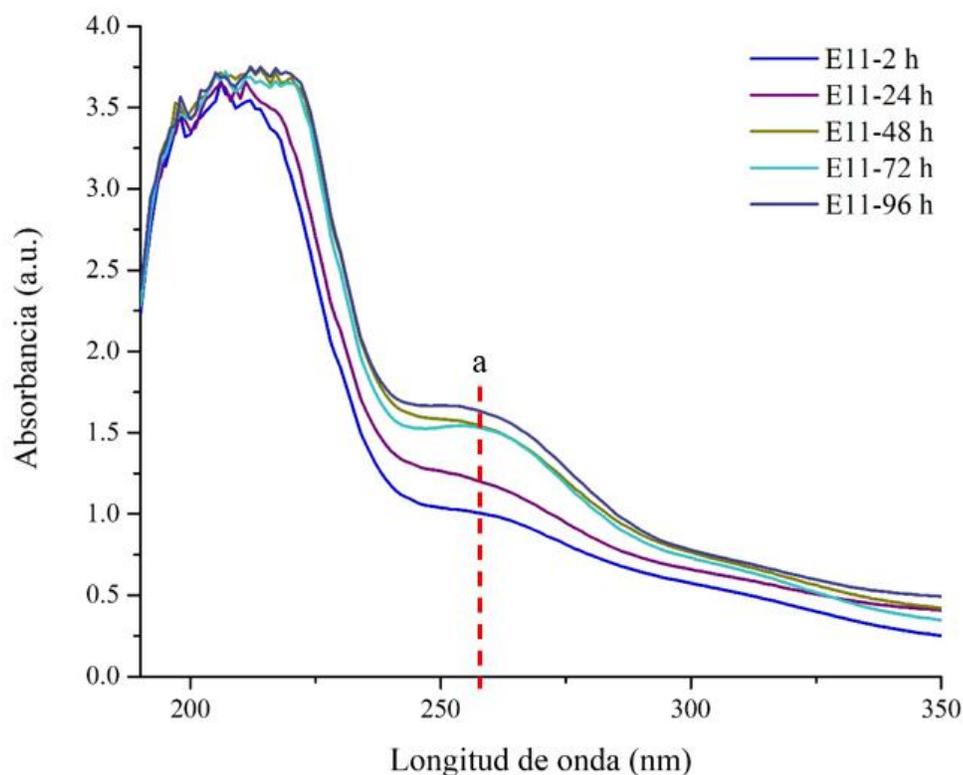


Figura 7. Espectros UV de los diferentes extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento.

4.3.4 Cuantificación de proteínas y polifenoles de los extractos de hongo *R. stolonifer* con once días de crecimiento

En la Tabla S4 se muestran los datos recopilados de la cuantificación de polifenoles con extractos del hongo *R. stolonifer* con once días de crecimiento. Se observa la ausencia de datos para las réplicas de 2 horas de estrés debido a la gran cantidad de datos procesados. Pero, aun así, se realizó una comparación entre los resultados obtenidos del día tres y el día once. Como se observa en la Figura 8 la producción de polifenoles es mayor en los extractos preparados con hongos de tres días de crecimiento, sugiriendo que el efecto del estrés afecta más a este tipo de hongo en sus etapas tempranas. Los extractos de hongos con once días de crecimiento presentan menos variabilidad, lo que indica una respuesta más consistente bajo las mismas condiciones de estrés. Además, la tendencia de los datos sugiere que los extractos de hongos con once días de crecimiento sugieren una mejor adaptación a las condiciones de estrés a las que son sometidos. Este análisis refuerza la idea de que los extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento (E3) y los extractos del hongo *R. stolonifer* con once días de crecimiento (E11) responden de manera diferente al estrés, con E3 mostrando mayores efectos y variabilidad en comparación con E11.

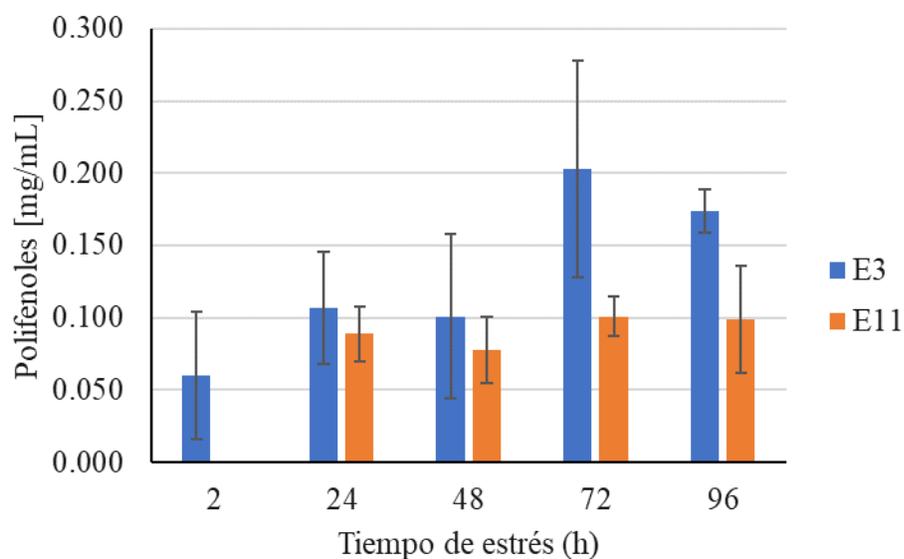


Figura 8. Comparación entre las concentraciones de polifenoles obtenidas de los extractos E3 y E11.

En la Tabla S5 se muestran los datos recopilados de la cuantificación de proteínas de los extractos del hongo *R. stolonifer* con once días de crecimiento con la misma variabilidad observada en las demás cuantificaciones. En la Figura 9, se observa que los E3 tienen mayores niveles de proteínas en la mayoría de los tiempos de estrés, con la excepción de las 2 y 96 horas, donde E11 presenta valores superiores. Esto indica que el grupo E3 tiene una mayor producción de proteínas en respuesta al estrés. Sin embargo, E3 tiende a tener barras de error más grande que E11 en la mayoría de las horas de estrés, lo que indica una mayor

variabilidad en su respuesta al estrés esto se relacionado con la fase de crecimiento y madurez del hongo, donde los hongos en un estado más maduro tienen una respuesta más uniforme. La excepción se encuentra a las 24 horas, donde E3 tiene una desviación estándar significativamente menor, sugiriendo una respuesta más estable en este punto en particular. En general, los extractos E3 muestran un aumento en la producción de proteínas con respecto al tiempo y el estrés, mientras que los extractos E11 presentan una producción más constante destacando su adaptabilidad.

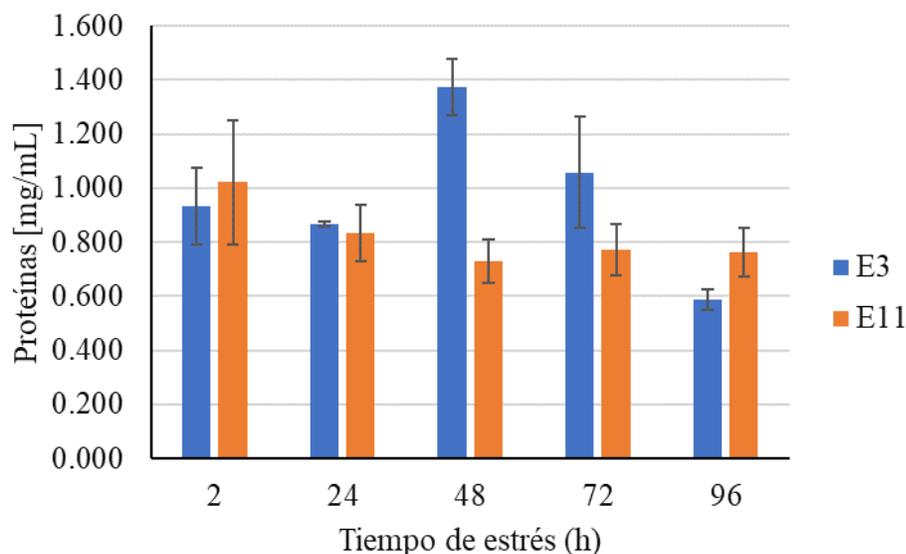


Figura 9. Comparación entre las concentraciones de proteínas obtenidas de los extractos de hongo con tres días (E3) y once días (E11) de crecimiento.

4.4 Síntesis de AgNPs con extractos del hongo *R. stolonifer* con tres y once días de crecimiento

Para la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs), a todos los extractos E3 y E11 se les añadió nitrato de plata para obtener una concentración final de 1 mM. Una vez transcurridas 24 horas de reacción, se observó un cambio de color en algunas de las muestras, siendo esto indicado en las Tablas 8 y 9, para el E3 y E11 respectivamente. Este cambio de color, en tonos naranjas o amarillos, fue una señal preliminar de la formación de nanopartículas de plata. Las soluciones se analizaron mediante espectroscopía UV-Vis, y como se muestra en ambas Tablas, todas las soluciones que mostraron un cambio de color (señaladas en verde) presentaron un Plasmon en el rango de 490 a 430 nm. Esto confirma parcialmente la formación de nanopartículas de plata [51,68,77]. Además, revela la falta de uniformidad en las réplicas, ya que la formación de nanopartículas no dependió del tiempo de reacción, sino

de las características de cada extracto, influyendo en la formación de las nanopartículas. Tomando en cuenta lo anterior, se determinó que existe una relación entre los diferentes parámetros, es decir, las características del extracto sometido al estrés (i.e., concentración de polifenoles y proteínas) y su efecto en la formación y características de AgNPs.

Tabla 8. Resultados de la síntesis de AgNPs con extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento después de 24 h de reacción.

Código de muestra	Polifenoles [mg/mL]	Proteínas [mg/mL]	UV después de 24 h Longitud de onda (nm)
E3-2a	0.133	0.512	0
E3-2b	0.109	1.069	0
E3-2c	0.046	0.943	434
E3-2d	0.024	0.788	495
E3-24a	0.150	0.863	454
E3-24b	0.226	1.567	0
E3-24c	0.096	0.879	457
E3-24d	0.074	0.863	0
E3-48a	0.065	1.476	452
E3-48b	0.167	1.094	0
E3-48c	0.181	1.375	0
E3-48d	0.070	1.271	0
E3-72a	0.087	0.856	453
E3-72b	0.117	1.270	455
E3-72c	0.259	1.048	0
E3-72d	0.232	1.608	0
E3-96a	0.172	1.133	0
E3-96b	0.190	0.552	0
E3-96c	0.160	0.627	0
E3-96d	0.065	0.580	0

Tabla 9. Resultados de la síntesis de AgNPs con extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento después de 24 h de reacción.

Código de muestra	Polifenoles [mg/mL]	Proteínas [mg/mL]	UV después de 24 h Longitud de onda (nm)
E11-2a	-	1.181	0
E11-2b	-	0.757	0
E11-2c	-	0.906	0
E11-2d	0.131	1.243	0
E11-24a	0.093	0.769	442

E11-24b	0.113	0.728	443
E11-24c	0.081	0.899	451
E11-24d	0.069	0.947	447
E11-48a	0.054	0.815	441
E11-48b	0.074	0.713	445
E11-48c	0.073	-	448
E11-48d	0.109	0.660	445
E11-72a	0.084	0.833	0
E11-72b	0.114	0.868	450
E11-72c	0.109	0.672	440
E11-72d	0.097	0.718	456
E11-96a	-	0.688	444
E11-96b	0.061	0.893	442
E11-96c	0.134	0.720	442
E11-96d	0.101	0.754	441

4.5 Análisis de correlación estadística entre los polifenoles y las proteínas cuantificadas de los extractos del hongo *R. stolonifer* con tres y once días de crecimiento

Una vez obtenidos los resultados de la cuantificación de polifenoles y proteínas de todos los extractos, así como la respuesta positiva o negativa a la formación de AgNPs, se realizó un análisis estadístico para evaluar la correlación entre estas dos biomoléculas y la respuesta a la formación de AgNPs. Estos datos fueron cargados en el programa Statgraphics análisis de correlación Pearson lineal y un análisis de correlación Spearman. Debido a la considerable correlación de Pearson existente entre polifenoles y proteínas, con un coeficiente significativo de 0.5841 basado en una muestra con el total de datos, se obtuvieron valores de nivel de significancia por debajo de ($p < 0.05$) con un nivel de confianza del 95% en los datos. Esto se puede aprovechar para pronosticar intervalos de concentración de polifenoles entre 0.120 y 0.024, y de proteínas entre 0.947 y 0.399. Además, se observó que existe un rango de relación proteína/polifenol varía entre 33 y 5 en los que lograron la formación de AgNPs. Esto describe que existe mayor concentración de proteínas con respecto a los polifenoles.

Tabla 10. Resultados seleccionados para el análisis de correlación de correlación en el programa statgraphics.

Código de muestra	Polifenoles [mg/mL]	Proteínas [mg/mL]
E3-24c	0.096	0.879
E3-72a	0.087	0.856
E3-24c	0.096	0.879
E3-24d	0.074	0.863
E3-72a	0.087	0.856
E3-72d	0.232	1.608
E11-24a	0.093	0.769
E11-24b	0.113	0.728
E11-24c	0.081	0.899
E11-48b	0.074	0.713
E11-48d	0.109	0.660
E11-72a	0.084	0.833
E11-72b	0.114	0.868
E11-72d	0.097	0.718
E11-96c	0.134	0.720
E11-96d	0.101	0.754
E11-24a	0.093	0.769
E11-24b	0.113	0.728
E11-24c	0.081	0.899
E11-48b	0.074	0.713
E11-48d	0.109	0.660
E11-72a	0.084	0.833
E11-72b	0.114	0.868
E11-72c	0.109	0.672
E11-72d	0.097	0.718
E11-96b	0.061	0.893
E11-96c	0.134	0.720
E11-96d	0.101	0.754

Finalmente, se seleccionaron solo 28 datos (Tabla 10) mayormente con resultados positivos a la formación de AgNPs con la que se logró proponer dos ecuaciones (Ec. 1 y 2) con las que se pueden pronosticar intervalos de concentración de polifenoles a partir de proteínas, y proteínas a través de polifenoles. Ambas ecuaciones presentan una R^2 del 74 y 82% indicando una alta confiabilidad de predicción.

$$\text{Polifenoles} = 0.374195 - 0.610793(\text{proteínas}) + 0.324682(\text{proteínas})^2 \quad \text{Ec. (1)}$$

$$\text{Proteínas} = 1.54738 - 13.979(\text{polifenoles}) + 61.1819(\text{polifenoles})^2 \quad \text{Ec. (2)}$$

Una vez obtenidas las ecuaciones se procedió a determinar valores con ambas ecuaciones, esto con la finalidad de para comparar las predicciones calculadas y los valores reales cuantificados (Figura 10). En la Figura 10.a, se observan los valores obtenidos para la ecuación 1 los valores se adaptan casi al 75% de los datos, mientras que para la Ecuación 2 (Figura 10.b), el pronóstico se adapta al 83% aproximadamente del total de los datos. A partir de estos datos, se confirmó la confiabilidad de la predicción para polifenoles y proteínas de los extractos de hongo con tres y once días de crecimiento.

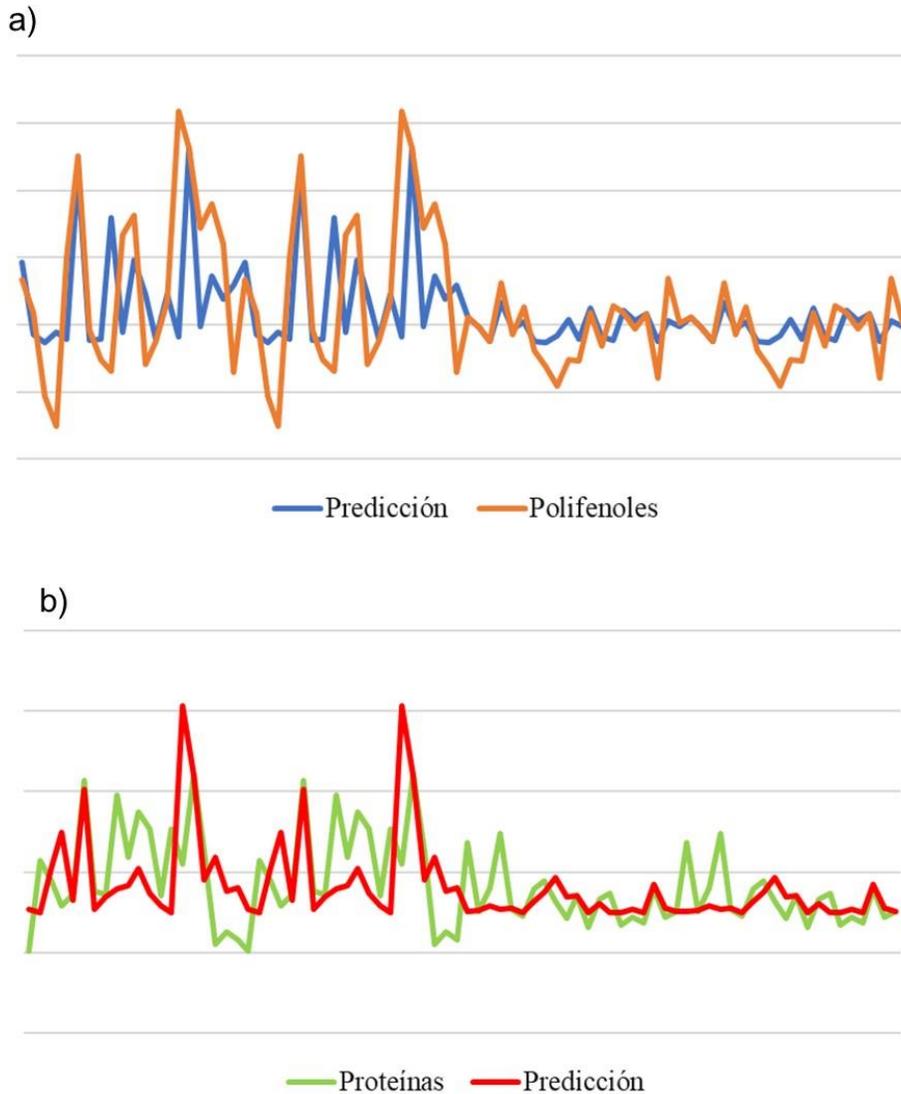


Figura 10. Comparación entre la predicción y el valor real de a) polifenoles con la ecuación (1) y b) Proteínas con la ecuación (2).

Una vez obtenidas las ecuaciones para la predicción de la concentración de proteínas y polifenoles, estas fueron utilizadas para completar los datos faltantes de la cuantificación de proteínas de los extractos E11 (Tabla S6). A partir de los datos obtenidos de las ecuaciones se incrementó el análisis de la concentración de proteínas y polifenoles en función de las diferentes horas de estrés.

En la Figura 11 se observa los datos completos para la comparación entre E3 y E11 con respecto a la producción de polifenoles. La discusión no varía mucho con respecto a lo discutido en el apartado anteriormente., indicando que, en E3 se obtienen mayores concentraciones de polifenoles y una mayor variabilidad en comparación con E11, lo que sugiere que el efecto del estrés sobre la acumulación de polifenoles es más pronunciado en E3. Mientras que E11 mantiene niveles de polifenoles con menor variabilidad, esto posiblemente debido a diferencias en las condiciones experimentales o en la respuesta del sistema al estrés. Asimismo, al comparar los datos, se observó que no existen diferencias significativas entre las horas de estrés para el día once. Esto puede atribuirse a que el hongo se encuentra en una fase de crecimiento estable, generando que la respuesta al estrés sea menos variable. Además, en el caso de las proteínas, el dato faltante no alteró el valor promedio calculado lo que habla de la confiabilidad de las ecuaciones de correlación utilizadas.

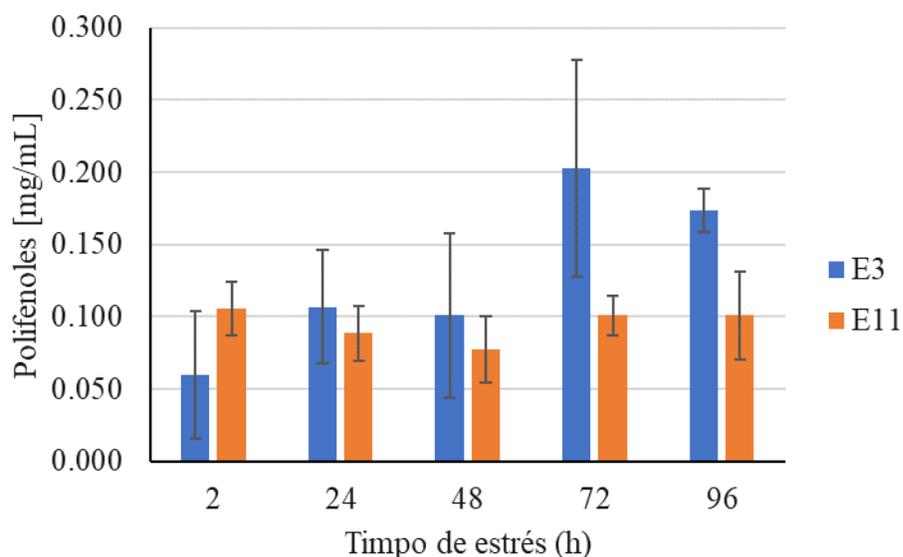


Figura 11. Comparación entre las concentraciones de polifenoles obtenidas de los extractos de hongo con tres días (E3) y once días (E11) de crecimiento utilizando la Ec. (1).

4.5.1 Validación de las Ecuaciones de correlación para la predicción de proteínas y

polifenoles de los extractos de hongo *R. stolonifer* con tres y once días de crecimiento

Como último paso para la validación de las ecuaciones obtenidas mediante el análisis estadístico de correlación fue necesario tener nuevos datos para analizar el comportamiento de las ecuaciones en los nuevos resultados. Además, el análisis de relación entre proteínas/polifenoles hechos previamente reveló que las relaciones óptimas son de 33 a 5. Tomando en cuenta ello se modificó la metodología, en la cual se prepararon nuevos extractos utilizando 45 mL de agua destilada estéril con 7 hongos de tres días de crecimiento y otros tres extractos con hongos de once días de crecimiento. La modificación de la metodología se atribuye a que se buscó que se obtuvieran mejores relaciones entre polifenoles y proteínas.

Para la nueva metodología se realizó un muestreo en diferentes intervalos de tiempo, es decir, se extrajeron 8 mL de cada uno de los 10 extractos, se filtraron, y se cuantificaron los polifenoles y proteínas en tiempo real para identificar las mejores relaciones entre estos compuestos. Los 5 mL restantes se almacenaron a 4°C para análisis posteriores. En la Tabla 11 se muestran los valores obtenidos con la nueva metodología. Se observa una variabilidad entre replicas con relación al tiempo de estrés como ya habíamos estado observado en resultados previos.

Tabla 11. Concentración de polifenoles y proteínas cuantificados de 10 extractos de hongo *R. stolonifer* con tres y once días de crecimiento a diferentes tiempos de estrés.

Código de muestra	Horas de estrés	No. De muestra	Polifenoles [mg/mL]	Proteínas [mg/mL]	Pro/Pol Relación
E3-130	0.5	1	0.058	0.412	7.1
E3-230		2	0.047	0.410	8.6
E3-330		3	0.065	0.402	6.2
E3-430		4	0.064	0.403	6.3
E3-530		5	0.048	0.414	8.6
E3-630		6	0.068	0.407	6.0
E3-730		7	0.051	0.399	7.9
E11-830		8	0.052	0.412	8.0
E11-930		9	0.052	0.412	8.0
E11-1030		10	0.074	0.402	5.4
E3-120	20	1	0.100	0.402	4.0
E3-220		2	0.065	0.406	6.2

E3-320		3	0.076	0.406	5.3
E3-420		4	0.059	0.403	6.8
E3-520		5	0.077	0.411	5.3
E3-620		6	0.104	0.410	4.0
E3-720		7	0.051	0.412	8.1
E11-820		8	0.055	0.405	7.3
E11-920		9	0.061	0.404	6.6
E11-1020		10	0.063	0.409	6.5
<hr/>					
E3-124		1	0.084	0.411	4.9
E3-224		2	0.077	0.419	5.4
E3-324		3	0.086	0.412	4.8
E3-424		4	0.083	0.406	4.9
E3-524	24	5	0.083	0.429	5.1
E3-624		6	0.074	0.418	5.6
E3-724		7	0.054	0.417	7.7
E11-824		8	0.084	0.414	4.9
E11-924		9	0.082	0.427	5.2
E11-1024		10	0.074	0.432	5.9
<hr/>					
E3-127		1	0.155	0.426	2.7
E3-227		2	0.090	0.423	4.7
E3-327		3	0.062	0.418	6.7
E3-427		4	0.049	0.412	8.4
E3-527	27	5	0.060	0.423	7.0
E3-627		6	0.057	0.418	7.4
E3-727		7	0.048	0.410	8.5
E11-827		8	0.051	0.418	8.2
E11-927		9	0.061	0.400	6.5
E11-1027		10	0.054	0.423	7.8
<hr/>					
E3-146		1	0.090	0.412	4.6
E3-246		2	0.057	0.417	7.3
E3-346		3	0.105	0.405	3.9
E3-446		4	0.043	0.414	9.7
E3-546	46	5	0.053	0.422	8.0
E3-646		6	0.064	0.427	6.7
E3-746		7	0.041	0.424	10.3
E11-846		8	0.035	0.414	11.8
E11-946		9	0.041	0.421	10.3
E11-1046		10	0.061	0.419	6.9

En la Figura 12 se muestran los valores de polifenoles obtenidos, donde se resalta que los producidos por el hongo E3 son más grandes que los E11; asimismo, que los valores del hongo E11 muestra una tendencia a disminuir a medida que aumenta el tiempo de estrés. Finalmente, se muestra que para los hongos E3 obtuvieron barras de error más grandes, es decir, que existe una mayor variabilidad en estos datos en comparación con los obtenidos por el hongo E11. A partir de ello se confirma que E11 tiene una menor variabilidad y mayor adaptabilidad al estrés. Como ya lo observamos anteriormente.

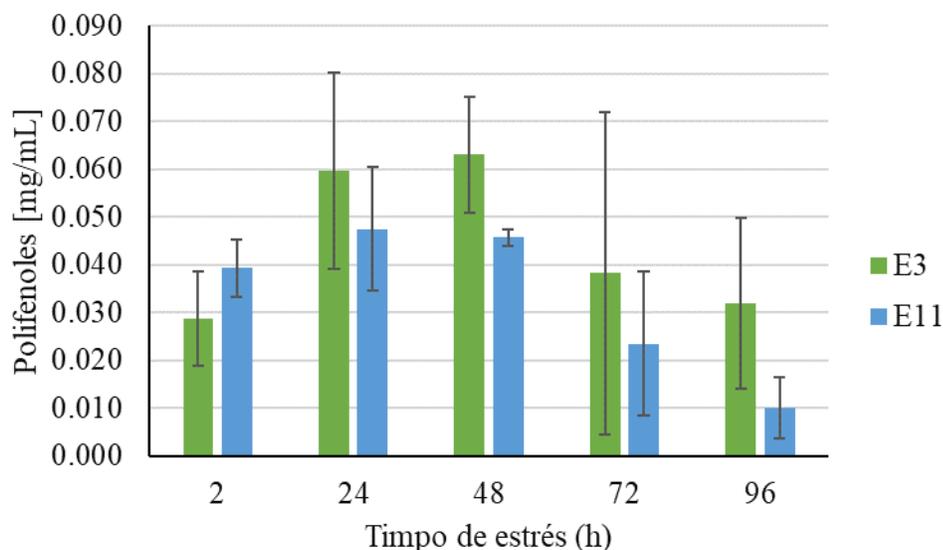


Figura 12. Comparación entre las concentraciones de polifenoles obtenidas de extractos de hongo E3 y E11 a diferentes tiempos de estrés.

Para el caso de las proteínas (Figura 13) los resultados de los nuevos experimentos presentaron un comportamiento diferente a lo antes observado en la Figura 9, es decir, se muestra que las concentraciones de proteínas en E3 y E11 son similares y no presentan diferencias significativas entre los tiempos de estrés evaluados. Además, ambos hongos muestran un incremento en la concentración de proteínas bastante parecido, lo que sugiere que la respuesta del sistema a estrés es relativamente estable durante ambos períodos de crecimiento, la menor variabilidad reportada se puede atribuirse a que se trabajó con los mismos hongos para los diferentes extractos obtenidos con respecto al tiempo. Una vez obtenidos los nuevos datos, se procedió a insertar los valores en las ecuaciones antes desarrolladas.

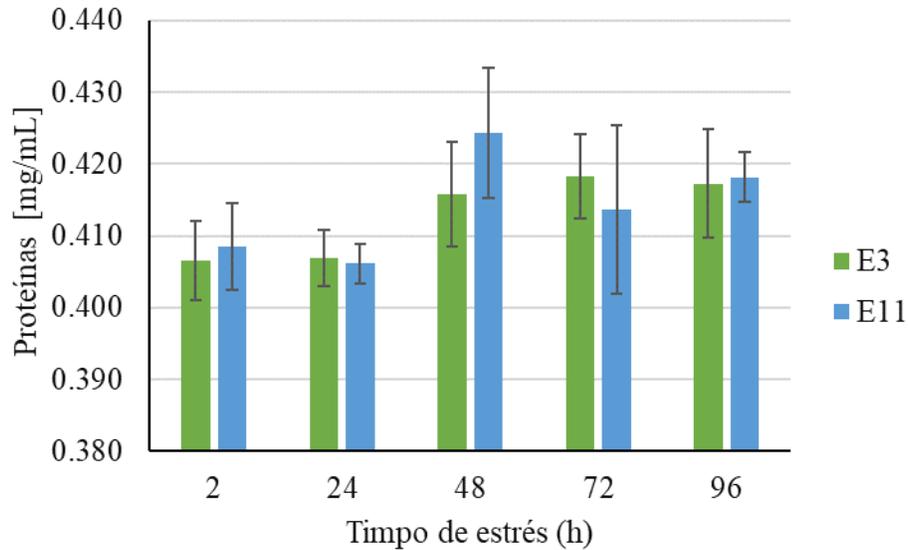


Figura 13. Comparación entre las concentraciones de proteínas obtenidas de extractos de hongo E3 y E11 a diferentes tiempos de estrés.

En la Figura 14 muestran que las ecuaciones no se comportan adecuadamente, es decir, los valores predichos no ajustan a los valores experimentales. Esto se debe principalmente a los valores reales de proteínas, ya que los estos son tan parecidos al utilizarlos en la ecuación se comportan como un valor constante (Figura 14.b) que al aplicar la ecuación (1) para la predicción de polifenoles, los valores calculados se comportan como un valor contante (Figura 14.a).

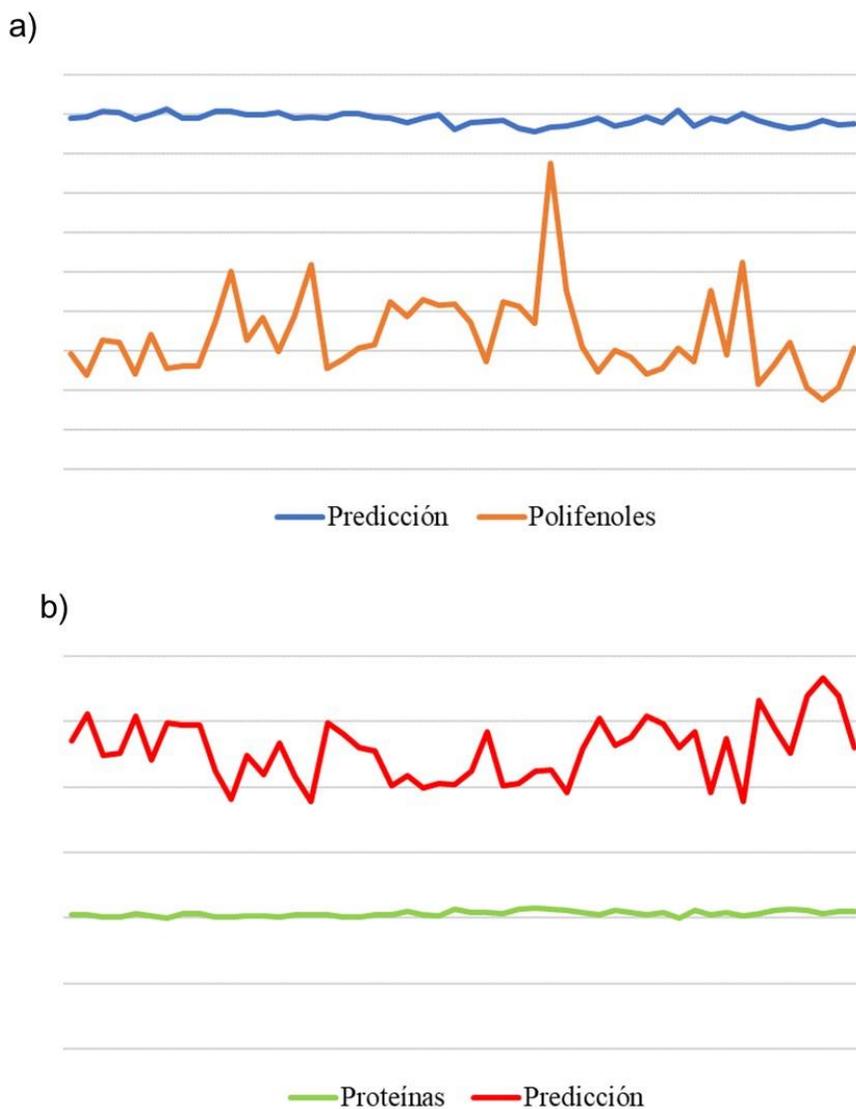


Figura 14. Comparación entre la predicción y el valor real de a) polifenoles con la ecuación (1) y b) Proteínas con la ecuación (2) utilizando los resultados obtenidos con los nuevos extractos.

Pese a los resultados negativos para la validación de las ecuaciones de predicción, a los extractos preparados se les añadió AgNO_3 para obtener una concentración final de 1 mM para continuar con el análisis de relación óptimo observado previamente. En la Tabla 12 se muestran en verde los nuevos extractos que presentaron un cambio de color y la presencia de un plasmón característico. Además, como se observa en la Tabla 12 se reordenó según su relación Proteína/Polifenol por lo que se puede observar que en las relaciones más grandes registrada desde 12 veces hasta casi 5 lograron la formación de AgNPs, mientras que las

relaciones más bajas no muestran formación de AgNPs. Confirmando lo antes mencionado en el análisis estadístico.

Tabla 12. Resultados de la síntesis de AgNPs con extractos E3 y E11 a diferentes tiempos de estrés después de 24 h de reacción.

Código de muestra	Polifenoles [mg/mL]	Proteínas [mg/mL]	Pro/Pol Relación	UV después de 24 h Longitud de onda (nm)
E11-846	0.035	0.414	11.8	450
E3-746	0.041	0.424	10.3	450
E11-946	0.041	0.421	10.3	450
E3-446	0.043	0.414	9.7	0
E3-230	0.047	0.410	8.6	434
E3-530	0.048	0.414	8.6	437
E3-727	0.048	0.410	8.5	451
E3-427	0.049	0.412	8.4	446
E11-827	0.051	0.418	8.2	437
E3-720	0.051	0.412	8.1	443
E3-546	0.053	0.422	8.0	450
E11-830	0.052	0.412	8.0	446
E11-930	0.052	0.412	8.0	443
E3-730	0.051	0.399	7.9	429
E11-1027	0.054	0.423	7.8	450
E3-724	0.054	0.417	7.7	449
E3-627	0.057	0.418	7.4	446
E11-820	0.055	0.405	7.3	435
E3-246	0.057	0.417	7.3	0
E3-130	0.058	0.412	7.1	434
E3-527	0.060	0.423	7.0	470
E11-1046	0.061	0.419	6.9	450
E3-420	0.059	0.403	6.8	446
E3-327	0.062	0.418	6.7	0
E3-646	0.064	0.427	6.7	0
E11-920	0.061	0.404	6.6	437
E11-927	0.061	0.400	6.5	450
E11-1020	0.063	0.409	6.5	434
E3-430	0.064	0.403	6.3	429
E3-220	0.065	0.406	6.2	446
E3-330	0.065	0.402	6.2	425
E3-630	0.068	0.407	6.0	437
E11-1024	0.074	0.432	5.9	435
E3-624	0.074	0.418	5.6	0
E3-224	0.077	0.419	5.4	451

E11-1030	0.074	0.402	5.4	446
E3-320	0.076	0.406	5.3	444
E3-520	0.077	0.411	5.3	451
E11-924	0.082	0.427	5.2	440
E3-524	0.083	0.429	5.1	459
E11-824	0.084	0.414	4.9	435
E3-424	0.083	0.406	4.9	446
E3-124	0.084	0.411	4.9	0
E3-324	0.086	0.412	4.8	464
E3-227	0.090	0.423	4.7	451
E3-146	0.090	0.412	4.6	0
E3-120	0.100	0.402	4.0	0
E3-620	0.104	0.410	4.0	443
E3-346	0.105	0.405	3.9	0
E3-127	0.155	0.426	2.7	0

4.6 Análisis de concentraciones y relaciones óptimas de proteínas y polifenoles para la formación de AgNPs con extractos de hongo de los extractos del hongo *R. stolonifer* con tres y once días de crecimiento

Una vez recopilados todos los datos de cuantificación y los resultados de la síntesis de AgNPs y tomando en cuenta los rangos de relación óptimos estos fueron ordenados de la mayor a la menor según su relación proteína/polifenol (Tabla 13). En la Tabla 13 se observa que, en algunos casos, aunque la relación fuera optima los resultados fueron negativos, por lo que se realizó un análisis más profundo, en el cual se determinó que existen otras condiciones óptimas a tomar en cuenta. Se establecieron tres condiciones necesarias para la formación de AgNPs con extractos de hongo *R. stolonifer*, las cuales fueron que las concentraciones óptimas de polifenoles deben estar en un rango de 0.120 a 0.024 mg/mL, para el caso de las proteínas, estas deben estar en el rango de 0.947 a 0.399 mg/mL.

Tabla 13. Recopilación de todos los resultados de la síntesis de AgNPs con extractos de hongo *R. stolonifer* con tres y once días de crecimiento a diferentes tiempos de estrés después de 24 h de reacción.

Código de muestra	Polifenoles	Proteínas	Relación	Plasmon en 24 h
E3-2d	0.024	0.788	32.7	+
E3-48a	0.065	1.476	22.7	+
E3-2c	0.046	0.943	20.4	+
E3-48d	0.070	1.271	18.0	-
E11-48a	0.054	0.815	15.0	+
E11-96b	0.061	0.893	14.7	+
E11-24d	0.069	0.947	13.8	+
E11-846	0.035	0.414	11.8	+
E11-48c	0.073	0.854	11.7	+
E3-24d	0.074	0.863	11.6	-
E11-2a	0.106	1.181	11.2	-
E11-24c	0.081	0.899	11.1	+
E3-72b	0.117	1.270	10.8	+
E11-2c	0.087	0.906	10.4	-
E3-746	0.041	0.424	10.3	+
E11-946	0.041	0.421	10.3	+
E11-72a	0.084	0.833	9.9	-
E3-2b	0.109	1.069	9.8	-
E3-72a	0.087	0.856	9.8	+
E3-446	0.043	0.414	9.7	-
E11-48b	0.074	0.713	9.6	+
E11-2d	0.131	1.243	9.5	-
E3-24c	0.096	0.879	9.2	+
E3-96d	0.065	0.580	9.0	-
E3-230	0.047	0.410	8.6	+
E3-530	0.048	0.414	8.6	+
E3-727	0.048	0.410	8.5	+
E3-427	0.049	0.412	8.4	+
E11-24a	0.093	0.769	8.3	+
E11-827	0.051	0.418	8.2	+
E3-720	0.051	0.412	8.1	+
E3-546	0.053	0.422	8.0	+
E11-830	0.052	0.412	8.0	+
E11-930	0.052	0.412	8.0	+
E3-730	0.051	0.399	7.9	+

E11-1027	0.054	0.423	7.8	+
E11-2b	0.098	0.757	7.7	-
E3-724	0.054	0.417	7.7	+
E11-72b	0.114	0.868	7.6	+
E3-48c	0.181	1.375	7.6	-
E11-96d	0.101	0.754	7.4	+
E11-72d	0.097	0.718	7.4	+
E3-627	0.057	0.418	7.4	+
E11-820	0.055	0.405	7.3	+
E3-246	0.057	0.417	7.3	-
E3-130	0.058	0.412	7.1	+
E3-527	0.060	0.423	7.0	+
E3-24b	0.226	1.567	6.9	-
E3-72d	0.232	1.608	6.9	-
E11-1046	0.061	0.419	6.9	+
E3-420	0.059	0.403	6.8	+
E3-327	0.062	0.418	6.7	-
E3-646	0.064	0.427	6.7	-
E3-96a	0.172	1.133	6.6	-
E11-920	0.061	0.404	6.6	+
E3-48b	0.167	1.094	6.6	-
E11-927	0.061	0.400	6.5	+
E11-1020	0.063	0.409	6.5	+
E11-24b	0.113	0.728	6.4	+
E11-96a	0.108	0.688	6.4	+
E3-430	0.064	0.403	6.3	+
E3-220	0.065	0.406	6.2	+
E3-330	0.065	0.402	6.2	+
E11-72c	0.109	0.672	6.2	+
E11-48d	0.109	0.660	6.1	+
E3-630	0.068	0.407	6.0	+
E11-1024	0.074	0.432	5.9	+
E3-24a	0.150	0.863	5.8	+
E3-624	0.074	0.418	5.6	-
E3-224	0.077	0.419	5.4	+
E11-1030	0.074	0.402	5.4	+
E11-96c	0.134	0.720	5.4	+
E3-320	0.076	0.406	5.3	+
E3-520	0.077	0.411	5.3	+
E11-924	0.082	0.427	5.2	+
E3-524	0.083	0.429	5.1	+

E11-824	0.084	0.414	4.9	+
E3-424	0.083	0.406	4.9	+
E3-124	0.084	0.411	4.9	-
E3-324	0.086	0.412	4.8	+
E3-227	0.090	0.423	4.7	+
E3-146	0.090	0.412	4.6	-
E3-72c	0.259	1.048	4.0	-
E3-120	0.100	0.402	4.0	-
E3-620	0.104	0.410	4.0	+
E3-96c	0.160	0.627	3.9	-
E3-346	0.105	0.405	3.9	-
E3-2a	0.133	0.512	3.8	-
E3-96b	0.190	0.552	2.9	-
E3-127	0.155	0.426	2.7	-

Por último, debe existir un rango de relación de proteína/polifenol de 5 hasta 33 veces. En la Tabla 14 se puede observar que al recopilar todos los datos que no cumplen estas tres condiciones, son los valores que no lograron la formación de AgNPs.

Tabla 14. Resultados de síntesis de AgNPs con extractos de hongo con tres y once días de crecimiento fuera del rango viable.

Código de muestra	No. de muestra	Polifenoles	Proteínas	Relación	Plasmon en 24 h
E3-48a	67	0.065	1.476	22.661	+
E3-48d	70	0.070	1.271	18.031	-
E11-2a	55	0.106	1.181	11.173	-
E3-72b	76	0.117	1.270	10.815	+
E3-2b	52	0.109	1.069	9.791	-
E11-2d	58	0.131	1.243	9.474	-
E3-48c	69	0.181	1.375	7.594	-
E3-24b	60	0.226	1.567	6.940	-
E3-72d	78	0.232	1.608	6.935	-
E3-96a	83	0.172	1.133	6.591	-
E3-48b	68	0.167	1.094	6.555	-
E3-24a	59	0.150	0.863	5.769	+
E11-96c	89	0.134	0.720	5.361	+
E3-72c	77	0.259	1.048	4.046	-
E3-120	11	0.100	0.402	4.018	-
E3-620	16	0.104	0.410	3.953	+
E3-96c	85	0.160	0.627	3.905	-

E3-346	43	0.105	0.405	3.870	-
E3-2a	51	0.133	0.512	3.841	-
E3-96b	84	0.190	0.552	2.910	-
E3-127	31	0.155	0.426	2.747	-

4.7 Análisis de los espectros UV-vis de las AgNPs biogénicamente sintetizadas con extractos del hongo *R. stolonifer* con tres y once días de crecimiento

Al tener una gran cantidad de resultado positivos a la formación de AgNPs con extractos de hongo se hizo una clasificación basada en la ubicación del plasmón de cada muestra, la caracterización por espectroscopia UV-vis es una de las técnicas fundamentales para observar la formación de nanopartículas, esto se debe a que cuando la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) está presente y a una determinada longitud de onda, alrededor de 450 nm para AgNPs [67,68]. Además, dependiendo de la longitud de onda, absorbancia y área bajo la curva que presenta el plasmón se puede ayudar a predecir el tamaño y forma de las nanopartículas de plata. Esto se atribuye a que el tamaño de las nanopartículas influye en la intensidad y posición del SPR debido a la relación entre el volumen y la superficie, mientras que la forma afecta cómo los electrones responden al campo electromagnético incidente, lo que resulta en diferentes modos de resonancia dependiendo de la geometría [108]. Como se muestra en la Figura 15, las señales no solo comparten el mismo rango con diferentes absorbancias, incluso se sobreponen lo que indica que deben ser morfológicamente parecidas, para su caracterización se seleccionaron algunas muestras por cada rango, del rango 1 (Figura 15.a) que va del intervalo de 435 a 425 nm se seleccionó la muestra S3-524, del rango 2 (Figura 15.b) del intervalo de 455 a 446 nm se seleccionaron las muestras S3-24a, S11-24c, S11-48c y S3-72a, del rango 3 (Figura 15.c) del intervalo de 445 a 437 nm se seleccionaron las muestras S3-320, S11-48d, E11-96d y S11-827 y del rango 4 (Figura 14.d) que van de 435 a 425 nm se seleccionaron las muestras S3-430 y S11-824, estas muestras seleccionadas se utilizarán para la caracterización por HRTEM, EDS para así relacionar su morfología y tamaño con la forma del plasmón reportada.

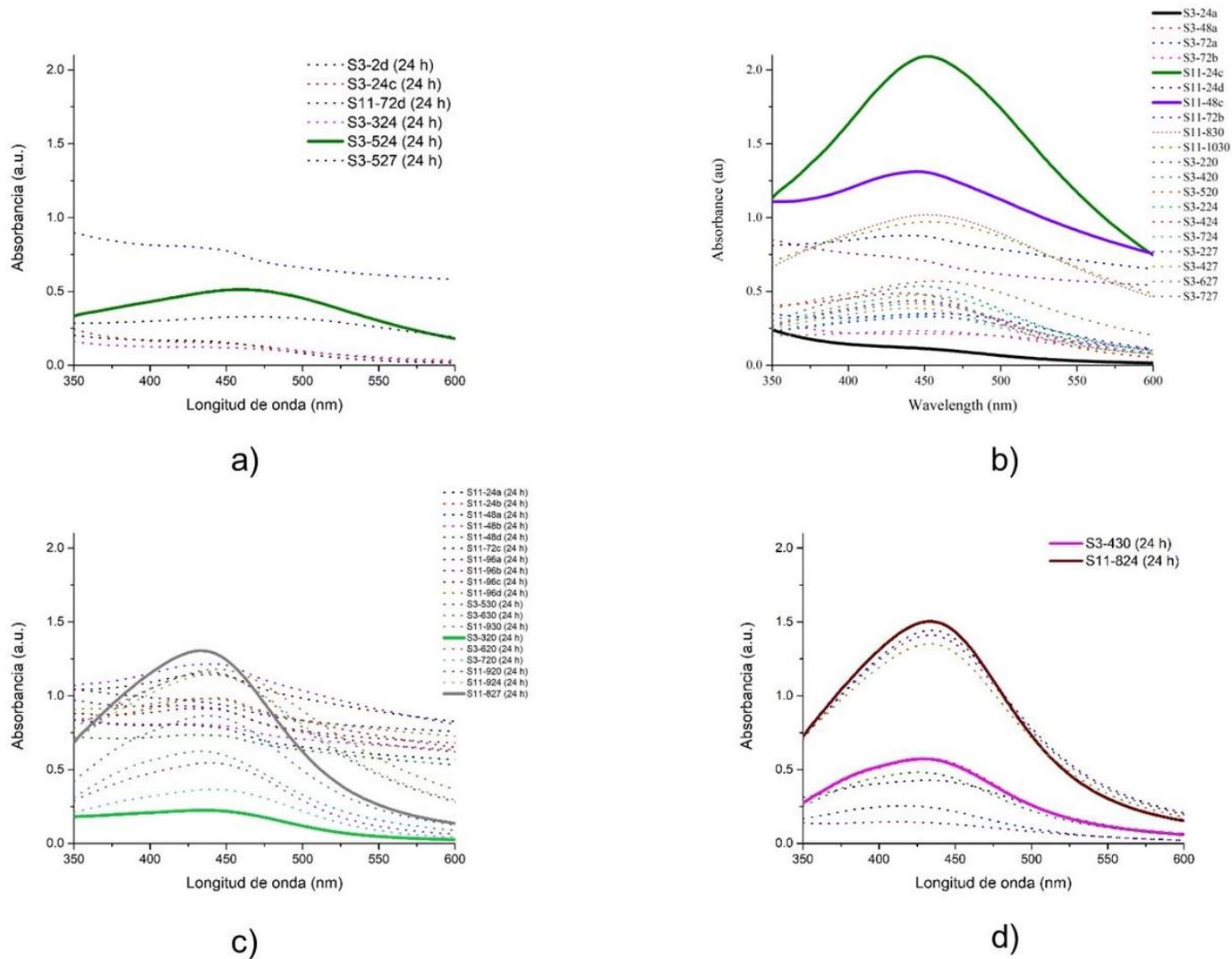


Figura 15. Rangos de espectros UV-vis de las AgNPs sintetizadas; a) Rango 1: 435-425 nm, b) Rango 2: 455-446 nm, c) Rango 3: 445-437 nm y d) Rango 4: 435-425 nm

4.7.1 Caracterización de las AgNPs biogénicamente sintetizadas con extractos de hongo *R. stolonifer* con tres y once días de crecimiento

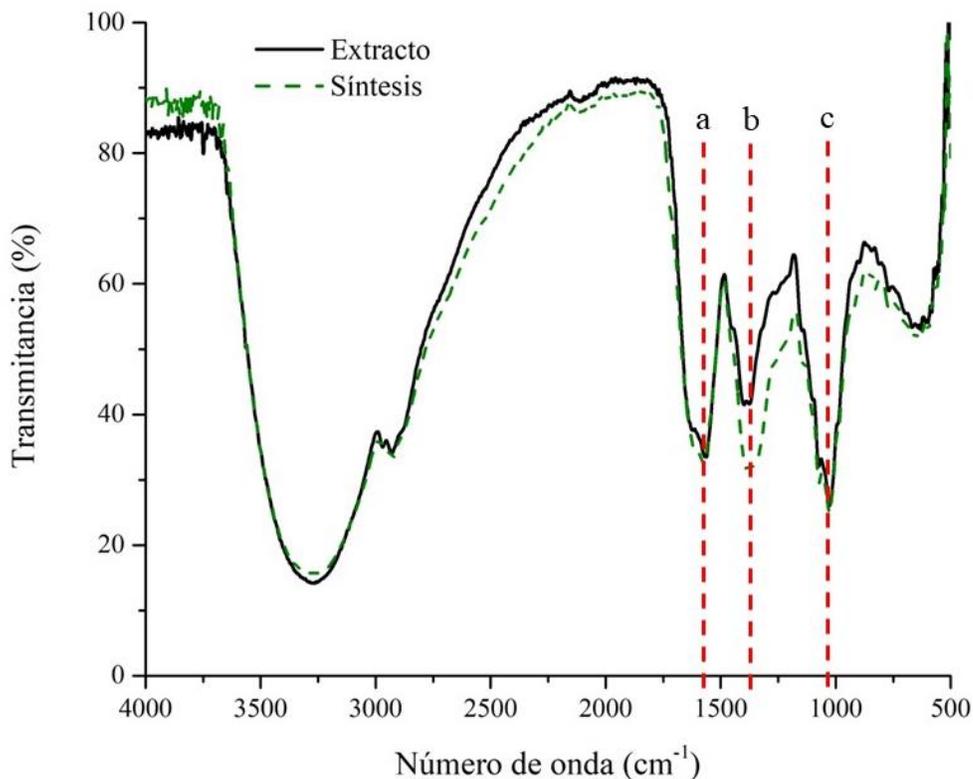


Figura 16. Espectros FT-IR de los extractos del hongo *R. stolonifer* y las AgNPs biogénicamente sintetizadas.

En la Figura 16 se observa el espectro infrarrojo de las muestras de extracto de hongo y de la síntesis de AgNPs. A pesar de que el espectro muestra diversas señales, las señales denotadas con a, b y c resaltan debido a lo siguiente: la señal a) que es a 1580 cm^{-1} , que generalmente se asocia con las vibraciones de elongación del enlace C=C en anillos aromáticos o con las vibraciones del grupo amida (C=O). Dado que los extractos de hongos contienen proteínas y compuestos aromáticos, esta banda sugiere que estos componentes podrían estar involucrados en los procesos de reducción y estabilización de las nanopartículas de plata. Otra señal b) aparece a 1472 cm^{-1} , la cual puede atribuirse a la deformación angular de los

enlaces CH₂ o CH₃ presentes en los lípidos, o a las vibraciones de los grupos metil y metileno en los polisacáridos. Estos grupos funcionales son comunes en los extractos de hongos, y su presencia en el espectro FTIR confirma que los lípidos y polisacáridos del extracto fúngico están involucrados en la formación y estabilización de las nanopartículas [109]. Por último, la banda c) a 1072 cm⁻¹ se puede atribuir a las vibraciones de estiramiento C-O en alcoholes, éteres, o posiblemente a las vibraciones de estiramiento C-N en aminas. Los metabolitos secundarios presentes en los extractos fúngicos, como los carbohidratos y proteínas, exhiben estos tipos de enlaces. La presencia y el aumento de esta señal indican que estos componentes orgánicos del extracto fúngico participan activamente en la síntesis de las nanopartículas de plata [110]. En conjunto, la combinación del aumento en estos picos en el espectro FTIR confirma la implicación de los compuestos orgánicos del extracto de hongo en el proceso de síntesis de las nanopartículas de plata.

Tabla 15. Resultados de síntesis de AgNPs con extractos de hongo con tres y once días de crecimiento fuera del rango viable.

Código de muestra/ Rango	Polifenoles	Proteínas	Relación	Análisis Elemental		
				%C	%Ag	%O
S11-24c/ 1	0.081	0.899	11	15	60	5
S11-48d/ 3	0.109	0.660	6	80	7	10
S3-72a/ 2	0.087	0.856	10	4	95	1
S11-96d/ 3	0.101	0.754	7	60	28	8

La Tabla 15 muestra el análisis elemental de las nanopartículas de plata sintetizadas, donde en esta se observa una notable variabilidad en los porcentajes de plata (%Ag) y oxígeno (%O) entre las distintas muestras. Los valores de %Ag varían de 4% a 80%, lo que indica una extensa gama de concentraciones influenciadas probablemente por las condiciones de síntesis y los parámetros experimentales utilizados. Por otro lado, el contenido de oxígeno es considerablemente alto en todas las muestras, con un rango que va de 1% a 95%. Este alto porcentaje de oxígeno podría deberse a procesos de oxidación o a la formación de óxidos durante la síntesis [111-113]. Al analizar la relación entre los porcentajes de plata y oxígeno, se observa una tendencia inversa. Las muestras con mayor contenido de plata tienden a tener menores concentraciones de oxígeno. Este patrón sugiere que una mayor concentración de plata en las nanopartículas podría estar asociada con una menor formación de óxidos, posiblemente debido a la competencia entre la plata y el oxígeno durante la síntesis [114]. Esta relación inversa entre %Ag y %O ofrece información crucial para el ajuste de la composición y las propiedades de las nanopartículas, en función de las condiciones experimentales empleadas.

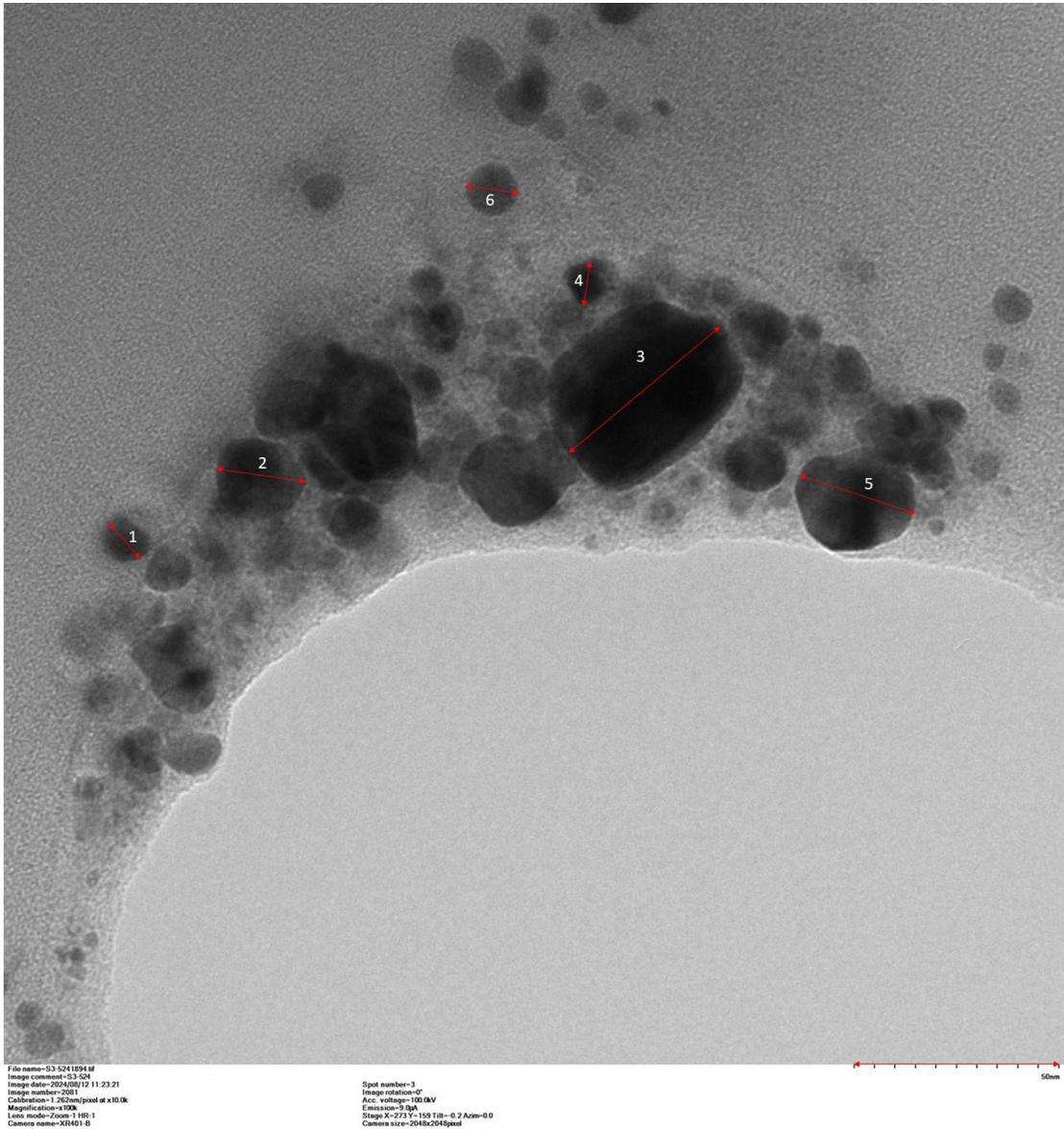
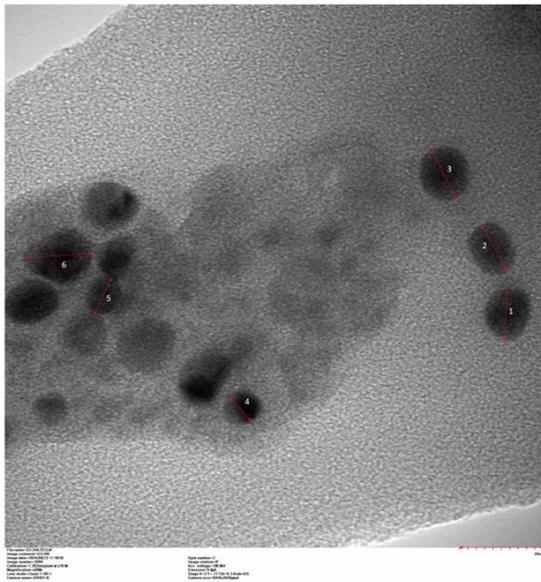
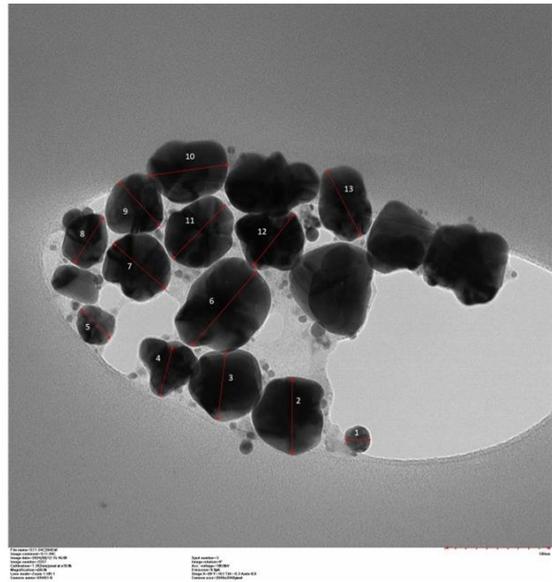


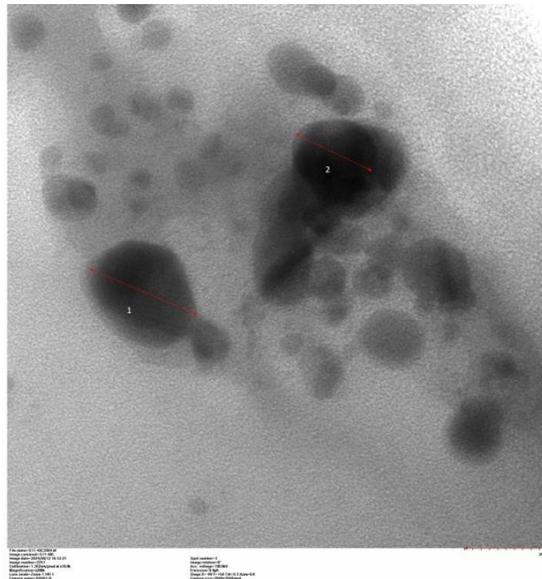
Figura 17. HRTEM de la muestra seleccionada del rango 1; S3-524.



a)



b)



c)

Figura 18. HRTEM de la muestra seleccionada del rango 1; a) S3-24a, b) S11-24c y c) S11-48c.

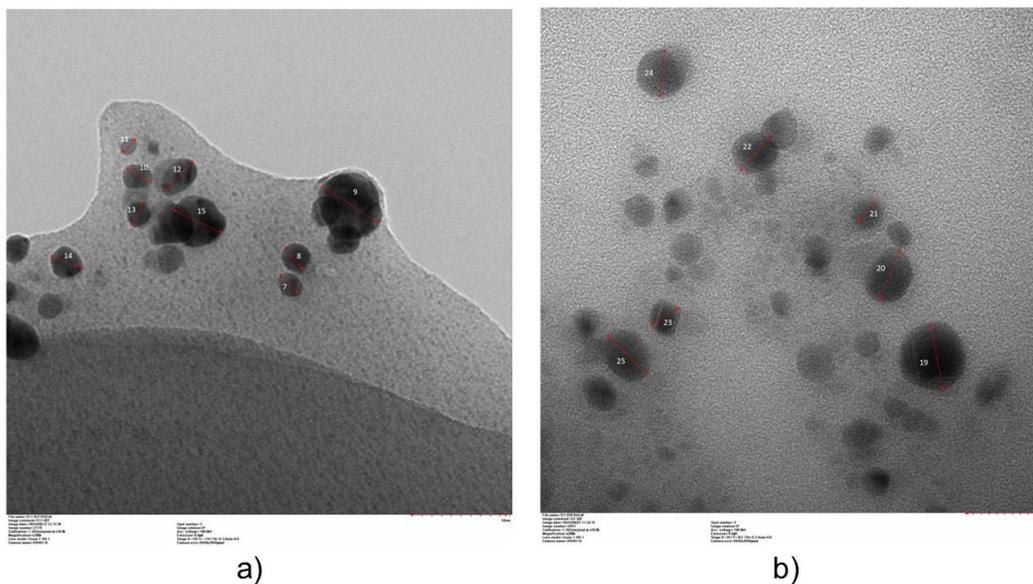


Figura 19. HRTEM de la muestra seleccionada del rango 2; a) S11-827 y b) S3-320.

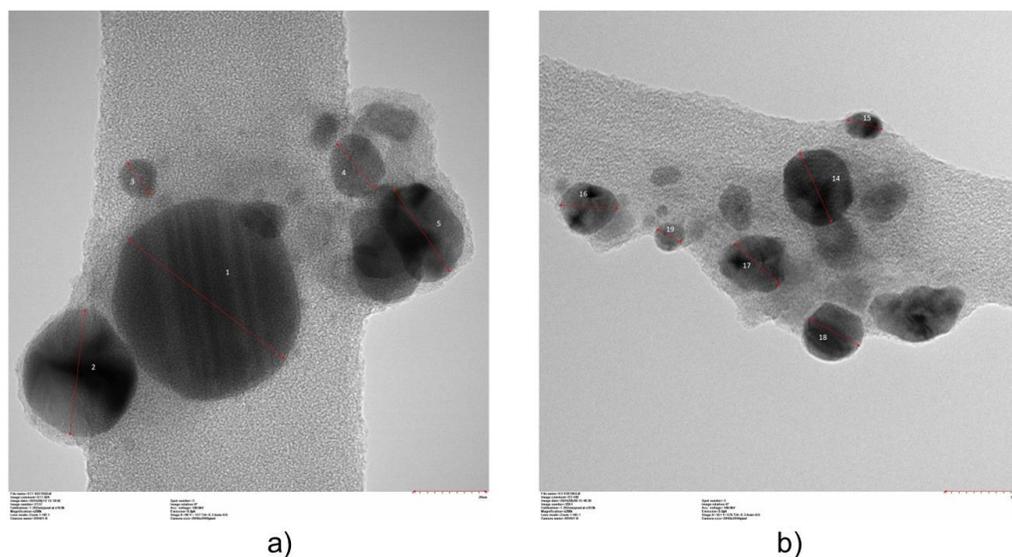


Figura 20. HRTEM de la muestra seleccionada del rango 2; a) S11-824 y b) S3-430.

Como se puede observar en las figuras 17, 18, 19 y 20 se obtuvieron nanopartículas con forma esférica en todos los rangos, además en todas las imágenes se puede observar la amplia dispersión de tamaños. Además, se resalta la presencia de un biofilm de materia orgánica que envuelve las partículas, esto se relaciona con los análisis obtenidos anteriormente.

Tabla 16. Resultados de síntesis de AgNPs con extractos de hongo con tres y once días de crecimiento fuera del rango viable.

Rango	Código de muestra	Polifenoles	Proteínas	Relación	Tamaño, nm
1	S3-524	0.083	0.429	5	21 ± 4
	S3-24a	0.150	0.863	6	31 ± 27
2	S11-24c	0.081	0.899	11	71 ± 15
	S11-48c	0.073	0.854	12	50 ± 25
3	S3-320	0.076	0.406	5	19 ± 9
	S11-827	0.051	0.418	8	25 ± 10
4	S3-430	0.064	0.403	6	20 ± 4
	S11-824	0.084	0.414	5	30 ± 8

Como se muestra en la Tabla 16, se observa que el Rango 1 presenta una mayor variabilidad en el tamaño de las partículas y una relación más alta entre polifenoles y proteínas. En este rango, los tamaños más grandes tienden a asociarse con relaciones más elevadas entre estos componentes, lo que sugiere que el tamaño podría influir en la concentración relativa de polifenoles respecto a proteínas. Por otro lado, los Rangos 2 y 3 exhiben tamaños menores y medianos de nanopartículas, con relaciones entre polifenoles y proteínas significativamente más bajas en comparación con el Rango 1. En el Rango 2, los tamaños más pequeños se correlacionan con relaciones más bajas, mientras que en el Rango 3, a pesar de los tamaños intermedios, no se identifica un patrón claro en la relación entre polifenoles y proteínas.

Este análisis indica que el tamaño de las nanopartículas puede tener un impacto considerable en la relación entre polifenoles y proteínas, especialmente en tamaños mayores. Sin embargo, la influencia del tamaño en esta relación no sigue un patrón uniforme en todos los rangos, lo que sugiere que otros factores también pueden estar en juego. Adicionalmente, en el caso de las nanopartículas sintetizadas con microorganismos, se han observado algunas complicaciones adicionales. El máximo de absorción depende de la especie microbiana utilizada y de las proteínas o metabolitos presentes [65]. Esto puede dificultar la predicción del tamaño y forma a partir de los espectros UV-vis debido a la interferencia de compuestos orgánicos en las nanopartículas. Aunque frecuentemente se reporta un máximo de absorción alrededor de los 420 nm, las morfologías y tamaños pueden variar significativamente [56, 58,66], lo que aumenta la complejidad de estandarizar la biosíntesis. Por lo tanto, es crucial realizar caracterizaciones específicas para evaluar el tamaño, la morfología y la dispersión de las nanopartículas sintetizadas biogénicamente. Y como se observa en los resultados obtenidos no hay diferencia entre rangos con respecto al tamaño, morfología y dispersión de tamaños.

4.8 Pruebas de desinfección por microdiluciones de AgNPs biogénicamente sintetizadas por el hongo *R. stolonifer* con tres y once días de crecimiento

Para las pruebas de desinfección, se seleccionaron muestras de cada rango y se evaluaron en diferentes concentraciones contra *E. coli* ATCC 8739 y *S. aureus* ATCC 6538. Todas las pruebas mostraron una eficacia del 100% hasta el factor de dilución 4 para *E. coli* y hasta el factor de dilución 8 para *S. aureus* cómo se puede observar en la Figura 21. A partir del factor de dilución 8, la eficacia contra *E. coli* disminuyó drásticamente por debajo del 50%, lo cual es común debido a la mayor resistencia estructural de *E. coli* en comparación con *S. aureus*. Sin embargo, incluso en el factor de dilución 512, la mayoría de las nanopartículas mantuvieron una eficacia del 10%, lo que sigue impidiendo el crecimiento óptimo de estas bacterias. Se observaron excepciones en el caso de *S. aureus*, donde algunas muestras del Rango 2 y Rango 3, específicamente S11-824, S3-320, S11-827 y S11-830, mostraron un incremento en el crecimiento bacteriano a diluciones de 128 y 512. Esto sugiere que, en concentraciones extremadamente bajas, ciertas formulaciones de nanopartículas de plata podrían estar actuando como un nutriente para *S. aureus*, o que no generan suficiente estrés oxidativo para inhibir su crecimiento, permitiendo que las bacterias se adapten. Es necesario realizar una caracterización exhaustiva de las nanopartículas para comprender completamente estos mecanismos y optimizar su uso en la desinfección bacteriana.

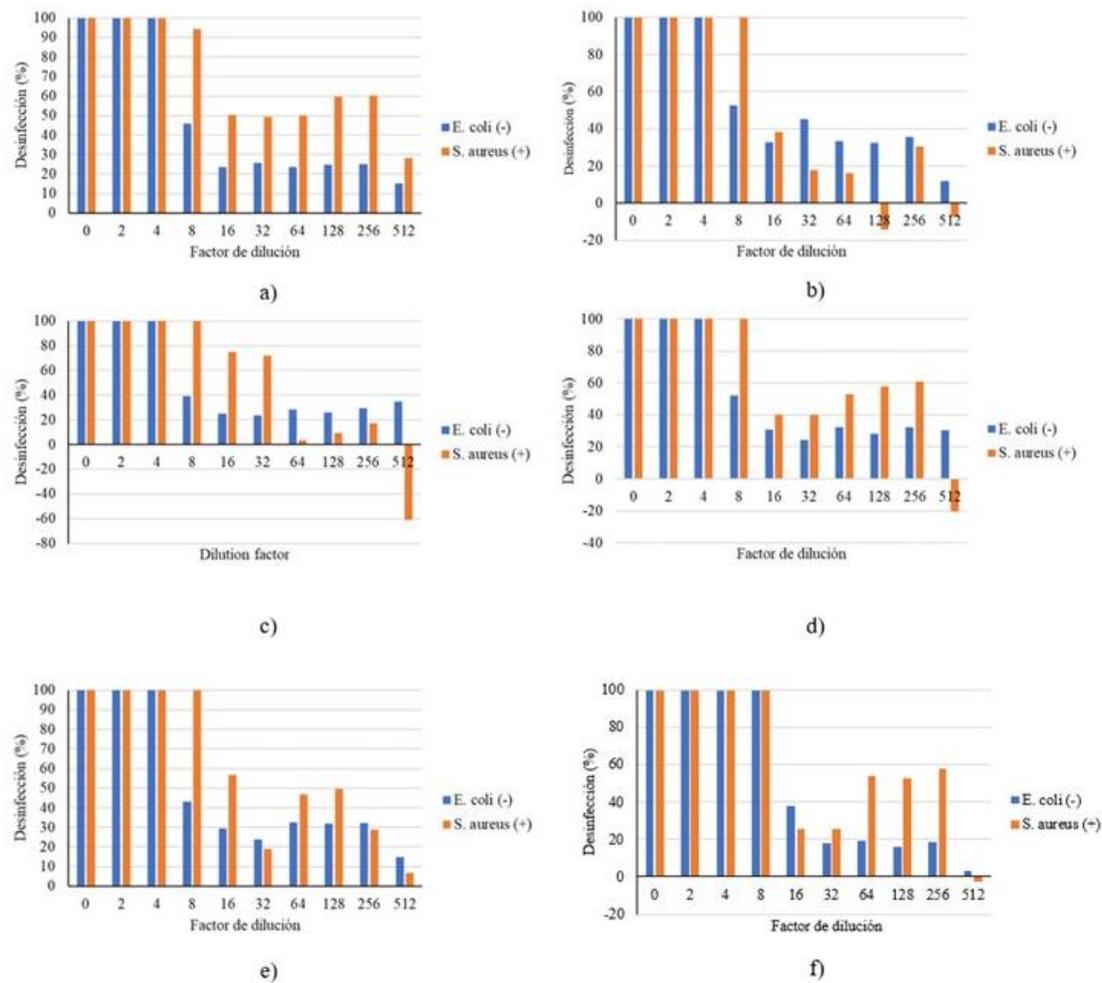


Figura 21. Resultados de las pruebas de desinfección de las AgNPs sintetizadas con extractos de hongo *R. stolonifer* ; a) Rango 1- muestra S3-524, b) Rango 2- muestra S11-830, c) Rango 3- muestra S11-827, d) Rango 3- muestra S3-320, e) Rango 4- muestra S3-430 y f) Rango 4- muestra S11-824.

5 Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

Con los resultados obtenidos de la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) con extractos del hongo *Rhizopus stolonifer* y las caracterizaciones realizadas tanto al extracto como a la síntesis, se llegaron a las siguientes conclusiones: Los hongos actúan de manera individual, lo que implica que su respuesta al estrés y la producción de biomoléculas no dependen directamente del tiempo o de condiciones específicas de estrés. Las diferencias en la estructura y madurez de los hongos entre los días tres y once son significativas; el hongo en el día once muestra mayor estabilidad y mejor adaptación a las condiciones de estrés, lo que permite la producción de biomoléculas con menos variabilidad entre réplicas. Durante la síntesis de nanopartículas de plata, no se observan diferencias significativas entre los hongos de esos días, lo que sugiere que las condiciones de síntesis pueden estandarizarse para obtener resultados consistentes basados en la producción de biomoléculas. Las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas de plata con extractos del hongo *Rhizopus stolonifer* se deben a la concentración adecuada de proteínas y polifenoles, y a la fuerte interacción entre estos componentes, favoreciendo una síntesis eficiente cuando la proporción de proteínas es de 5 a 33 veces mayor que la de los polifenoles. Las nanopartículas sintetizadas muestran coincidencias en rangos específicos de absorción UV con diferentes absorbancias, lo que sugiere que se obtienen nanopartículas de tamaños y morfologías similares sin embargo las caracterizaciones por HRTEM sugieren que la variabilidad de longitud de onda donde absorbe el plasmón está más relacionada a la interacción de las biomoléculas. Todas las nanopartículas demostraron ser eficientes en la desinfección de *E. coli* y *S. aureus* independientemente de su rango UV-vis, logrando una desinfección del 100% con factores de dilución de hasta 4 y 8, respectivamente, sin discriminar entre las diferencias de las nanopartículas de plata. Por lo tanto, aunque la respuesta de los hongos al estrés puede variar dependiendo de su madurez, las condiciones óptimas para la síntesis de nanopartículas de plata se centran en la proporción y concentración de proteínas y polifenoles. Las nanopartículas resultantes son altamente eficientes en la desinfección bacteriana, a pesar de las diferencias morfológicas presentes, lo que subraya la viabilidad de esta metodología para producir agentes antimicrobianos efectivos.

5.2 Recomendaciones

A partir de las conclusiones obtenidas, se pueden hacer las siguientes recomendaciones:

Estandarización de las condiciones de síntesis: Dado que no se observaron diferencias significativas en la síntesis de nanopartículas de plata (AgNPs) entre los hongos en diferentes días, es recomendable estandarizar las condiciones de síntesis basadas en la madurez del hongo y la concentración de biomoléculas. Esto garantizará la obtención de resultados consistentes y reproducibles.

Optimización de la proporción de biomoléculas: La relación entre proteínas y polifenoles es clave para la síntesis eficiente de nanopartículas. Se recomienda ajustar esta proporción para mantener una relación de 5 a 33 veces más proteínas que polifenoles, maximizando la eficiencia de la síntesis y la uniformidad de las nanopartículas.

Monitoreo de la madurez del hongo: Aunque las diferencias en la síntesis de nanopartículas no fueron significativas entre los días tres y once, la madurez del hongo sí afecta la estabilidad y la producción de biomoléculas. Se recomienda monitorear y controlar la etapa de crecimiento del hongo para optimizar la producción de biomoléculas.

Caracterización detallada de las nanopartículas: Aunque las AgNPs mostraron eficacia en la desinfección de *E. coli* y *S. aureus* a pesar de las diferencias morfológicas, es importante continuar realizando caracterizaciones detalladas (como tamaño y forma) para comprender mejor las interacciones entre las nanopartículas y los microorganismos.

Aplicación en desinfección bacteriana: Dado que las nanopartículas demostraron una alta eficacia en la desinfección bacteriana, se recomienda explorar su aplicación en contextos industriales y médicos, especialmente en la lucha contra patógenos como *E. coli* y *S. aureus*.

Investigación sobre el impacto de las nanopartículas en bajas concentraciones: Aunque se observó una alta eficiencia en la desinfección con factores de dilución de hasta 4 y 8, sería útil investigar el comportamiento de las nanopartículas en concentraciones más bajas, para determinar su efectividad a largo plazo y optimizar su uso en aplicaciones donde se requiera una dosificación mínima.

Estudio de otros tipos de hongos o microorganismos: Si bien *Rhizopus stolonifer* demostró ser efectivo para la síntesis de AgNPs, se recomienda estudiar otros hongos o microorganismos para identificar si pueden ofrecer ventajas adicionales en cuanto a la estabilidad, rendimiento o eficiencia en la síntesis de nanopartículas.

6 Referencias

1. Cisneros, B., & Aguilar, L. (2010). *El agua en México: cauces y encauces*.
2. Riojas-Rodríguez, H., Schilman, A., López-Carrillo, L., & Finkelman, J. (2013). La salud ambiental en México: situación actual y perspectivas futuras. *Salud Pública de México*, 55(6), 638. <https://doi.org/10.21149/spm.v55i6.7310>
3. Gaona, R. (2006). El agua en México: El agua en México. *Medio Ambiente y Desarrollo Hacia Un Manejo Sustentable Del Agua, enero-marz*, 96.
4. Seow, T. W., Lim, C. K., Nor, M. H. M., Mubarak, M. F. M., Lam, C. Y., Yahya, A., & Zaharah Ibrahim. (2012). REVIEW ON WASTEWATER TREATMENT TECHNOLOGIES Jayashree Dhote. *International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT)*, 1(5), 1–10.
5. Naganthran, A., Verasoundarapandian, G., Khalid, F. E., Masarudin, M. J., Zulkharnain, A., Nawawi, N. M., Karim, M., Abdullah, C. A. C., & Ahmad, S. A. (2022). Synthesis, Characterization and Biomedical Application of Silver Nanoparticles. *Materials*, 15(2), 427. <https://doi.org/10.3390/ma15020427>
6. Nisar, P., Ali, N., Rahman, L., Ali, M., & Shinwari, Z. K. (2019). Antimicrobial activities of biologically synthesized metal nanoparticles: an insight into the mechanism of action. *JBIC Journal Of Biological Inorganic Chemistry*, 24(7), 929-941. <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01717-7>
7. Mohapatra, T., Agrawal, M., & Ghosh, P. (2023). An overview of plant-mediated biogenic synthesis of nano-catalysts and their application in Fenton and photo-Fenton processes for wastewater remediation. *Chemical Engineering Journal*, 477, 146941. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.146941>
8. Algebaly, A. S., Mohammed, A. E., Abutaha, N., & Elobeid, M. M. (2020). Biogenic synthesis of silver nanoparticles: Antibacterial and cytotoxic potential. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, 27(5), 1340-1351. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.12.014>
9. Irfan, M., Moniruzzaman, M., Ahmad, T., Mandal, P. C., Bhattacharjee, S., & Abdullah, B. (2017). Ionic liquid based extraction of flavonoids from *Elaeis guineensis* leaves and their applications for gold nanoparticles synthesis. *Journal Of Molecular Liquids*, 241, 270-278. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.05.151>
10. Jamzad, M., & Bidkorpeh, M. K. (2020). Green synthesis of iron oxide nanoparticles by the aqueous extract of *Laurus nobilis* L. leaves and evaluation of the antimicrobial activity. *Journal Of Nanostructure In Chemistry*, 10(3), 193-201. <https://doi.org/10.1007/s40097-020-00341-1>
11. Majumder, A., Ramrakhiani, L., Mukherjee, D., Mishra, U., Halder, A., Mandal, A. K., & Ghosh, S. (2019). Green synthesis of iron oxide nanoparticles for arsenic remediation in water and sludge utilization. *Clean Technologies And Environmental Policy*, 21(4), 795-813. <https://doi.org/10.1007/s10098-019-01669-1>
12. Bouafia, A., & Laouini, S. E. (2020). Green synthesis of iron oxide nanoparticles by aqueous leaves extract of *Mentha Pulegium* L.: Effect of ferric chloride concentration on the type of product. *Materials Letters*, 265, 127364. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2020.127364>

13. Bhakya, S., Muthukrishnan, S., Sukumaran, M., & Muthukumar, M. (2015). Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their antioxidant and antibacterial activity. *Applied Nanoscience*, 6(5), 755-766. <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0473-z>
14. Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D., & Lightfoot, D. (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*, 6(4), 42. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
15. Attallah, N. G. M., Elekhawy, E., Negm, W. A., Hussein, I. A., Mokhtar, F. A., & Al-Fakhrany, O. M. (2022). In Vivo and In Vitro Antimicrobial Activity of Biogenic Silver Nanoparticles against Staphylococcus aureus Clinical Isolates. *Pharmaceuticals*, 15(2), 194. <https://doi.org/10.3390/ph15020194>
16. Karimi, F., Tiri, R. N. E., Aygun, A., Gulbagca, F., Özdemir, S., Gonca, S., Gur, T., & Sen, F. (2023). One-step synthesized biogenic nanoparticles using Linum usitatissimum: Application of sun-light photocatalytic, biological activity and electrochemical H₂O₂ sensor. *Environmental Research*, 218, 114757. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114757>
17. De Lima Barizão, A. C., Silva, M. F., Andrade, M., Brito, F. C., Gomes, R. G., & Bergamasco, R. (2020). Green synthesis of iron oxide nanoparticles for tartrazine and bordeaux red dye removal. *Journal Of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), 103618. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103618>
18. Baruah, D., Goswami, M., Yadav, R. N. S., Yadav, A., & Das, A. M. (2018). Biogenic synthesis of gold nanoparticles and their application in photocatalytic degradation of toxic dyes. *Journal Of Photochemistry And Photobiology B Biology*, 186, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.07.002>
19. Alowaiesh, B. F., Alhaithloul, H. A. S., Saad, A. M., & Hassanin, A. A. (2023). Green Biogenic of Silver Nanoparticles Using Polyphenolic Extract of Olive Leaf Wastes with Focus on Their Anticancer and Antimicrobial Activities. *Plants*, 12(6), 1410. <https://doi.org/10.3390/plants12061410>
20. Mashwani, Z., Khan, M. A., Khan, T., & Nadhman, A. (2016). Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles. *Advances In Colloid And Interface Science*, 234, 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2016.04.008>
21. Buarki, F., AbuHassan, H., Hannan, F. A., & Henari, F. Z. (2022). Green Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Using Hibiscus rosa sinensis Flowers and Their Antibacterial Activity. *Journal Of Nanotechnology*, 2022, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2022/5474645>
22. Martínez-Cabanas, M., López-García, M., Barriada, J. L., Herrero, R., & De Vicente, M. E. S. (2016). Green synthesis of iron oxide nanoparticles. Development of magnetic hybrid materials for efficient As(V) removal. *Chemical Engineering Journal*, 301, 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.04.149>
23. Asrafuzzaman, F., Amin, K. F., Gafur, M. A., & Gulshan, F. (2023). Mangifera indica mediated biogenic synthesis of undoped and doped TiO₂ nanoparticles and evaluation of their structural, morphological, and photocatalytic properties. *Results In Materials*, 17, 100384. <https://doi.org/10.1016/j.rinma.2023.100384>
24. Das, B., Lou-Franco, J., Gilbride, B., Ellis, M. G., Stewart, L. D., Grant, I. R., Balasubramanian, P., & Cao, C. (2022). Peroxidase-Mimicking Activity of Biogenic Gold Nanoparticles Produced from Prunus nepalensis Fruit Extract: Characterizations and Application for the Detection of Mycobacterium bovis. *ACS Applied Bio Materials*, 5(6), 2712-2725. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00180>

25. Gholami, A., Mousavi, S. M., Shomali, A., Hashemi, S. A., Abootalebi, S. N., Chiang, W., Barzegar, A., Shokripor, M., & Zadeh, A. M. (2022). One-Step Ferula-Mediated Synthesis of Biogenic Silver Nanoparticles with More Antimicrobial Effect and Promising Human Cell Biocompatibility. *Journal Of Nanomaterials*, 2022(1). <https://doi.org/10.1155/2022/5938952>
26. Din, M. I., Rizwan, R., Hussain, Z., & Khalid, R. (2020). Biogenic synthesis of mono dispersed Co/CoO nanoparticles using Syzygium cumini leaves for catalytic application. *Inorganic And Nano-Metal Chemistry*, 51(6), 773-779. <https://doi.org/10.1080/24701556.2020.1808993>
27. Chandraker, S. K., Lal, M., Khanam, F., Dhruve, P., Singh, R. P., & Shukla, R. (2022). Therapeutic potential of biogenic and optimized silver nanoparticles using Rubia cordifolia L. leaf extract. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12878-y>
28. Singh, K., Nancy, N., Singh, G., & Singh, J. (2023). Sustainable synthesis of biogenic ZnO NPs for mitigation of emerging pollutants and pathogens. *Environmental Research*, 219, 114952. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114952>
29. Balasubramanian, S., Kala, S. M. J., & Pushparaj, T. L. (2020). Biogenic synthesis of gold nanoparticles using Jasminum auriculatum leaf extract and their catalytic, antimicrobial and anticancer activities. *Journal Of Drug Delivery Science And Technology*, 57, 101620. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101620>
30. Ishak, N. A. I. M., Kamarudin, S. K., Timmiati, S. N., Sauid, S. M., Karim, N. A., & Basri, S. (2023). Green synthesis of platinum nanoparticles as a robust electrocatalyst for methanol oxidation reaction: Metabolite profiling and antioxidant evaluation. *Journal Of Cleaner Production*, 382, 135111. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.135111>
31. Hashim, N., Paramasivam, M., Tan, J. S., Kernain, D., Hussin, M. H., Brosse, N., Gambier, F., & Raja, P. B. (2020). Green mode synthesis of silver nanoparticles using Vitis vinifera's tannin and screening its antimicrobial activity / apoptotic potential versus cancer cells. *Materials Today Communications*, 25, 101511. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101511>
32. Demirezen, D. A., Yıldız, Y. Ş., Yılmaz, Ş., & Yılmaz, D. D. (2019). Green synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles using Ficus carica (common fig) dried fruit extract. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 127(2), 241-245. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.07.024>
33. Bishnoi, S., Kumar, A., & Selvaraj, R. (2018). Facile synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles using inedible Cynometra ramiflora fruit extract waste and their photocatalytic degradation of methylene blue dye. *Materials Research Bulletin*, 97, 121-127. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2017.08.040>
34. Aisida, S. O., Madubonu, N., Alnasir, M. H., Ahmad, I., Botha, S., Maaza, M., & Ezema, F. I. (2019). Biogenic synthesis of iron oxide nanorods using Moringa oleifera leaf extract for antibacterial applications. *Applied Nanoscience*, 10(1), 305-315. <https://doi.org/10.1007/s13204-019-01099-x>
35. Karpagavinayagam, P., & Vedhi, C. (2019). Green synthesis of iron oxide nanoparticles using Avicennia marina flower extract. *Vacuum*, 160, 286-292. <https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2018.11.043>
36. Abdullah, J. A. A., Eddine, L. S., Abderrhmane, B., Alonso-González, M., Guerrero, A., & Romero, A. (2020). Green synthesis and characterization of iron oxide

- nanoparticles by pheonix dactylifera leaf extract and evaluation of their antioxidant activity. *Sustainable Chemistry And Pharmacy*, 17, 100280. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100280>
37. Devi, H. S., Boda, M. A., Shah, M. A., Parveen, S., & Wani, A. H. (2019). Green synthesis of iron oxide nanoparticles using Platanus orientalis leaf extract for antifungal activity. *Green Processing And Synthesis*, 8(1), 38-45. <https://doi.org/10.1515/gps-2017-0145>
 38. Üstün, E., Önbaşı, S., Çelik, S. K., Ayvaz, M. Ç., & Şahin, N. (2021). Green Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles by Using Ficus Carica Leaf Extract and Its Antioxidant Activity. *Biointerface Research In Applied Chemistry*, 12(2), 2108-2116. <https://doi.org/10.33263/briac122.21082116>
 39. Gomaa, E. Z. (2017). Antimicrobial, antioxidant and antitumor activities of silver nanoparticles synthesized by Allium cepa extract: A green approach. *Journal Of Genetic Engineering And Biotechnology*, 15(1), 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.002>
 40. Gur, T., Meydan, I., Seckin, H., Bekmezci, M., & Sen, F. (2022). Green synthesis, characterization and bioactivity of biogenic zinc oxide nanoparticles. *Environmental Research*, 204, 111897. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111897>
 41. Al-Shabib, N. A., Husain, F. M., Ahmed, F., Khan, R. A., Ahmad, I., Alsharaeh, E., Khan, M. S., Hussain, A., Rehman, M. T., Yusuf, M., Hassan, I., Khan, J. M., Ashraf, G. M., Alsalmeh, A., Al-Ajmi, M. F., Tarasov, V. V., & Aliev, G. (2016). Biogenic synthesis of Zinc oxide nanostructures from Nigella sativa seed: Prospective role as food packaging material inhibiting broad-spectrum quorum sensing and biofilm. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep36761>
 42. Arya, S., Mahajan, P., Mahajan, S., Khosla, A., Datt, R., Gupta, V., Young, S., & Oruganti, S. K. (2021). Review—Influence of Processing Parameters to Control Morphology and Optical Properties of Sol-Gel Synthesized ZnO Nanoparticles. *ECS Journal Of Solid State Science And Technology*, 10(2), 023002. <https://doi.org/10.1149/2162-8777/abe095>
 43. Ali, A., Shah, T., Ullah, R., Zhou, P., Guo, M., Ovais, M., Tan, Z., & Rui, Y. (2021). Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications. *Frontiers In Chemistry*, 9. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.629054>
 44. Singh, J. P., Kumar, M., Sharma, A., Pandey, G., Chae, K. H., & Lee, S. (2020). Bottom-Up and Top-Down Approaches for MgO. In *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91182>
 45. Desai, M. P., Sangaokar, G. M., & Pawar, K. D. (2018). Kokum fruit mediated biogenic gold nanoparticles with photoluminescent, photocatalytic and antioxidant activities. *Process Biochemistry*, 70, 188-197. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.03.027>
 46. Patil, M. P., Bayara, E., Subedi, P., Piad, L. L. A., Tarte, N. H., & Kim, G. (2019). Biogenic synthesis, characterization of gold nanoparticles using Lonicera japonica and their anticancer activity on HeLa cells. *Journal Of Drug Delivery Science And Technology*, 51, 83-90. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.021>
 47. Banu, R., Reddy, G. B., Ayodhya, D., Ramakrishna, D., & Kotu, G. M. (2023). Biogenic Pd-nanoparticles from Lantana trifolia seeds extract: Synthesis,

- characterization, and catalytic reduction of textile dyes. *Results In Chemistry*, 5, 100737. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2022.100737>
48. Bhuiyan, M. S. H., Miah, M. Y., Paul, S. C., Aka, T. D., Saha, O., Rahaman, M. M., Sharif, M. J. I., Habiba, O., & Ashaduzzaman, M. (2020). Green synthesis of iron oxide nanoparticle using *Carica papaya* leaf extract: application for photocatalytic degradation of remazol yellow RR dye and antibacterial activity. *Heliyon*, 6(8), e04603. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04603>
 49. Sajid, M., & Płotka-Wasyłka, J. (2020). Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences. *Microchemical Journal*, 154, 104623. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104623>
 50. Tehri, N., Vashishth, A., Gahlaut, A., & Hooda, V. (2020). Biosynthesis, antimicrobial spectra and applications of silver nanoparticles: current progress and future prospects. *Inorganic And Nano-Metal Chemistry*, 52(1), 1-19. <https://doi.org/10.1080/24701556.2020.1862212>
 51. Adeeyo, A. O., & Odiyo, J. O. (2018). Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticle from Mushroom Exopolysaccharides and its Potentials in Water Purification. *Open Chemistry Journal*, 5(1), 64-75. <https://doi.org/10.2174/1874842201805010064>
 52. Gomaa, S. K., Zaki, R. A., El-Behery, R. R., & El-Refai, H. A. (2022). Eco-Friendly Biogenic Synthesis of Metallic MgO Nanoparticles as Potent Antibacterial and Antibiofilm. *Research Journal Of Pharmacy And Technology*, 63-70. <https://doi.org/10.52711/0974-360x.2022.00012>
 53. Hamouda, R. A., Alharthi, M. A., Alotaibi, A. S., Alenzi, A. M., Albalawi, D. A., & Makharita, R. R. (2023). Biogenic Nanoparticles Silver and Copper and Their Composites Derived from Marine Alga *Ulva lactuca*: Insight into the Characterizations, Antibacterial Activity, and Anti-Biofilm Formation. *Molecules*, 28(17), 6324. <https://doi.org/10.3390/molecules28176324>
 54. Joshi, N. C., & Prakash, Y. A. S. H. W. A. N. I. (2019). Leaves extract-based biogenic synthesis of cupric oxide nanoparticles, characterizations, and antimicrobial activity. *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 12, 288-291.
 55. Kato, Y., & Suzuki, M. (2020). Synthesis of Metal Nanoparticles by Microorganisms. *Crystals*, 10(7), 589. <https://doi.org/10.3390/cryst10070589>
 56. Salem, S. S., Ali, O. M., Reyad, A. M., Abd-Elsalam, K. A., & Hashem, A. H. (2022). *Pseudomonas indica*-Mediated Silver Nanoparticles: Antifungal and Antioxidant Biogenic Tool for Suppressing Mucormycosis Fungi. *Journal Of Fungi*, 8(2), 126. <https://doi.org/10.3390/jof8020126>
 57. Ovais, M., Khalil, A., Ayaz, M., Ahmad, I., Nethi, S., & Mukherjee, S. (2018). Biosynthesis of Metal Nanoparticles via Microbial Enzymes: A Mechanistic Approach. *International Journal Of Molecular Sciences*, 19(12), 4100. <https://doi.org/10.3390/ijms19124100>
 58. Al-Dbass, A. M., Daihan, S. A., Al-Nasser, A. A., Al-Suhaibani, L. S., Almusallam, J., Alnwisser, B. I., Saloum, S., Alotaibi, R. S., Alessa, L. A., & Bhat, R. S. (2022). Biogenic Silver Nanoparticles from Two Varieties of *Agaricus bisporus* and Their Antibacterial Activity. *Molecules*, 27(21), 7656. <https://doi.org/10.3390/molecules27217656>
 59. Zhang, X., Qu, Y., Shen, W., Wang, J., Li, H., Zhang, Z., Li, S., & Zhou, J. (2016). Biogenic synthesis of gold nanoparticles by yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1 for

- catalytic reduction of nitrophenols. *Colloids And Surfaces A Physicochemical And Engineering Aspects*, 497, 280-285. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.02.033>
60. Gopinath, V., Priyadarshini, S., Loke, M. F., Arunkumar, J., Marsili, E., MubarakAli, D., Velusamy, P., & Vadivelu, J. (2017). Biogenic synthesis, characterization of antibacterial silver nanoparticles and its cell cytotoxicity. *Arabian Journal Of Chemistry*, 10(8), 1107-1117. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.011>
 61. Haidri, I., Shahid, M., Hussain, S., Shahzad, T., Mahmood, F., Hassan, M. U., Al-Khayri, J. M., Aldaej, M. I., Sattar, M. N., Rezk, A. A., Almaghasla, M. I., & Shehata, W. F. (2023). Efficacy of Biogenic Zinc Oxide Nanoparticles in Treating Wastewater for Sustainable Wheat Cultivation. *Plants*, 12(17), 3058. <https://doi.org/10.3390/plants12173058>
 62. Mansoor, A., Khan, M. T., Mehmood, M., Khurshid, Z., Ali, M. I., & Jamal, A. (2022). Synthesis and Characterization of Titanium Oxide Nanoparticles with a Novel Biogenic Process for Dental Application. *Nanomaterials*, 12(7), 1078. <https://doi.org/10.3390/nano12071078>
 63. Wilson, J. J., Harimuralikrishnaa, T., Sivakumar, T., Mahendran, S., Ponmanickam, P., Thangaraj, R., Sevarkodiyone, S., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Venkidasamy, B., Thiruvengadam, M., & Govindasamy, R. (2023). Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Pantoea stewartii* and *Priestia aryabhatai* and Their Antimicrobial, Larvicidal, Histopathological, and Biototoxicity Potential. *Bioengineering*, 10(2), 248. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10020248>
 64. Tufail, M. S., Liaqat, I., Andleeb, S., Naseem, S., Zafar, U., Sadiqa, A., Liaqat, I., Ali, N. M., Bibi, A., Arshad, N., & Saleem, G. (2022). Biogenic Synthesis, Characterization and Antibacterial Properties of Silver Nanoparticles against Human Pathogens. *Journal Of Oleo Science*, 71(2), 257-265. <https://doi.org/10.5650/jos.ess21291>
 65. Cunha, F. A., Da C S o Cunha, M., Da Frota, S. M., Mallmann, E. J. J., Freire, T. M., Costa, L. S., Paula, A. J., Menezes, E. A., & Fechine, P. B. A. (2018). Biogenic synthesis of multifunctional silver nanoparticles from *Rhodotorula glutinis* and *Rhodotorula mucilaginosa*: antifungal, catalytic and cytotoxicity activities. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 34(9). <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2514-8>
 66. Wypij, M., Czarnecka, J., Świecimska, M., Dahm, H., Rai, M., & Golinska, P. (2018). Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of biogenic silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 34(2). <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2406-3>
 67. Eze, F. N., & Nwabor, O. F. (2020). Valorization of *Pichia* spent medium via one-pot synthesis of biocompatible silver nanoparticles with potent antioxidant, antimicrobial, tyrosinase inhibitory and reusable catalytic activities. *Materials Science And Engineering C*, 115, 111104. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111104>
 68. Bai, R. G., Muthoosamy, K., Shipton, F. N., Pandikumar, A., Rameshkumar, P., Huang, N. M., & Manickam, S. (2016). The biogenic synthesis of a reduced graphene oxide–silver (RGO–Ag) nanocomposite and its dual applications as an antibacterial agent and cancer biomarker sensor. *RSC Advances*, 6(43), 36576-36587. <https://doi.org/10.1039/c6ra02928k>

69. Deepa, T., Gangwane, A. K., Sayyed, R. Z., Jadhav, H. P., & Mehjabeen, N. (2020). Optimization and scale-up of laccase production by *Bacillus* sp. BAB-4151 isolated from the waste of the soap industry. *Environmental Sustainability*, 3(4), 471-479. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00135-9>
70. Rayhane, H., Josiane, M., Gregoria, M., Yiannis, K., Nathalie, D., Ahmed, M., & Sevastianos, R. (2019). From flasks to single used bioreactor: Scale-up of solid state fermentation process for metabolites and conidia production by *Trichoderma asperellum*. *Journal Of Environmental Management*, 252, 109496. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109496>
71. El-Moslamy, S. H. (2018). Bioprocessing strategies for cost-effective large-scale biogenic synthesis of nano-MgO from endophytic *Streptomyces coelicolor* strain E72 as an anti-multidrug-resistant pathogens agent. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22134-x>
72. Hamadamin, S. I., Anwer, S. S., Abdulkareem, P. M., & Sdiq, K. H. (2022). Biogenic synthesis of ferrous(III) oxide and Fe₃O₄/SiO₂ using *Chlorella* sp. and its adsorption properties of water contaminated with copper(II) ions. *Bulletin Of The Chemical Society Of Ethiopia*, 36(3), 585-596. <https://doi.org/10.4314/bcse.v36i3.8>
73. Francis, D. V., Aiswarya, T., & Gokhale, T. (2022). Optimization of the incubation parameters for biogenic synthesis of WO₃ nanoparticles using Taguchi method. *Heliyon*, 8(9), e10640. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10640>
74. Salem, S. S., & Fouda, A. (2020). Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Prospective Biotechnological Applications: an Overview. *Biological Trace Element Research*, 199(1), 344-370. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02138-3>
75. Sharma, S., Sharma, N., & Kaushal, N. (2022). Comparative Account of Biogenic Synthesis of Silver Nanoparticles Using Probiotics and Their Antimicrobial Activity Against Challenging Pathogens. *BioNanoScience*, 12(3), 833-840. <https://doi.org/10.1007/s12668-022-01004-x>
76. AbdelRahim, K., Mahmoud, S. Y., Ali, A. M., Almaary, K. S., Mustafa, A. E. M., & Husseiny, S. M. (2017). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, 24(1), 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.02.025>
77. Gudikandula, K., Vadapally, P., & Charya, M. S. (2017). Biogenic synthesis of silver nanoparticles from white rot fungi: Their characterization and antibacterial studies. *OpenNano*, 2, 64-78. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2017.07.002>
78. Vinosha, M., Palanisamy, S., Muthukrishnan, R., Selvam, S., Kannapiran, E., You, S., & Prabhu, N. M. (2019). Biogenic synthesis of gold nanoparticles from *Halymenia dilatata* for pharmaceutical applications: Antioxidant, anti-cancer and antibacterial activities. *Process Biochemistry*, 85, 219-229. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.07.013>
79. Bhattacharya, P., Swarnakar, S., Ghosh, S., Majumdar, S., & Banerjee, S. (2019). Disinfection of drinking water via algae mediated green synthesized copper oxide nanoparticles and its toxicity evaluation. *Journal Of Environmental Chemical Engineering*, 7(1), 102867. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.102867>
80. Durán, N., Fávoro, W., Alborés, S., Da Costa, T., & Tasic, L. (2023). Biogenic Silver Nanoparticles Capped with Proteins: Timed Knowledge and Perspectives. *Journal Of The Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230062>

81. Nie, P., Zhao, Y., & Xu, H. (2023). Synthesis, applications, toxicity and toxicity mechanisms of silver nanoparticles: A review. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, 253, 114636. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2023.114636>
82. Pryshchepa, O., Pomastowski, P., & Buszewski, B. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. *Advances In Colloid And Interface Science*, 284, 102246. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102246>
83. Bandala, E. R., Stanasic, D., & Tasic, L. (2020). Biogenic nanomaterials for photocatalytic degradation and water disinfection: a review. *Environmental Science Water Research & Technology*, 6(12), 3195-3213. <https://doi.org/10.1039/d0ew00705f>
84. Noman, E. A., Al-Gheethi, A., Al-Sahari, M., Mohamed, R. M. S. R., Crane, R., Aziz, N. A. A., & Govarthanan, M. (2022). Challenges and opportunities in the application of bioinspired engineered nanomaterials for the recovery of metal ions from mining industry wastewater. *Chemosphere*, 308, 136165. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136165>
85. De Gusseme, B., Hennebel, T., Christiaens, E., Saveyn, H., Verbeken, K., Fitts, J. P., Boon, N., & Verstraete, W. (2011). Virus disinfection in water by biogenic silver immobilized in polyvinylidene fluoride membranes. *Water Research*, 45(4), 1856-1864. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.046>
86. Rajiv, P., Bavadharani, B., Kumar, M. N., & Vanathi, P. (2017). Synthesis and characterization of biogenic iron oxide nanoparticles using green chemistry approach and evaluating their biological activities. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 12, 45-49. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.08.015>
87. Adhikari, A., Chhetri, K., Acharya, D., Pant, B., & Adhikari, A. (2022). Green Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles Using Psidium guajava L. Leaves Extract for Degradation of Organic Dyes and Anti-microbial Applications. *Catalysts*, 12(10), 1188. <https://doi.org/10.3390/catal12101188>
88. R. Fouladi-Fard, R. Aali, S. Mohammadi-Aghdam, S. Mortazavi-derazkola, The surface modification of spherical ZnO with Ag nanoparticles: A novel agent, biogenic synthesis, catalytic and antibacterial activities, *Arab. J. Chem.* 15 (2022) 103658. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103658>.
89. Kadosh, D., & Mundodi, V. (2020). A Re-Evaluation of the Relationship between Morphology and Pathogenicity in Candida Species. *Journal Of Fungi*, 6(1), 13. <https://doi.org/10.3390/jof6010013>
90. Rudramurthy, S. M., Paul, R. A., Chakrabarti, A., Mouton, J. W., & Meis, J. F. (2019). Invasive Aspergillosis by *Aspergillus flavus*: Epidemiology, Diagnosis, Antifungal Resistance, and Management. *Journal Of Fungi*, 5(3), 55. <https://doi.org/10.3390/jof5030055>
91. Pfaller, M. A., Diekema, D. J., Colombo, A. L., Kibbler, C., Ng, K. P., Gibbs, D. L., & Newell, V. A. (2006). *Candida rugosa*, an Emerging Fungal Pathogen with Resistance to Azoles: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. *Journal Of Clinical Microbiology*, 44(10), 3578-3582. <https://doi.org/10.1128/jcm.00863-06>
92. Nji, Q. N., Babalola, O. O., & Mwanza, M. (2023). Soil *Aspergillus* Species, Pathogenicity and Control Perspectives. *Journal Of Fungi*, 9(7), 766. <https://doi.org/10.3390/jof9070766>

93. Solairaj, D., Legrand, N. N. G., Yang, Q., & Zhang, H. (2020). Isolation of pathogenic fungi causing postharvest decay in table grapes and in vivo biocontrol activity of selected yeasts against them. *Physiological And Molecular Plant Pathology*, *110*, 101478. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101478>
94. Pereira, V. J., Basílio, M. C., Fernandes, D., Domingues, M., Paiva, J. M., Benoliel, M. J., Crespo, M. T., & Romão, M. V. S. (2009). Occurrence of filamentous fungi and yeasts in three different drinking water sources. *Water Research*, *43*(15), 3813-3819. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.05.024>
95. Gorthi, L. V. (2019). Morphological Classification of Fungal Infections (Yeasts, Mold, Dimorphic). En *Springer eBooks* (pp. 23-30). https://doi.org/10.1007/978-3-030-06088-6_3
96. Borman, A. M., Mohammed, S., Palmer, M. D., Childs, N., & Johnson, E. M. (2022). The importance of appropriate processing and direct microscopic examination for the timely diagnosis and management of invasive infections caused by filamentous fungi. *Medical Mycology*, *60*(12). <https://doi.org/10.1093/mmy/myac081>
97. Van Dyke, M. C. C., Teixeira, M. M., & Barker, B. M. (2019). Fantastic yeasts and where to find them: the hidden diversity of dimorphic fungal pathogens. *Current Opinion In Microbiology*, *52*, 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.05.002>
98. Bhattacharya, S., Sae-Tia, S., & Fries, B. C. (2020). Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. *Antibiotics*, *9*(6), 312. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312>
99. Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, *35*(10). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>
100. Ahmad, W., Jaiswal, K. K., & Amjad, M. (2020). Euphorbia herita leaf extract as a reducing agent in a facile green synthesis of iron oxide nanoparticles and antimicrobial activity evaluation. *Inorganic And Nano-Metal Chemistry*, 1-8. <https://doi.org/10.1080/24701556.2020.1815062>
101. Contreras, T. S., Íñiguez-Moreno, M., Sánchez, L. G., Sánchez, J. A. R., Zapata, J. A. N., & Santoyo, M. C. (2022). Effect of temperature on the interaction between *Rhizopus stolonifer* and *Colletotrichum* sp., postharvest pathogens of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). *Nova Scientia*. <https://doi.org/10.21640/ns.v14i28.2966>
102. Rohman, A., Windarsih, A., Lukitaningsih, E., Rafi, M., Betania, K., & Fadzillah, N. A. (2020). The use of FTIR and Raman spectroscopy in combination with chemometrics for analysis of biomolecules in biomedical fluids: A review. *Biomedical Spectroscopy And Imaging*, *8*(3-4), 55-71. <https://doi.org/10.3233/bsi-200189>
103. Geană, E., Ciucure, C. T., Apetrei, C., & Artem, V. (2019). Application of Spectroscopic UV-Vis and FT-IR Screening Techniques Coupled with Multivariate Statistical Analysis for Red Wine Authentication: Varietal and Vintage Year Discrimination. *Molecules*, *24*(22), 4166. <https://doi.org/10.3390/molecules24224166>
104. Lübeck, M., & Lübeck, P. S. (2022). Fungal Cell Factories for Efficient and Sustainable Production of Proteins and Peptides. *Microorganisms*, *10*(4), 753. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040753>

105. Meyer, V., Cairns, T., Barthel, L., King, R., Kunz, P., Schmideder, S., Müller, H., Briesen, H., Dinius, A., & Krull, R. (2021). Understanding and controlling filamentous growth of fungal cell factories: novel tools and opportunities for targeted morphology engineering. *Fungal Biology And Biotechnology*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s40694-021-00115-6>
106. Asadollahzadeh, M., Ghasemian, A., Saraeian, A., Resalati, H., & Taherzadeh, M. J. (2018). Production of fungal biomass protein by filamentous fungi cultivation on liquid waste streams from pulping process. *BioResources*, 13(3), 5013-5031.
107. Xiao, W., Zhang, J., Huang, J., Xin, C., Li, M. J., & Song, Z. (2022). Response and regulatory mechanisms of heat resistance in pathogenic fungi. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 106(17), 5415-5431. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12119-2>
108. Hang, Y., Wang, A., & Wu, N. (2024). Plasmonic silver and gold nanoparticles: shape- and structure-modulated plasmonic functionality for point-of-care sensing, bio-imaging and medical therapy. *Chemical Society Reviews*, 53(6), 2932-2971. <https://doi.org/10.1039/d3cs00793f>
109. Sharma, N. K., Vishwakarma, J., Rai, S., Alomar, T. S., AlMasoud, N., & Bhattarai, A. (2022). Green Route Synthesis and Characterization Techniques of Silver Nanoparticles and Their Biological Adeptness. *ACS Omega*, 7(31), 27004-27020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c01400>
110. Naveen, K. V., Sathiyaseelan, A., Mariadoss, A. V. A., Xiaowen, H., Saravanakumar, K., & Wang, M. H. (2021). Fabrication of mycogenic silver nanoparticles using endophytic fungal extract and their characterization, antibacterial and cytotoxic activities. *Inorganic Chemistry Communications*, 128, 108575.
111. Stabile, J., Najafali, D., Cheema, Y., Inglut, C. T., Liang, B. J., Vaja, S., Sorrin, A. J., & Huang, H. (2020). Engineering gold nanoparticles for photothermal therapy, surgery, and imaging. *En Elsevier eBooks* (pp. 175-193). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816662-8.00012-6>
112. Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: Optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal Of Advanced Research*, 1(1), 13-28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2010.02.002>
113. Sharma, V. K., Yngard, R. A., & Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances In Colloid And Interface Science*, 145(1-2), 83-96. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.09.002>
114. Magdy, G., Aboelkassim, E., Elhaleem, S. M. A., & Belal, F. (2024). A comprehensive review on silver nanoparticles: Synthesis approaches, characterization techniques, and recent pharmaceutical, environmental, and antimicrobial applications. *Microchemical Journal*, 196, 109615. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109615>

6. Anexos

Tabla S1. Cinética de producción de biomasa del hongo *R. stolonifer* cultivado en PDA.

Tiempo (Días)	Biomasa (g)	Desviación estándar
0	0	0
1	0.016	0.004
2	0.119	0.007
3	0.180	0.016
4	0.161	0.023
5	0.133	0.008
6	0.169	0.015
7	0.136	0.010
8	0.121	0.019
9	0.132	0.018
10	0.159	0.016
11	0.125	0.008

Tabla S2. Concentración de polifenoles cuantificada de los diferentes extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento.

Código de muestra	Horas de estrés	Replica	Polifenoles [mg/mL]	Promedio	Desviación estándar
E3-2a	2	a	0.133	0.078	0.051
E3-2b		b	0.109		
E3-2c		c	0.046		
E3-2d		d	0.024		
E3-24a	24	a	0.150	0.136	0.067
E3-24b		b	0.226		
E3-24c		c	0.096		
E3-24d		d	0.074		
E3-48a	48	a	0.065	0.121	0.062
E3-48b		b	0.167		
E3-48c		c	0.181		
E3-48d		d	0.070		
E3-72a	72	a	0.087	0.174	0.084
E3-72b		b	0.117		
E3-72c		c	0.259		

E3-72d		d	0.232		
E3-96a	96	a	0.172	0.147	0.056
E3-96b		b	0.190		
E3-96c		c	0.160		
E3-96d		d	0.065		

Tabla S3. Concentración de proteínas cuantificada de los diferentes extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento.

Código de muestra	Horas de estrés	No. De muestra	Proteínas [mg/mL]	Promedio	Desviación estándar
E3-2a	2	a	0.512	0.828	0.240
E3-2b		b	1.069		
E3-2c		c	0.943		
E3-2d		d	0.788		
E3-24a	24	a	0.863	1.043	0.349
E3-24b		b	1.567		
E3-24c		c	0.879		
E3-24d		d	0.863		
E3-48a	48	a	1.476	1.304	0.163
E3-48b		b	1.094		
E3-48c		c	1.375		
E3-48d		d	1.271		
E3-72a	72	a	0.856	1.195	0.323
E3-72b		b	1.270		
E3-72c		c	1.048		
E3-72d		d	1.608		
E3-96a	96	a	1.133	0.723	0.275
E3-96b		b	0.552		
E3-96c		c	0.627		
E3-96d		d	0.580		

Tabla S4. Concentración de polifenoles cuantificada de los diferentes extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento.

Código de muestra	Horas de estrés	Replica	Polifenoles [mg/mL]	Promedio	Desviación estándar
E11-2a	2	a	-	-	-
E11-2b		b	-		
E11-2c		c	-		
E11-2d		d	0.131		
E11-24a	24	a	0.093	0.089	0.02
E11-24b		b	0.113		
E11-24c		c	0.081		

E11-24d		d	0.069		
E11-48a	48	a	0.054	0.078	0.02
E11-48b		b	0.074		
E11-48c		c	0.073		
E11-48d		d	0.109		
E11-72a	72	a	0.084	0.101	0.01
E11-72b		b	0.114		
E11-72c		c	0.109		
E11-72d		d	0.097		
E11-96a	96	a	-	0.099	0.04
E11-96b		b	0.061		
E11-96c		c	0.134		
E11-96d		d	0.101		

Tabla S5. Concentración de proteínas cuantificada de los diferentes extractos de hongo *R. stolonifer* con tres días de crecimiento.

Código de muestra	Horas de estrés	No. De muestra	Proteínas [mg/mL]	Promedio	Desviación estándar
E11-2a	2	a	1.181	1.022	0.23
E11-2b		b	0.757		
E11-2c		c	0.906		
E11-2d		d	1.243		
E11-24a	24	a	0.769	0.836	0.10
E11-24b		b	0.728		
E11-24c		c	0.899		
E11-24d		d	0.947		
E11-48a	48	a	0.815	0.730	0.08
E11-48b		b	0.713		
E11-48c		c	-		
E11-48d		d	0.660		
E11-72a	72	a	0.833	0.773	0.09
E11-72b		b	0.868		
E11-72c		c	0.672		
E11-72d		d	0.718		
E11-96a	96	a	0.688	0.764	0.09
E11-96b		b	0.893		
E11-96c		c	0.720		
E11-96d		d	0.754		

Tabla S6. Concentración de polifenoles y proteínas de los diferentes extractos de hongo *R. stolonifer* con once días de crecimiento completa utilizando los valores calculados con la ecuación (1) y (2) respectivamente.

Código de muestra	Horas de estrés	No. De muestra	Polifenoles [mg/mL]	Proteínas [mg/mL]
E11-2a	2	a	0.106	1.181
E11-2b		b	0.098	0.757
E11-2c		c	0.087	0.906
E11-2d		d	0.131	1.243
E11-24a	24	a	0.093	0.769
E11-24b		b	0.113	0.728
E11-24c		c	0.081	0.899
E11-24d		d	0.069	0.947
E11-48a	48	a	0.054	0.815
E11-48b		b	0.074	0.713
E11-48c		c	0.073	0.854
E11-48d		d	0.109	0.660
E11-72a	72	a	0.084	0.833
E11-72b		b	0.114	0.868
E11-72c		c	0.109	0.672
E11-72d		d	0.097	0.718
E11-96a	96	a	0.108	0.688
E11-96b		b	0.061	0.893
E11-96c		c	0.134	0.720
E11-96d		d	0.101	0.754