

Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotechnología
y Bioingeniería A.C.

Año 2020 Volumen 24, Número 2
ISSN 0188-4786



Sociedad Mexicana de
Biotechnología y Bioingeniería

MESA DIRECTIVA

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Presidente

Dr. Jaime Ortega López
Vice-Presidente

Dra. Sylvie Leborgne
Secretario

Dra. Angélica Meneses Acosta
Tesorero

Dr. Alvaro R. Lara
Subsecretario

Dra. Angélica Meneses Acosta
Vocal Profesional

Q. A. Alma Y. Alva Aviles
Vocal Estudiante

EDITORIA

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
UNAM

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Elda Patricia Segura Cenicerros
UADEC

Dra. Georgina Sandoval
CIATEJ

Dr. Israel Martínez Pérez
CICESE

Dr. José Hernández Eligio
UNAM

Dr. Sergio Sánchez Esquivel
UNAM

EDITOR ASOCIADO

M. en C. Jocelin M. Rizo Villagrana
UNAM

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM), en LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), los artículos se encuentran en Google Académico. Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título 04-1999-082516265000-101. Los Conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. o a la siguiente dirección electrónica revista_biotecnologia@smbb.mx

Índice

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES [4](#)

ARTÍCULOS

Riboswitches: sensores e interruptores bacterianos

Nataly Morales y Enrique Merino [8](#)

Aislamiento y purificación de la enzima lacasa: evaluación de su potencial biodegradador en residuos agrícolas

Sandra Valdés; Cristian Garita, Carmenza Esquivel y Luis Roberto Villegas [29](#)

El papel de los compuestos polifenólicos en la síntesis verde de nanopartículas metálicas

Ana Santos-Espinoza, Federico Gutiérrez-Miceli, Víctor Ruíz-Valdiviezo, Joaquín Montes-Molina [46](#)

Síntesis de fitonanopartículas de cobre, una opción más amigable con el medio ambiente

Fermín Jonapá-Hernández, Nancy Ruiz-Lau, Víctor M. Ruiz-Valdivieso, Federico A. Gutiérrez-Miceli [58](#)

Instrucciones para los autores

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original, así como de revisión en los campos de la Biotecnología y Bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas en los que se puede publicar en la revista son el español y el inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Para evitar errores innecesarios se recomienda usar el corrector de gramática y ortografía del procesador de palabras. Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, μ l), de peso (kg, g, mg, μ g), ADN, ARN y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde aspectos fundamentales hasta sus aplicaciones, incluyendo: Enzimas y Biocatálisis, Microbiología, Biotecnología Agrícola y Vegetal, Biotecnología Marina, Alimentos y bebidas, Biotecnología farmacéutica, Biotecnología Ambiental, Bioingeniería y fermentaciones, Bioenergía y biocombustibles, Biología de sistemas y bioinformática, Biología sintética, Nanobiotecnología y biomateriales, Ingeniería metabólica, Omicas, Bioseguridad y Bioética.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

Instrucciones para los autores

1. El título del manuscrito se escribirá en negritas con letra Arial o equivalente tamaño 14. El título deberá estar centrado y ser conciso e informativo. Evite el uso de abreviaciones y fórmulas.
2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño 12. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como la dirección de correo del autor correspondiente. Si el responsable fuera un estudiante, deberá incluir una carta del tutor o director del trabajo autorizándolo.
3. Se deberá añadir un Resumen de no más de 250 palabras en español y el correspondiente Abstract en inglés.
4. Se incluirán entre 3 a 6 Palabras clave: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en español y en inglés (Key words).
5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste se pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño 10. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño 10. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras.
7. Las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto, pero se anexarán en hojas separadas y al igual que las figuras, al final del manuscrito.

Instrucciones para los autores

8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García (1999) han demostrado que...”, o bien, “Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...”. Si la cita posee varios autores se escribirá como sigue: “Gutiérrez et al. (2003), han demostrado...” O bien: “Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado...” Si la cita es una página de Internet, la dirección URL deberá escribirse completa y entre paréntesis directamente en el texto.
9. La lista de Referencias se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) y con sangría francesa de acuerdo con el siguiente formato:

Artículos:

Bayegan AH, Clote P (2020) RNAmountAlign: Efficient software for local, global, semiglobal pairwise and multiple RNA sequence/structure alignment. PLoS ONE 15(1): e0227177. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227177>.

Libros:

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

Capítulos de libros:

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Congresos y reuniones:

Instrucciones para los autores

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solis S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de *Aspergillus HL*. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Sitios en internet:

CAZY, Carbohydrate-Active Enzymes Database. (<http://www.cazy.org/>)

Tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de *Ditaxis heterantha* para la producción de safranal. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos se someten en línea en la página electrónica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología, en la dirección <https://smbb.mx/publicaciones/publicacion-de-articulo/>. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal. La dirección para mantener comunicación con el editor es: revista_biotecnologia@smbb.mx y romina@biomedicas.unam.mx.

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC <http://www.smbb.com.mx/>.

Riboswitches: sensores e interruptores bacterianos

Nataly Morales y Enrique Merino*

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos 62271, México.

[*merino@ibt.unam.mx](mailto:merino@ibt.unam.mx)

Resumen

Los riboswitches son un grupo de ARNs que regulan la expresión de genes, principalmente en bacterias y arqueobacterias. Estos reguladores se localizan en extremos no codificantes de los ARN mensajeros y pueden reconocer moléculas con gran afinidad y especificidad; gracias a ese reconocimiento pueden formar estructuras que controlan la transcripción, la traducción, el procesamiento, la degradación o el silenciamiento del ARN mensajero. Este tipo de regulación está presente en genes que codifican para proteínas involucradas en la biosíntesis y transporte de metabolitos, tales como: aminoácidos, vitaminas, iones, coenzimas, etc. Recientemente, se ha descrito que además de regular la expresión del gen en el que se encuentran, regulación *in cis*, estos ARNs pueden regular también la expresión de otros genes, regulación *in trans*; participando en mecanismos aún más complejos a los ya caracterizados. Además, algunos riboswitches se encuentran duplicados y su actividad regulatoria responde a variaciones más finas en las concentraciones del ligando en cuestión, algunos de estos pueden responder a distintas moléculas relacionadas metabólicamente. Dado que los riboswitches no precisan de la intervención de una proteína para llevar a cabo su función, se cree que pudieron originarse en un mundo primigenio donde el ARN era la molécula reguladora más importante. Los riboswitches han sido muy atractivos para su utilización en la industria, se han creado algoritmos tanto para diseñar riboswitches artificiales, como para realizar análisis bioinformáticos que permiten su localización en los distintos genomas bacterianos y así, ayudar a los científicos a elucidar la función de algunos genes desconocidos.

Palabras clave: riboswitches, regulación genética, ARN, evolución.

Abstract

Riboswitches are RNAs that regulate gene expression in bacteria and archaeobacteria, mainly. These RNA regulators are located at non-coding regions of genes. They recognize molecules with great affinity and specificity and form structures that control transcription, translation, processing, degradation or silencing of messenger RNA. They regulate genes that codify proteins involved in the biosynthesis and transport of metabolites, such as: amino acids, vitamins, ions, coenzymes, etc. They have been described regulating the expression of the gene in which they are found, *in cis*, but recently, these RNAs can also regulate the expression of other genes, *in trans*, the mechanisms in which participate are even more complex. In addition, some riboswitches are duplicated and respond to fine variations in the concentrations of the ligand,

some of these may respond to different metabolically related molecules. The riboswitches do not require the intervention of a protein to carry out its function, for this reason is believed that they could originate in a primitive RNA world. Riboswitches have been attractive to industry, algorithms have been created to design artificial riboswitches, and to do bioinformatic analyzes that allow their location in the different bacterial genomes, then help to scientists to elucidate the function of some unknown genes.

Key words: riboswitches, genetic regulation, RNA, evolution.

Introducción

Entre 3,500 y 3,900 millones de años, las bacterias, organismos invisibles para el ojo humano, comenzaron a habitar el planeta Tierra. Con el paso del tiempo, estos microorganismos lograron adaptarse a los constantes cambios ambientales y evolucionaron, dando origen a la gran diversidad bacteriana que existe hoy en día. Las bacterias son consideradas los seres vivos más exitosos, ya que pueden transformar diferentes componentes de su entorno para utilizarlos como alimento, y pueden vivir en todos los hábitats terrestres y acuáticos del planeta, soportando condiciones extremas de temperatura, salinidad, presión y pH.

El éxito de las bacterias como organismos ubicuos, está estrechamente relacionado con las distintas estrategias que utilizan para expresar los genes que son necesarios, en los momentos y cantidades adecuadas, permitiéndoles así, fabricar las proteínas que requieren para vivir. La expresión genética en este grupo de organismos unicelulares se regula principalmente a nivel del inicio de la transcripción, y en un menor grado a nivel de los procesos relacionados con la síntesis de proteínas y con la replicación del ADN cromosomal. En esta revisión se describe un novedoso tipo de elementos de regulación de ARN, que se encargan de la regulación transcripcional y traduccional en eubacterias y

arqueobacterias, y que han sido denominados como Riboswitches (Breaker et al., 2002).

Regulación de la expresión génica. Una breve mirada histórica.

A pesar de la dificultad de ubicar los primeros trabajos científicos que pudieran explicar cómo es que una célula responde a cambios en su medio ambiente, es ampliamente reconocido a Jacques Monod como uno de los pioneros científicos en el campo de la regulación de la expresión genética. A principios de la década de los 40's, Monod fue el primero en observar que el crecimiento bacteriano podría variar en función de las distintas combinaciones de carbohidratos administrados a los medios cultivo, a lo que llamó "adaptación enzimática". Monitoreando el crecimiento de *Escherichia coli* en un medio con glucosa y sorbitol a distintas concentraciones, Monod documentó que la bacteria tiene dos fases de crecimiento en respuesta a la utilización secuencial de esas fuentes de carbono. Este tipo de crecimiento sucede cuando la fuente orgánica es el factor limitante y esta constituida de una mezcla de carbohidratos (Monod, 1949). Años después, Jacob y Monod demostraron que las enzimas encargadas de la utilización de la lactosa, codificadas en el operón *lac*, eran sintetizadas exclusivamente cuando dicho azúcar estaba presente en el medio de cultivo. Esas enzimas

Artículos

están codificadas por los genes: *lacZ*, *lacY* y *lacA*, y su expresión permite a la bacteria metabolizar la lactosa, sólo en ausencia de glucosa. Esta observación sugería que la bacteria era capaz de percibir los nutrientes disponibles en el medio y con base en ello, generar una respuesta de tipo regulatorio (Jacob & Monod, 1961). Aunque por algún tiempo fue un misterio la naturaleza de los elementos responsables de esta regulación, la comparación de cepas silvestres con cepas mutantes en las que se observaba la pérdida de la regulación, permitió a Monod inferir que eran factores proteicos, ahora llamados reguladores o factores transcripcionales, los responsables del

control de la transcripción; estos podían activarla o inhibirla, en respuesta a los metabolitos o señales efectoras presentes en el medio. El modelo de Monod basado en proteínas reguladoras demostró ser exitoso para describir la regulación de muchos otros tipos de sistemas, incluyendo los relacionados con la asimilación de azúcares (arabinosa, maltosa, ribosa, xilosa, galactosa, etc.), biosíntesis o transporte de metabolitos (aminoácidos, vitaminas, ácidos grasos, etc.), formación de componentes celulares (pili, flagelo, etc.), entre otros (ver figura 1).

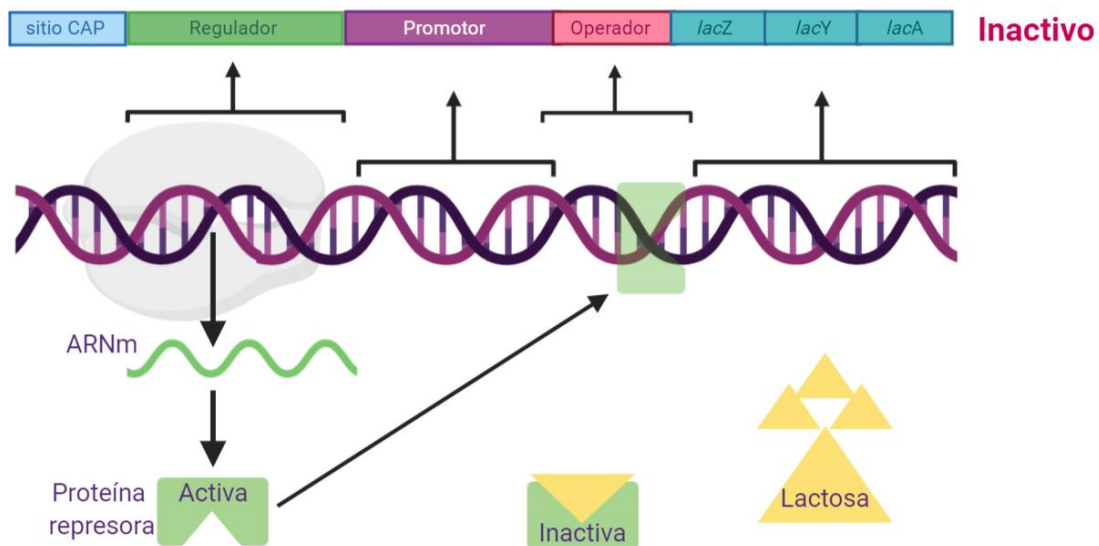


Figura 1. Modelo de regulación basado en proteínas. Monod descubrió que eran proteínas las encargadas de regular la transcripción del operón de utilización de lactosa. Un operón es un conjunto de genes contiguos que comparten el mismo promotor. El operón *Lac* codifica enzimas que se encargan de degradar el azúcar lactosa. Este operón es sintetizado siempre y cuando la bacteria se encuentre en un medio que contenga lactosa, y no glucosa. La bacteria utiliza dos proteínas como sensores. La primera proteína es un represor que se encuentra unido al ADN impidiendo el paso de la ARN polimerasa. En presencia de un derivado de lactosa este represor abandona al ADN permitiendo la transcripción del operón *Lac*. La segunda proteína es un activador que, en ausencia de glucosa, se une en una región contigua al promotor favoreciendo la transcripción del operón *Lac*. Este modelo de regulación a través de proteínas fue extendido para describir otros sistemas de control bacteriano.

A finales del siglo pasado, se propuso una interesante excepción al modelo de regulación de Monod. En un intento de caracterizar la regulación del operón de biosíntesis de tiamina de la bacteria *Rhizobium etli*, el Dr. Mario Soberón y colaboradores, observaron que la región 5' no-codificante ubicada inmediatamente río arriba del primer gen estructural del operon, era inusualmente larga y que contenía un secuencia o motivo excepcionalmente conservado y ampliamente distribuido entre diferentes grupos filogenéticos. A este motivo lo llamaron THI-box. Estas propiedades de conservación, tamaño y distribución, llevaron a Soberón y colaboradores, a proponer que el fragmento de ARN del ARNm que constituía al motivo THI-box, podría sin la participación de proteína alguna, reconocer al pirofosfato de tiamina (TPP) y ejercer un efecto de regulación sobre la síntesis del producto peptídico codificado por el operón (Miranda-Ríos et al., 1997).

En el 2002, el grupo del Dr. Ronald Breaker de la Universidad Yale, verificó experimentalmente la hipótesis propuesta por Soberón y colaboradores, al demostrar que el elemento de ARN correspondiente al motivo THI-box, podría unir con alta especificidad y gran afinidad, al pirofosfato de tiamina (Breaker et al., 2002). Por su naturaleza de tipo RIBOnucleico y su función de alternar (switching) entre los estados de activación e inhibición de la expresión de los genes regulados, a este tipo de elemento de regulación se le denominó riboswitch: una secuencia en la región no traducida del ARN

mensajero que reconoce una molécula o metabolito y en respuesta a ese reconocimiento puede regular la expresión del gen donde se localiza (ver figura 2).

Las predicciones estructurales y la resolución de la estructura tridimensional mediante cristalografía de rayos X del riboswitch TPP, demostró que la unión del pirofosfato de tiamina al riboswitch TPP provoca su reestructuración para favorecer la formación de una estructura que deja inaccesible el sitio de unión a ribosomas del ARN mensajero, inhibiendo así la traducción de su región codificante. Dada la novedad de este tipo de regulación, tanto el grupo del Dr. Braker, como el del Dr. Soberón, se dieron a tarea de buscar el riboswitch TPP en las secuencias de los genomas de otros organismos mediante análisis bioinformáticos. Ambos grupos descubrieron que la secuencia de dicho riboswitch era altamente conservada y ampliamente distribuida (Miranda-Ríos & Soberón, 2007). Hoy en día se sabe que el riboswitch TPP se encuentra en un gran número de bacterias, arqueobacterias e inclusive, en los genomas de algunas plantas y hongos. La regulación de los genes por este riboswitch en bacterias y arqueobacterias ocurre a nivel transcripcional o traduccional, mientras que en organismos eucariontes la regulación ocurre modulando el proceso de splicing del ARN mensajero. Estas características del riboswitch TPP lo hacen uno de los riboswitches más versátiles descritos hasta el momento (Serganov & Nudler, 2013).

Artículos

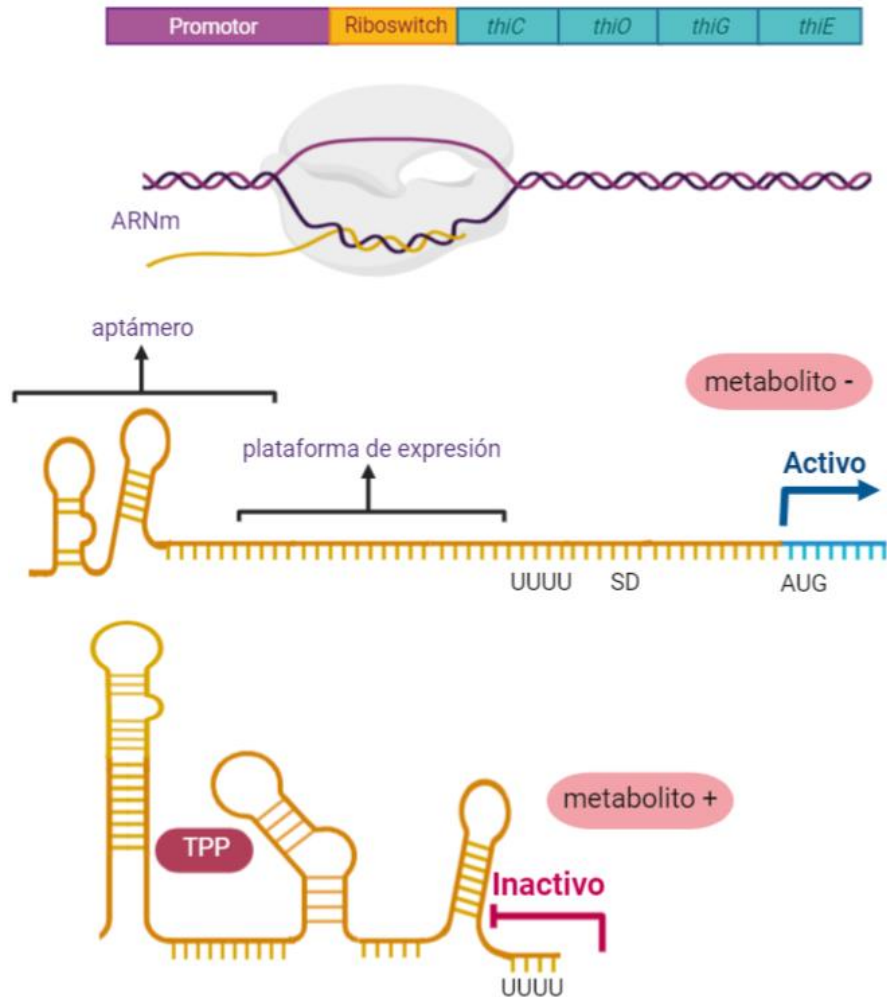


Figura 2. Modelo de regulación basado en ARN. A principios de siglo se descubrió que el ARN también tiene la capacidad de regular la expresión genética, estos ARNs reguladores fueron bautizados como riboswitches. Los riboswitches se localizan en la parte no codificante de un ARN mensajero, y constan de dos dominios estructurales denominados aptámero y plataforma de expresión. El aptámero es la secuencia de ARN que tiene la capacidad de reconocer específicamente a un metabolito y la plataforma de expresión es la secuencia que controla directamente la expresión de los genes. En la figura se muestra el riboswitch que reconoce al pirofosfato de tiamina (TPP) que regula la transcripción del operón *thi* de biosíntesis de tiamina. La unión de la TPP al riboswitch, produce un cambio conformacional en el dominio de reconocimiento, que posteriormente es transmitido hacia el dominio de expresión, favoreciendo la formación de un terminador transcripcional que impide que la ARN polimerasa continúe la transcripción del operón. En ausencia del metabolito, las estructuras secundarias de la plataforma de expresión corresponden a un antiterminador transcripcional, por lo que la transcripción del operón se completa. Este riboswitch está ampliamente distribuido en los diferentes filos bacterianos.

Distribución de los riboswitches bacterianos.

Existen 40 clases de riboswitches que tienen al menos un elemento caracterizado experimentalmente (ver figura 3), otras se han propuesto como resultado de análisis computacionales. El criterio para clasificar y nombrar a estos ARNs reguladores es principalmente el tipo de ligando que unen. Algunas clases reconocen el mismo metabolito y son poco conservadas en estructura y secuencia entre sí, por ejemplo, las clases de riboswitches que unen S-adenosil metionina o los que unen diGMP cíclico (Lotz & Suess, 2018; Mccown et al., 2017). Recientemente se han reportado variantes de algunas clases de riboswitches, en las que el dominio de reconocimiento presenta cambios que les permiten detectar otros metabolitos, como el riboswitch de guanina, que tras mutaciones en su sitio de unión es capaz de reconocer adenina (Weinberg et al., 2017). Además, se identificaron 226 candidatos de riboswitches huérfanos, denominados así por que aún se desconoce el ligando que unen (Weinberg, Lünse, et al., 2017).

Los riboswitches se han encontrado fundamentalmente asociados a genes de biosíntesis y transporte de metabolitos esenciales, tales como: nucleótidos (adenina, guanina, diGMP cíclico, prequeuosina y ATP), aminoácidos (lisina, glicina, SAM y S-adenosil homocisteína), carbohidratos (glucosamina-6-fosfato[Glc6P]), coenzimas (flavin mononucleótido, tiamina pirofosfato, cobalamina y tetrahidrofolato), y iones (molibdeno, magnesio); así como a parámetros fisicoquímicos como temperatura y pH (Serganov & Nudler,

2013). En la mayoría de los casos, el metabolito reconocido es el producto final de la vía biosintética que regula, de tal forma que su reconocimiento por el riboswitch conlleva al apagado de la expresión de los genes involucrados en su genes de biosíntesis o transporte.

La alta especificidad de los riboswitches por sus ligandos, impone restricciones en su estructura tridimensional, lo que resulta en que su secuencia sea altamente conservada a pesar de que se encuentren en organismos filogenéticamente distantes. Esta conservación ha sido un factor central para su identificación computacional en secuencias genómicas. Algunos riboswitches están ampliamente distribuidos en diferentes grupos filogenéticos, tal es el caso del riboswitch que reconoce al pirofosfato de tiamina; mientras que otros riboswitches presentan una distribución acotada a grupos filogenéticos específicos, como el riboswitch T-box, que reconoce ARNs de transferencia y se encuentra básicamente en el filo de los Firmicutes (Abreu-Goodger et al., 2004; Gutierrez-Preciado et al., 2009; Vitreschak, Mironov, Lyubetsky, & Gelfand, 2008). El número de riboswitches identificados *in silico* por genoma puede variar enormemente, desde organismos en los que no se encuentra ningún riboswitch (como el Tenericute *Mycoplasma genitalium*, o el endosimbionte *Carsonella ruddii*, entre otros), a organismos con más de 100 riboswitches (como los firmicutes *Geosporobacter ferrireducens* con 110, o *Bacillus thuringiensis* con 105 riboswitches).

Riboswitch	Ligando	Riboswitch	Ligando
AdoCbl	Adenosilcobalamina	PreQ1-I,1-3	Prequeuosina-1
TPP	Pirofosfato de Tiamina	PreQ1-II	Prequeuosina-1
T-box	ARNs de transferencia	Moco	Molibdeno
FMN	Flavín Mononucleótido	SAH	S-adenosil homocisteína
Adenina	Adenina	SAM-IV	S-adenosil metionina
Guanina	Guanina	Wco	Tungsteno
Lisina	L-Lisina	c-di-GMP-I	3'-5' di-GMP cíclico
AqCib	Acuacobalamina	SAM-V	S-adenosil metionina
GlmS	Glucosamina-6-fosfato	c-di-GMP-II	3'-5' di-GMP cíclico
Glicina	Glicina	SAM-I/IV	S-adenosil metionina
SAM-II	S-adenosil metionina	SAM-SAH	S-adenosil metionina S-adenosil homocisteína
SAM-III	S-adenosil metionina	THF	Tetrahidrofolato
Mg ²⁺ -I	Ion Magnesio	Glutamina	L-Glutamina
Mg ²⁺ -II	Ion Magnesio	Fluoruro	Iones fluoruros
2'-dG-I	2' deoxiguanosina	c-di-AMP	3'-5' di-AMP cíclico
Mn ²⁺	Iones manganeso	PreQ1-III	Prequeuosina-1
cAMP-GMP	3'-5' AMP-GMP cíclico	Guanidine-I	Guanidina
NiCo	Iones Níquel o Cobalto	2'-dG-II	2' deoxiguanosina
ZTP	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribosido 5'-trifosfato	Guanidine-II	Guanidina
Aza-aromatic	Aza aromáticos	Guanidine-III	Guanidina

Figura 3. Clases de riboswitches. Los riboswitches se nombran de acuerdo con el ligando que unen. Algunos ligandos son reconocidos por varios tipos de riboswitches. Modificado de (Lotz & Sues, 2018).

Dominios estructurales y funcionales de los riboswitches.

Estructural y funcionalmente, puede considerarse que los riboswitches tiene dos dominios: un primer dominio de reconocimiento, también llamado áptamero, que es la región del riboswitch que adopta una estructura tridimensional específica que puede reconocer a su metabolito con gran afinidad y especificidad; y

un segundo dominio, llamado dominio de expresión, que es la región del riboswitch que debe su nombre a la capacidad que tiene para formar estructuras que controlan directamente la expresión del gen y que comunmente comprenden estructuras secundarias mutuamente excluyentes, también llamadas

atenuadores (Revisado en Peselis & Serganov, 2014; Serganov & Nudler, 2013) (ver figura 2). La decisión sobre cuál de las estructuras posibles será formada, depende de la unión del ligando a la plataforma de reconocimiento, ya que dicha unión le produce un cambio alostérico, que es a su vez transmitido a la plataforma de expresión, favoreciendo energéticamente la formación de estructuras secundarias asociadas a la inhibición de la expresión del gen regulado.

El repertorio de elementos estructurales presentes en la plataforma de expresión de los riboswitches pueden agruparse fundamentalmente en cuatro tipos: a) Atenuadores transcripcionales, b) Atenuadores traduccionales, c) Atenuadores que incluyen Ribozimas y c) Atenuadores que afectan la edición del ARN (splicing).

El término de la transcripción a través de los atenuadores transcripcionales de las plataformas de expresión, se da cuando la estructura secundaria correspondiente a la de un terminador transcripcional de tipo rho-independiente se favorece sobre el plegamiento de la estructura del antiterminador transcripcional; mientras que en los atenuadores traduccionales, el término de la traducción se da cuando la formación de una estructura secundaria de ARN que contiene el sitio de unión a ribosoma, Shine-Dalgarno, se favorece sobre su estructura alternativa. La identificación computacional de riboswitches y el análisis de las correspondientes estructuras secundarias de sus plataformas de expresión, han puesto en evidencia que existe un sesgo filogenético en el tipo de plataforma de expresión usada por los riboswitches. Así, por ejemplo, en Firmicutes, los riboswitches actúan preferencialmente a nivel

transcripcional, mientras que en Proteobacterias, lo hacen a nivel traduccional. Se ha hipotetizado que esta correlación puede deberse a que la velocidad de transcripción en Proteobacterias es mayor, y el tiempo de sensado del ligando por el dominio de reconocimiento podría no ser suficiente para el plegado, ni para la oportuna respuesta de la plataforma de expresión. En consecuencia, es probable que se favorecieran evolutivamente a los riboswitches transcripcionales sobre los traduccionales (Henkin, 2014).

Adicionalmente a los atenuadores transcripcionales o traduccionales, existen también plataformas que pueden estructurar ARN catalíticos que degradan el ARN mensajero. El gen *glmS* de bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis*, tiene un riboswitch que reconoce glucosamina-6-fosfato (GlcN6P) y actúa como ribozima. Este gen codifica para la enzima glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa, la cual se encarga de la síntesis de GlcN6P, un azúcar importante en la síntesis de la pared celular bacteriana. Cuando GlcN6P está presente en gran cantidad, se une al riboswitch y provoca que el sitio activo de su plataforma de expresión sea funcional, y el riboswitch comienza el autocorte con el objetivo de bajar la concentración de GlcN6P (McCown et al., 2012).

Además, las plataformas de expresión de algunos riboswitches contienen intrones con la capacidad para autoprocresarse y así modificar la longitud del ARN mensajero en el que se encuentran, modulando así la expresión genética. Tal es el caso del riboswitch c-di-GMP presente en el patógeno *Clostridium difficile*. Este riboswitch reconoce al segundo mensajero: guanosin monofosfato di-cíclico, c-di-GMP, y se

encuentra regulando genes de virulencia y motilidad de este organismo. Cuando el riboswitch detecta el c-di-GMP y una la molécula de guanosin trifosfato, GTP, el intrón se pliega para poder autocortarse, tras lo cual, ocurre un empalme del ARN mensajero que libera la secuencia de unión a ribosoma y es entonces cuando el ARN mensajero puede ser traducido. En este riboswitch se acoplan dos mecanismos, el corte y la traducción (Peselis & Serganov, 2014).

El riboswitch T-box, un riboswitch muy especial.

Estudios bioinformáticos sobre el conjunto de genomas secuenciados realizados por nuestro grupo de investigación, han revelado que el riboswitch T-box es el riboswitch más frecuentemente usado para regular la expresión genética. En ciertos Firmicutes, como el caso de *Lactobacillus parabuchneri*, puede existir hasta 48 copias del riboswitch T-box. Adicionalmente a lo anterior, entre todos los riboswitches conocidos a la fecha, el riboswitch T-box es un riboswitch único en su clase ya que el ligando que reconoce no es, como en otros casos, un metabolito de alguna vía metabólica, si no, como se mencionó anteriormente, detecta el grado de aminoacilación o cargado de los ARNs de transferencia por sus correspondientes aminoácidos (Grundy & Henkin, 1993, 1994). El aza de especificidad contiene un triplete de nucleótidos que funciona como un codón, este se aparea con el anticodón de un ARNt correspondiente. La interacción codón-anticodón determina que el riboswitch reconozca un ARNt específico entre varias posibilidades. En la mayoría de los riboswitches T-box, el aza de especificidad contiene el codón menos usado en

la síntesis de proteínas, por lo que su ARNt complementario también suele ser el menos abundante (Gutierrez-Preciado et al., 2009). Por otra parte, la secuencia T-box consta de 18 nucleótidos altamente conservados, que incluyen el triplete 5'UGG3'. Este 5'UGG3' se aparea con el 5'CCA3' libre que tienen todos los ARNs de transferencia cuando no están aminoacilados, con ese apareamiento, se favorece la formación de un antiterminador transcripcional. Cuando el nivel de un ARNt aminoacilado es alto, ese ARNt sólo se puede unir al sitio de especificidad del riboswitch, esto mantiene el terminador transcripcional intacto y la transcripción del gen inactiva. En cambio, cuando el nivel de un ARNt aminoacilado es bajo, la porción de ARNt que no tiene aminoácido, se puede unir tanto al sitio de especificidad, como a la secuencia T-box, tras lo cual se forma un antiterminador que permite la transcripción del gen (Grundy & Henkin, 1993, 1994; Henkin, 2014) (ver figura 4).

A través del riboswitch T-box, las bacterias pueden medir de forma indirecta, pero específica, la disponibilidad intracelular de un cierto tipo de aminoácido, ya que el nivel de un ARNt aminoacilado depende en gran medida de la cantidad de su aminoácido presente en el interior de la célula. Es por ello, que este tipo de riboswitch está localizado en genes involucrados tanto en el metabolismo, como en el transporte y cargado de aminoácidos de manera altamente específica, de tal forma que la identificación del ARNt que es reconocido mediante el análisis de la secuencia del aza de especificidad, permite inferir posibles relaciones funcionales de los genes regulados por este riboswitch (Gutiérrez-Preciado & Merino, 2012).

Artículos

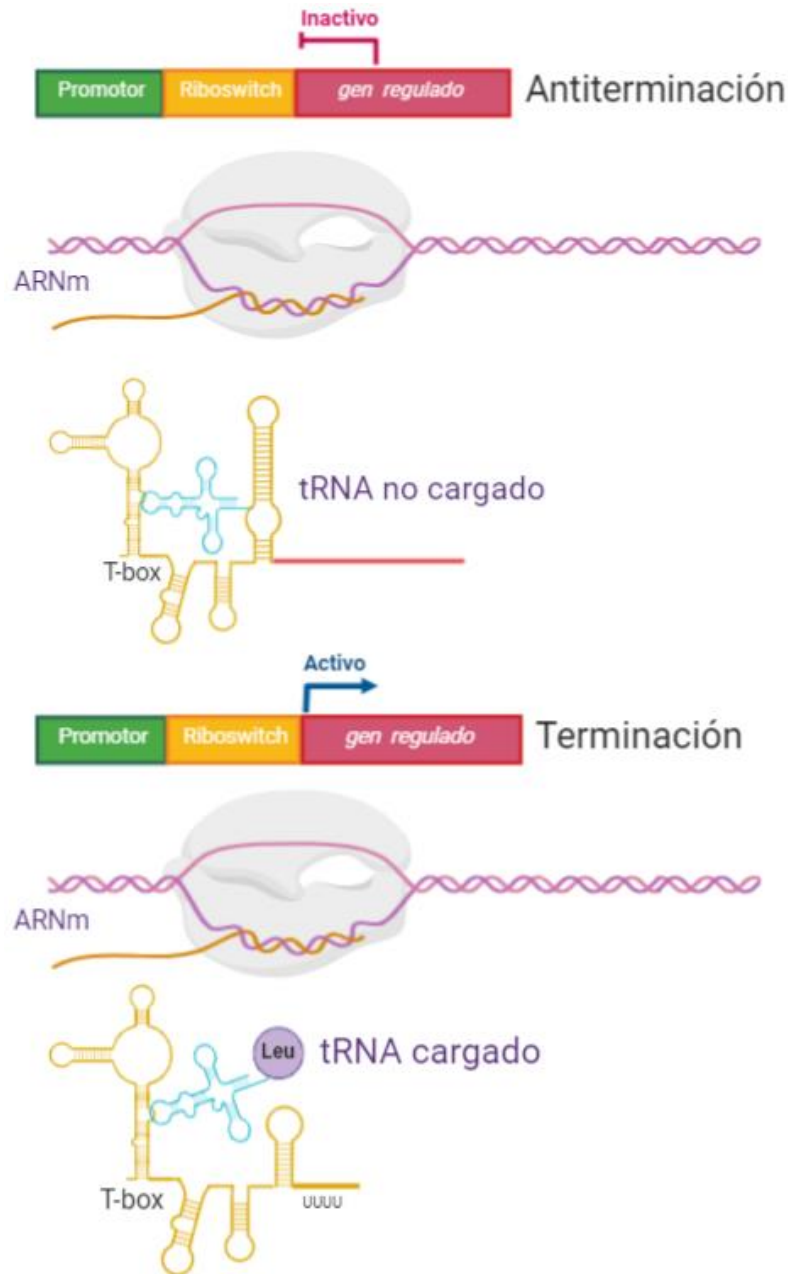


Figura 4. Mecanismo de acción del riboswitch T-box. El riboswitch T-box actúa principalmente a nivel transcripcional y regula genes involucrados en la síntesis, transporte, y cargado de aminoácidos, principalmente en bacterias del filo Firmicutes. Este tipo de riboswitch reconoce el estado de aminoacilación (cargado) de los tRNAs, e indirectamente, la disponibilidad de aminoácidos en el medio. Cuando un tRNA cargado es reconocido por la T-box, la estructura secundaria de la plataforma de expresión corresponde a la de un terminador transcripcional, y en consecuencia, la transcripción del operón regulado termina prematuramente. De manera contraria, cuando la T-box interactúa con un tRNA no cargado, la estructura secundaria de ARN que se forma en la plataforma de expresión corresponde a la de un antiterminador transcripcional, por lo que la transcripción del operón regulado se realiza en su totalidad.

Existen casos, en los que el T-box presenta codones para su interacción con dos tipos de ARNt que cargan aminoácidos distintos. Tal es el caso del llamado NT-box de *Clostridium acetobutylicum* que regula un operón de cuatro genes involucrados en una vía de transamidación; se demostró que este riboswitch reconoce tanto el ARNt^{Asn} como el ARNt^{Glu}. Se sabe que la biosíntesis de asparagina dependiente de ARNt usa glutamina como donador de un grupo amida, es por esta relación metabólica, que este riboswitch puede responder a ambos ARNt (Saad et al., 2013).

La caracterización bioinformática sobre el tipo de genes regulados por el riboswitch T-box nos ha permitido identificar que el operón bicistrónico *hisS-aspS* de *B. subtilis* es regulado por un riboswitch T-box. En el aza de especificidad de este riboswitch existe la secuencia GACAC, que contiene los codones para los aminoácidos aspártico (GAC) e histidina (CAC), el modelado *in silico* coloca el codón GAC en una posición favorable para su interacción con el ARNt^{Asp}, indicando que es más probable que el riboswitch regule en respuesta a la baja concentración de ácido aspártico; no obstante, otras estructuras secundarias también posibilitan su interacción con el ARNt^{His} (Gutierrez-Preciado et al., 2009). Esta observación aún no ha sido comprobada experimentalmente, pero es necesario que el riboswitch sea capaz de reconocer ambos ARNs de transferencia, para evitar un “desajuste regulatorio”. Por lo tanto, podría existir algún punto en común en la biosíntesis de histidina y ácido aspártico en *B. subtilis*, lo que justificaría la síntesis simultánea de *hisS* y *aspS*, que son las enzimas que cargan

esos aminoácidos a sus correspondientes ARNs de transferencia.

Regulación de la expresión de la regulación génica por riboswitches dispuestos en tandem.

Algunos riboswitches pueden tener áptameros o plataformas de expresión en tándem, es decir, duplicadas. Estas arquitecturas llevan a cabo un mecanismo de regulación más complejo (Welz & Breaker, 2007). Por ejemplo, el riboswitch de glicina tiene dos áptameros, ambos reconocen glicina y su función es cooperativa. Gracias a esa cooperatividad el riboswitch tiene la capacidad de medir variaciones finas en la concentración del aminoácido. Este riboswitch se localiza en el ARN mensajero de un operón de enzimas que se encargan de la degradación de glicina en *Bacillus subtilis* (Mandal et al., 2004).

El riboswitch SAM-AdoCbl, tiene un áptamero que une S-adenosilmetionina y otro que une adenosil-cobalamina, ambos tienen su plataforma de expresión y ambos son capaces de reprimir o activar el gen *meiE* de *Bacillus clausii* en función de la concentración de alguno o de ambos metabolitos (Welz & Breaker, 2007). En términos generales, la regulación mediada por riboswitches dispuestos en tándem, se localizan en genes que requieren una regulación más estricta, en caso de que las dos copias sean del mismo tipo de riboswitches, o de integrar más de una señal de reconocimiento, en caso de que los riboswitches en tándem reconozcan diferentes ligandos. Análisis bioinformáticos de nuestro grupo han identificado que el operón de biosíntesis de triptófano en Firmicutes suele estar regulado por dos copias del riboswitch T-box dispuestas en tándem (Gutierrez-Preciado et al.,

2009). Utilizando como modelo de estudio a *Bacillus cereus*, en nuestro laboratorio hemos determinado que esta disposición en tándem del riboswitch T-box, permite a los organismos responder a un rango de concentración de

Riboswitches que actúan regulando tanto in cis como in trans.

El modelo canónico de regulación por riboswitches considera que su actividad de regulación ocurre en el lugar en donde se encuentran localizados, es decir, que actúan *in cis*. No obstante, debido a que el producto resultante del cese prematuro de la transcripción de los riboswitches, produce ARNs de tamaño pequeño, existe la posibilidad de que estos fragmentos actúen de manera similar a los ARNs pequeños bacterianos que inhiben la traducción de sus genes blanco al unirse a la región Shine-Dalgarno de ARNs mensajeros y cuya interacción es mediada por la chaperona de ARNs llamada Hfq. La regulación por ARNs pequeños en bacterias ha sido ampliamente documentada regulando a genes involucrados en diferentes condiciones de estrés, como el oxidativo (oxyS), limitación de hierro (ryhB), temperaturas bajas (dsrA) o la coordinación de la respuesta al estrés

triptófano más amplio. Es probable que existan más casos de riboswitches T-box en tándem, debido a que la regulación a través del reconocimiento de ARNt es más sensible a las variaciones en las pozas de éstos.

de la imitación de glucosa y el fosfato (sgrR), entre otros. El único caso reportado en la literatura en donde un small-RNA proviene del cese prematuro de la transcripción lo constituye el riboswitch SAM de *Listeria monocytogenes* que regula al operón lmo2419-lmo2418-lmo2417, que codifica para un complejo transportador del tipo ABC (Loh et al., 2009). En presencia de S-adenosilmetionina, este riboswitch favorece la formación de un terminador rho-independiente en su plataforma de expresión que origina la terminación prematura de la transcripción, cuyo producto es un ARN pequeño que interactúa “in trans” con la región líder de los ARN mensajeros del gen *prfA*, inhibiendo su traducción. El gen *prfA* codifica para un regulador de virulencia, que tiene efecto sobre otros genes fundamentales para la patogenicidad de la bacteria. Este riboswitch de SAM es responsivo a la presencia de S-adenosilmetionina, pero su actividad *in trans* es independiente del reconocimiento de este ligando (Loh et al., 2009) (ver figura 5).

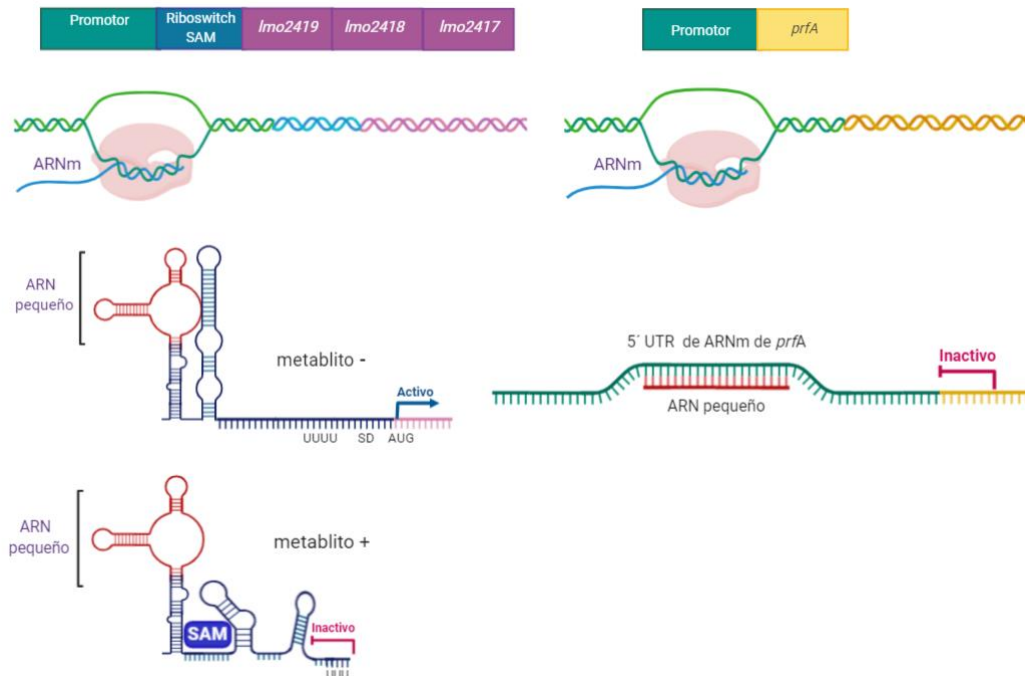


Figura 5. Riboswitch con actividad *in cis* y *in trans*. El operón *Imo2419-Imo2418-Imo2417*, que codifica para las proteínas del complejo transportador de tipo ABC de *Lysteria monocytogenes* está regulado por un riboswitch que reconoce S-adenosil metionina (SAM). En presencia de este metabolito, el riboswitch forma un terminador transcripcional que origina el término prematuro de la transcripción de dicho operón. En ausencia de SAM, el riboswitch forma un antiterminador que favorece que la transcripción del operón se complete. Adicionalmente a esta regulación del operón *in cis*, este riboswitch es capaz de actuar *in trans*, de manera similar a la de un ARN pequeño, ya que puede unirse de manera específica a la secuencia Shine-Dalgarno del gen *prfA*, que codifica para un regulador maestro de virulencia de este organismo. De esta manera, la regulación *in trans* de este riboswitch, tiene un efecto de inhibición sobre el inicio de la traducción de su gen blanco.

Riboswitches transcritos en antisentido al de su gen blanco.

Un segundo modelo no canónico de regulación por riboswitches lo constituyen los riboswitches que se encuentran en el extremo 3' y en dirección antisentido al del gen que regulan. En este caso, los riboswitches al ubicarse en el extremo 3' de su gen blanco, pueden inhibir la elongación transcripcional de los ARNm transcritos divergentemente mediante el fenómeno de colisión de ARN polimerasas. El primer caso reportado en la literatura de un

riboswitches antisentido lo constituye el riboswitch de la S-box que se encuentra en el extremo 3' del operón *ubiG-mccB-mccA* en *Clostridium acetobutylicum*. Las enzimas codificadas en este operón están involucradas en la conversión de metionina a cisteína. Cuando las concentraciones intracelulares de S-Adenosil Metioina, AdoMet, son bajas, en la plataforma de expresión de este riboswitch se favorece la formación de un antiterminador de la transcripción, y la ARN polimerasa que transcribe en dirección antisentido el operón *ubiG-mccB-*

mccA colisiona con la ARN polimerasa que transcribe en dirección 5´- 3´, resultando en la ausencia de la síntesis de las enzimas UbiG, MccB y MccA (André et al., 2008) (ver figura 6).

Origen de los riboswitches.

Existe la hipótesis de que la vida en la Tierra se originó en el llamado “mundo del ARN”, en el cual, las condiciones eran extremas e inestables, y el ADN y las proteínas no tenían la importancia que tienen para los seres vivos en la actualidad (Vázquez-Salazar & Lazcano, 2018). En ese mundo primigenio, es posible pensar que moléculas de ARN pudieron haber sido las primeras en adquirir actividades catalíticas y de almacenamiento de información genética. Considerando lo anterior, se ha propuesto que algunos riboswitches sean descendientes de los mecanismos regulatorios utilizados por los primeros microorganismos que habitaron nuestro planeta.

Las ribozimas son moléculas de ARN con capacidad catalítica, que fueron descubiertas en 1982. Hoy en día se cree que los microorganismos primitivos explotaron varias ribozimas alostéricas para poder sobrevivir en el mundo del ARN. Es factible pensar que mediante arreglos genómicos, las ribozimas se posicionaron cerca de secuencias que ya funcionaban como aptámeros celulares. Los ligandos de estos últimos pudieron modificar la actividad de las ribozimas o actuar como cofactores para acelerar las reacciones, dando origen así, a los primeros riboswitches (Breaker, 2012; Vázquez-Salazar & Lazcano, 2018; Waters & Storz, 2009)

Posiblemente, los riboswitches del pasado no tenían plataformas de expresión y formaban terminadores y/o antiterminadores que controlaban la actividad de una ARN polimerasa con actividad de ribozima en lugar de una basada en proteínas. Los riboswitches que actúan como ribozimas y aquellos que tienen embebidos intrones de tipo I y necesitan guanosa fosforilada para llevar a cabo su autoprocesamiento, son ejemplos de riboswitches ancestrales que han permanecido en el tiempo. Los riboswitches que reconocen moléculas orgánicas complejas, y los que actúan a nivel traduccional tuvieron que desarrollarse hasta que se estableció la maquinaria de síntesis de proteínas (Breaker, 2012).

Ya que el ARN sólo necesita cuatro monómeros para constituirse, es entendible que los riboswitches sean evolutivamente conservados, en lo que respecta a sus aptámeros. Las plataformas de expresión tienen más variabilidad, pero justo esa característica les brinda la posibilidad de llevar a cabo mecanismos de regulación más elaborados; tal como sucede con los riboswitches en tándem, que responden de manera más fina a pequeñas variaciones en sus respectivos metabolitos (Breaker, 2012; Welz & Breaker, 2007).

Los riboswitches de pirofosfato de tiamina, de flavin mononucleótido y de adenosilcobalamina son ampliamente distribuidos entre las bacterias; curiosamente, estos riboswitches son los que tienen aptámeros con estructuras complejas y los ligandos que reconocen son moléculas que se han hipotetizado como reliquias del mundo del ARN (Breaker, 2012).

Artículos

A

Cys	Plataforma de expresión T-box	Cys como producto	Met	Plataforma de expresión S-box	Met como sustrato	Estado del operón <i>ubiGmccAB</i>	Representación
-	AT	Necesario	-	AT	No existe	<ul style="list-style-type: none"> Inhibición del ARNm del operón por actividad del ARN antisentido 	
-	AT	Necesario	+	T	Si existe	<ul style="list-style-type: none"> Transcripción y traducción del ARNm Transcripción prematura del ARN antisentido 	
+	T	No necesario	-	AT	No existe	<ul style="list-style-type: none"> Transcripción prematura del ARNm Síntesis del ARN antisentido 	
+	T	No necesario	+	T	Si existe	<ul style="list-style-type: none"> Transcripción prematura del ARNm Transcripción prematura del ARN antisentido 	

B

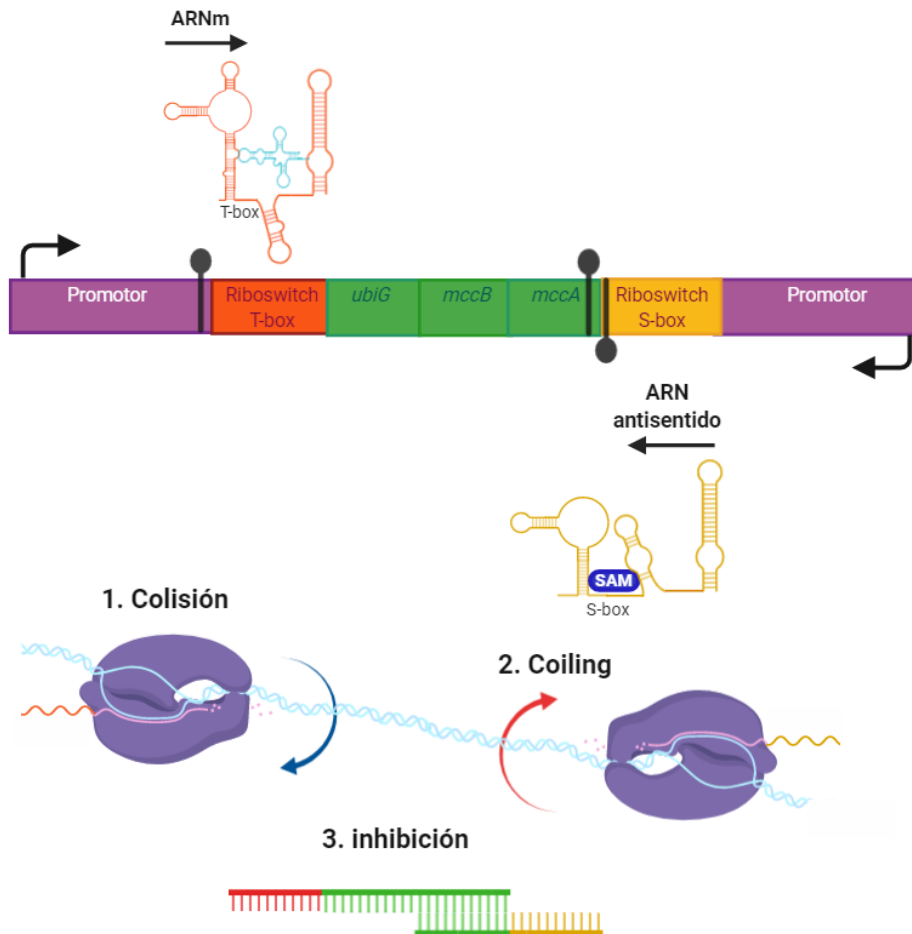


Figura 6. Riboswitch con actividad antisentido. El operón *ubiG-mccBA* en *Lysteria monocytogenes* codifica para las enzimas encargadas de la interconversión de los aminoácidos metionina a cisteína. La regulación de este operón es particularmente interesante, ya que está mediada por dos riboswitches: el riboswitch T-box localizado en su extremo 5' no-codificante y cuya dirección de transcripción es la misma a la del operón regulado, y el riboswitch que reconoce a SAM, localizado en el extremo 3' no-codificante y orientado de manera antisentido a la del operón. Mientras que el riboswitch T-box mide indirectamente, la disponibilidad de cisteína, que es el sustrato de la reacción de interconversión; el riboswitch SAM mide la disponibilidad de su producto, la metionina. La regulación del operón por el riboswitch de T-box de *cys* actuando en sentido, y el riboswitch de la S-box actuando en antisentido de la transcripción del operón *ubiG-mccBA*, garantizan que la síntesis de las enzimas UbiG, MccB y MccA se lleve a cabo únicamente cuando la bacteria requiere de la biosíntesis de cisteína y tiene disponible en su medio a la metionina (A). Los mecanismos por los cuales un promotor antisentido en el extremo 3' de un operón puede regular su expresión son: 1) Colisión de las ARN polimerasas que provienen de promotores con dirección de transcripción convergente, 2) Super-enrollamiento del ADN originado por los giros en sentido opuestos que introducen las ADN polimerasas provenientes de los promotores localizados en los extremos 5' y 3', y 3) Apareamiento del ARN mensajero por su correspondiente ARN antisentido. (B) AT: Antiterminador transcripcional, T: Terminador transcripcional.

Aplicaciones biotecnológicas.

Los riboswitches tienen varias características que pueden ser explotadas para su uso en distintas aplicaciones biotecnológicas. Gracias a que los riboswitches regulan genes relacionados a la biosíntesis de moléculas que son importantes para la sobrevivencia de las bacterias, se proponen como blancos de nuevos antibióticos, con miras a detener el crecimiento de bacterias patógenas y evitar la resistencia bacteriana.

En el 2015, científicos estadounidenses dieron a conocer un nuevo antibiótico que bautizaron como ribocil, con este lograron disminuir el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli*. El ribocil es una molécula sintética análoga a la vitamina B2, que compete con ella por su unión al riboswitch de flavín mononucleótido. Este riboswitch se localiza en

los genes que codifican las enzimas que sintetizan la vitamina B2; sólo bacterias, hongos y plantas cuentan con estos genes (Howe et al., 2015).

Cuando las bacterias están tomando la vitamina B2 de su medio y las concentraciones intracelulares son óptimas, el riboswitch la reconoce y presenta cambios conformacionales que impiden la expresión de las enzimas que la sintetizan, para no gastar energía. Cuando el ribocil se une, sucede lo mismo, pero la bacteria "es engañada", pues no tiene los niveles de la vitamina necesarios y en consecuencia su crecimiento se ve afectado (Howe et al., 2015). Debido a que los seres humanos carecen de enzimas que sintetizan vitamina B2, no hay posibilidad de que el hombre u otros animales se vean dañados por la presencia de ribocil en su cuerpo.

Los riboswitches pueden reconocer sus ligandos con alta especificidad y sin ayuda de otro componente celular, es por ello, que algunos grupos de investigación se han dedicado a construir aptámeros artificiales que les permitan regular procesos de interés biotecnológico o de salud. Un grupo de investigadores en Alemania utilizó riboswitches sintéticos (aptazymas) para controlar la expresión de proteínas viroides, que les permitieron modular indirectamente, la replicación de éstos, logrando así: disminución de la infección, propagación y citotoxicidad viral. Utilizaron el adenovirus y el virus del sarampión, un virus de ADN y ARN respectivamente. Los resultados de su trabajo sugieren el uso de estos riboswitches sintéticos en virus oncolíticos, los cuales son utilizados como herramienta terapéutica (Ketzner et al., 2014). La ventaja de usar aptámeros artificiales es que, las moléculas que unen pueden también ser artificiales y no suelen estar presentes en los hospederos.

Algunos aptámeros artificiales han sido seleccionados mediante una técnica llamada, evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial, SELEX, por sus siglas en inglés. Este protocolo ha sido muy útil en el desarrollo de biosensores o moduladores de la respuesta bacteriana. Algunos aptámeros como el de teofilina, tetraciclina y neomicina han sido ampliamente explotados, principalmente para modular la traducción de los genes a los que han sido fusionados. El primero es altamente selectivo para teofilina, a pesar de que esta molécula es similar a otras como la cafeína; no obstante, concentraciones altas de teofilina son tóxicas para las células (Findeiß, Etzel, Will, Mörl, & Stadler, 2017).

Los riboswitches pueden ser aprovechados también en proyectos de investigación. Se pueden fusionar a genes de interés para modular su expresión y conocer más acerca de su función. Los aptámeros de espinaca, brócoli y mango también han sido derivados de SELEX y su propiedad fluorescente, producida como consecuencia de su interacción con su ligando correspondiente; ha sido utilizada para screening celular *in vivo*, o para monitorear la expresión de ARNs pequeños. Los ARN fluorescentes tienen algunas desventajas, pues sólo son transcritos uno por unidad de ARN, mientras que las proteínas fluorescentes son traducidas varias veces (Etzel & Mörl, 2017).

Se ha desarrollado todo un campo de investigación en el desarrollo de aptámeros artificiales, algunos han tenido éxito, sin embargo, los resultados suelen depender del tipo de bacteria en el que son introducidos y del gen que están modulando. Crear riboswitches sintéticos completos, es aún más complejo ya que comúnmente involucran diversos estudios de secuencia y estructura, a nivel físico, bioquímico y molecular. En general, crear riboswitches que controlen la transcripción es más complicado que aquellos que regulan la traducción debido a que los riboswitches transcripcionales deben de responder rápidamente ante la presencia de su correspondiente ligando para que la decisión sobre cuál de las dos estructuras mutuamente excluyentes: antiterminador o terminador, se forme antes de que la ARN polimerasa empiece a transcribir el gen estructural. Afortunadamente, hoy en día se cuenta con programas computacionales para diseñar riboswitches sintéticos (Findeiß et al., 2017).

Retos y perspectivas en el estudio de los riboswitches.

La evolución en el estudio de los riboswitches refleja que este tipo de regulación puede ser a través de un mecanismo de control simple, pero también puede derivar en mecanismos mucho más complejos y diversos (Serganov & Nudler, 2013). Es probable entonces que existan varios riboswitches que aún no han sido descritos (McCown et al., 2017).

Las clases de riboswitches recientemente caracterizadas tienen pocos representantes dentro de los filos bacterianos. Es posible que en los análisis computacionales, los riboswitches desconocidos estén siendo enmascarados por aquellos con una mayor distribución (McCown et al., 2017). Por lo tanto, es necesario desarrollar algoritmos más flexibles, pero igual de sistemáticos, que sean capaces de localizar nuevos elementos de este tipo de reguladores. Un grupo de trabajo utilizó modelos de resolución atómica dentro de los parámetros de sus análisis y lograron identificar nuevas variantes de riboswitches que tienen modificaciones en su dominio de reconocimiento y que pueden unir metabolitos distintos. Este estudio apoya la idea de que cambios pequeños en la secuencia del ARN de los riboswitches pueden provocar grandes cambios en la afinidad y especificidad por su ligando (Weinberg et al. 2017).

La creación de novedosos métodos computacionales también permitirá conocer más casos de los riboswitches que actúan *in trans*, y de los que se localizan en la hebra complementaria de las regiones codificantes que están regulando (André et al., 2008; Loh et al., 2009). Además, es factible descubrir riboswitches

diferentes en otras regiones génicas, como los intrones y las regiones 3' no traducidas (Breaker, 2012).

Cada vez hay más casos reportados de riboswitches traducionales que utilizan formas más elaboradas para regular la expresión de sus genes correspondientes (Breaker, 2018). Al unir lisina, el riboswitch *lysC* de *Escherichia coli* se pliega en una estructura que además de esconder el sitio de unión a ribosoma, también deja libres sitios que son blanco de la RNasa E, enzima que se encarga de degradar ARN mensajero. A través de estos procesos, la bacteria controla tanto los niveles de transcritos como su traducción. Las nuevas clases de riboswitches identificadas *in silico* representan un reto para su caracterización experimental, pues los análisis genéticos, biofísicos y bioquímicos tradicionales ya no son suficientes para determinar la totalidad de mecanismos que llevan a cabo estos interruptores celulares. Técnicas de marcado fluorescente, análisis de molécula única y modelado de resolución atómica son algunas de las herramientas que habría que implementar en las metodologías actuales (Caron et al., 2012).

A pesar de que los riboswitches tienen una alta conservación en secuencia y en estructura secundaria, sus arreglos tridimensionales siguen siendo difíciles de predecir, incluso para aquellas clases de las que ya se determinó alguna estructura cristalográfica. Esto es una limitante para la caracterización experimental de los interruptores bacterianos, pues la dinámica del ARN que se observa *in vitro* puede ser bastante diferente de la que sucede *in vivo* (Caron et al., 2012). La flexibilidad estructural de un riboswitch también impacta negativamente a la tecnología en el diseño de

riboswitches sintéticos. Investigación adicional enfocada en las propiedades de los ARNs de los diferentes aptámeros, ligandos y plataformas de expresión existentes, incrementaría el conocimiento sobre la actividad y plasticidad de estos reguladores, y favorecería la construcción de más biosensores y/o sistemas biológicos complejos que sean útiles a nivel industrial (Findeiß et al., 2017; Peselis & Serganov, 2014).

Conclusiones.

Los riboswitches son elementos de regulación versátiles y ampliamente usados en bacterias y arqueobacterias. Evolutivamente han sido seleccionados para reconocer una gran gama de metabolitos y señales celulares que permiten la regulación de la expresión génica rápida y específica. El análisis computacional de los riboswitches en el conjunto de genomas secuenciados, así como su caracterización experimental han revelado que tienen una gran plasticidad para generar diferentes modos de regulación a niveles de la transcripción, traducción y procesamiento del ARN y ha permitido asociar genes de desconocida función a metabolitos específicos, ayudando así a identificar la función de las proteínas correspondientes. Debemos de continuar desarrollando nuevos métodos de análisis y un criterio abierto para encontrar nuevos riboswitches y entender sus dinámicas de acción.

Referencias.

André, G., Even, S., Putzer, H., Burguière, P., Croux, C., Danchin, A., Soutourina, O. (2008). S-box and T-box riboswitches and antisense RNA control a sulfur metabolic operon of *Clostridium*

acetobutylicum. *Nucleic Acids Res*, 36(18):5955–5969.

Breaker, R. R. (2012). Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 4(2):1–15.

Breaker, R. R. (2018). Riboswitches and translation control. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*10(11):1-14.

Breaker, R. R., Winkler, W., & Nahvi, A. (2002). Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature*, 419(6910):952–956.

Caron, M. P., Bastet, L., Lussier, A., Simoneau-Roy, M., Massé, E., & Lafontaine, D. A. (2012). Dual-acting riboswitch control of translation initiation and mRNA decay. *PNAS*, 109(50):E34444-E3453.

Etzel, M., & Mörl, M. (2017). Synthetic Riboswitches: From Plug and Pray toward Plug and Play. *Biochem* 56(9):1181–1198.

Findeiß, S., Etzel, M., Will, S., Mörl, M., & Stadler, P. F. (2017). Design of artificial riboswitches as biosensors. *Sensors* 17(9):1–28.

Grundy, F. J., & Henkin, T. M. (1993). tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. *Cell*, 74(3): 475–482.

Grundy, F. J., & Henkin, T. M. (1994). Conservation of a transcription antitermination mechanism in aminoacyl-tRNA synthetase and amino acid biosynthesis genes in Gram-positive bacteria. *J Mol Biol*, 235:798–804.

Gutierrez-Preciado, A., Henkin, T. M., Grundy, F. J., Yanofsky, C., & Merino, E. (2009). Biochemical Features and Functional

- Implications of the RNA-Based T-Box Regulatory Mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73(1):36–61.
- Gutiérrez-Preciado, A., & Merino, E. (2012). Elucidating metabolic pathways and digging for genes of unknown function in microbial communities: The riboswitch approach. *Clin Microbiol Infect*, 18(SUPPL. 4):35–39.
- Henkin, T. M. (2014). The T box riboswitch: A novel regulatory RNA that utilizes tRNA as its ligand. *Biochim Biophys Acta* 1839(10):959–963.
- Howe, J. A., Wang, H., Fischmann, T. O., Balibar, C. J., Xiao, L., Galgoci, A. M., ... Roemer, T. (2015). Selective small-molecule inhibition of an RNA structural element. *Nature*, 526(7575):672–677.
- Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3:318–356.
- Ketzer, P., Kaufmann, J. K., Engelhardt, S., Bossow, S., Von Kalle, C., Hartig, J. S., ... Nettelbeck, D. M. (2014). Artificial riboswitches for gene expression and replication control of DNA and RNA viruses. *PNAS*, 111(5):E554-E562.
- Loh, E., Dussurget, O., Gripenland, J., Vaitkevicius, K., Tiensuu, T., Mandin, P., & Johansson, J. (2009). A trans-Acting Riboswitch Controls Expression of the Virulence Regulator PrfA in *Listeria monocytogenes*. *Cell*, 139 (4):770–779.
- Lotz, T. S., & Suess, B. (2018). Small-Molecule-Binding Riboswitches. *Microbiol Spectrum* 6(4):1–12.
- Mandal, M., Lee, M., Barrick, J. E., Weinberg, Z., Emilsson, G. M., Ruzzo, W. L., & Breaker, R. R. (2004). A glycine-dependent riboswitch that uses cooperative binding to control gene expression. *Science*, 306(5694):275–279.
- Mccown, P. J., Corbino, K. A., Stav, S., Sherlock, M. E., & Breaker, R. R. (2017). Riboswitch diversity and distribution. *RNA*, 23(7):995–1011.
- McCown, P. J., Winkler, W. C., & Breaker, R. R. (2012). Mechanism and Distribution of glmS Ribozymes. *Meth Mol Biol*, 848:1–4.
- Miranda-Ríos, J., Morera, C., Taboada, H., Dávalos, A., Encarnación, S., Mora, J., & Soberón, M. (1997). Expression of thiamin biosynthetic genes (thiCOGE) and production of symbiotic terminal oxidase cbb3 in *Rhizobium etli*. *J Bact* 179(22):6887–6893.
- Miranda-Ríos, J., & Soberón, M. (2007). Cronología del descubrimiento de los riboswitches (ARN que regula la expresión genética). Disponible en http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_08.pdf
- Monod, J. (1949). a Certain Number. *Ann Rev Microbio* 3(XI):371–394.
- Peselis, A., & Serganov, A. (2014). Themes and variations in riboswitch structure and function. *Biochim Biophys Acta*, 1839(10):908–918.
- Saad, N. Y., Stamatopoulou, V., Brayé, M., Drinas, D., Stathopoulos, C., & Becker, H. D. (2013). Two-codon T-box riboswitch binding two tRNAs. *PNAS* 110(31):12756–12761.

- Serganov, A., & Nudler, E. (2013). A decade of riboswitches. *Cell*, 152(1–2):17–24.
- Vázquez-Salazar, A., & Lazcano, A. (2018). Early Life: Embracing the RNA World. *Curr Biol*, 28:R220–R222.
- Waters, L. S., & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell*, 136(4):615–628.
- Weinberg, Z., Lünse, C. E., Corbino, K. A., Ames, T. D., Nelson, J. W., Roth, A., ... Breaker, R. R. (2017). Detection of 224 candidate structured RNAs by Comparative analysis of specific subsets of intergenic regions. *Nucleic Acids Res* 45(18):10811–10823.
- Weinberg, Z., Nelson, J. W., Lönse, C. E., Sherlock, M. E., & Breaker, R. R. (2017a). Bioinformatic analysis of riboswitch structures uncovers variant classes with altered ligand specificity. *PNAS* 114(11):E2077–E2085.
- Weinberg, Z., Nelson, J. W., Lönse, C. E., Sherlock, M. E., & Breaker, R. R. (2017b). Bioinformatic analysis of riboswitch structures uncovers variant classes with altered ligand specificity. *PNAS* 114(11):E2077–E2085.
- Welz, R., & Breaker, R. R. (2007). Ligand binding and gene control characteristics of tandem riboswitches in *Bacillus anthracis*. *RNA* 13(4):573–582.

Aislamiento y purificación de la enzima lacasa: evaluación de su potencial biodegradador en residuos agrícolas

Sandra Valdés^{1*}; Cristian Garita², Carmenza Esquivel³, Luis Roberto Villegas⁴

^{1*} Laboratorio de Investigación en Biorrefinería, Escuela de Química, Universidad Nacional de Heredia, Costa Rica. Apartado Postal: 86-3000. sandra.valdes.diaz@una.cr.

² Laboratorio Biotech, Costa Rica, Apartado Postal: 2427-4050.

³ Sede Interuniversitaria de Alajuela, Costa Rica, Apartado Postal: 86-3000

⁴ Laboratorio de Investigación en Biorrefinería, Escuela de Química, Universidad Nacional, Costa Rica. Apartado Postal: 86-3000.

Resumen

A nivel mundial, el inadecuado manejo de los residuos está generando el deterioro acelerado del planeta y, Costa Rica no es la excepción. Con el objetivo de aislar y purificar la enzima lacasa para la evaluación de su potencial degradador de residuos agrícolas, se obtuvieron cultivos axénicos de *Ganoderma applanatum* y *Trichoderma harzianum*, en los cuales se determinó la actividad de la enzima lacasa mediante la oxidación del ABTS. El aislamiento de *G. applanatum* registró la mayor concentración de la enzima, por lo que fue parcialmente purificada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), luego el extracto enzimático fue purificado con filtro Vivaspin de 20 ml y peso molecular 50 kDa. Posteriormente, se llevaron a cabo los tratamientos enzimáticos de los residuos agroindustriales de caña, piña y banano durante 45 días. Los resultados mostraron que la enzima redujo la concentración de lignina en los residuos de banano y caña en lapsos que oscilaron entre 15 y 45 días.

Palabras clave: lacasa, *Ganoderma applanatum*, *Trichoderma harzianum*, residuos agroindustriales.

Abstract

Around the world, the inappropriate waste management is generating a quick deterioration of the planet, and Costa Rica is not the exception. To isolate and purify lacassa enzymes to evaluate its biogradient potential of agricultural wastes, axenic isolates of *Ganoderma applanatum* and *Trichoderma harzianum* were used to estimate its laccase enzymatic activity by ABTS oxidation. *G. applanatum* recorded the highest amount of the enzyme, so it was partially purified by SDS-PAGE electrophoresis gel, by the way the enzymatic extract was purified with a 20 ml Vivaspin filter of 50 kDa molecular weight. After that, banana, sugar cane and pineapple wastes were submitted to

enzymatic treatments for 45 days. The assessment showed a reduction in the amount of lignin on banana and sugar cane residues at 15 and 45 days.

Keywords: laccase, *G. applanatum*, *T. harzianum*, agroindustrial wastes.

Introducción

Los residuos agroindustriales se generan como parte de los procesos de la industria, y a pesar de que ya no son de utilidad para la misma, pueden ser reaprovechados (Saval, 2012; Farmanelli et al., 2017). Sin embargo, enfrentamos serios problemas como la falta de conciencia ambiental para su manejo, insuficiente capacidad tecnológica, legislaciones más específicas y recursos económicos limitados que no permiten un adecuado tratamiento de los mismos (Saval, 2012).

Costa Rica no está exenta de esta problemática. La biomasa húmeda total generada en el 2012 fue de 27 millones de toneladas (los sectores agrícola y aserraderos constituyen el 52,7%), mientras que en biomasa seca los sectores agrícolas y forestales representaron un 55,4%. (Coto, 2013).

No fue hasta el año 2016 que se les otorgó valor a los residuos en Costa Rica. El Plan Nacional para la Gestión Integral de Residuos 2016-2021, planteó el cambio del concepto de “basura” o “desecho” por el de “residuo” (Ministerio de Salud, 2010). A pesar de ser una iniciativa con gran potencial, las carencias de personal profesional y técnico, la falta de capacitación de la población, y la falta de recursos económicos, hacen que el cumplimiento de la misma sea insuficiente

(Castro, 2008).

La ligninocelulosa es la materia orgánica más abundante en la tierra y está formada por tres polímeros: celulosa (35-50%), hemicelulosa (25-30%) y lignina (25-30%) (Wang et al., 2011). Se encuentra presente en maderas, y residuos agroindustriales y puede ser utilizada como materia prima, para la producción de celulosa en la industria. Sin embargo, para la extracción de celulosa es necesario solubilizar la lignina y debido a que este compuesto es recalcitrante, debe someterse a diferentes tratamientos térmicos o químicos, que además de costosos ocasionan daños ambientales por los productos químicos utilizados (Chang & Holtzapple, 2000).

Los hongos basidiomicetes presentan enzimas ligninolíticas como la lacasa, la lignina peroxidasa y la peroxidasa dependiente de manganeso (Almaraz et al., 2016). Con el cambio climático la acumulación de residuos ha aumentado (Sánchez et al., 2008). Lo anterior ha provocado que el productor emplee herbicidas y quemas en algunos casos (Quesada, 2003), de manera que ha sido necesario buscar alternativas mediante el uso de enzimas como la lacasa, que permitan la biodegradación de la lignina (Scott et al., 1998).

La gran variedad de sustratos que pueden ser degradados por las lacasas las hace útiles para diferentes procesos biotecnológicos tales como la remoción de compuestos fenólicos, compuestos aromáticos y colorantes (Salazar, 2018). Además, son utilizadas para procesos de blanqueamientos de pulpas, y bioremediación (Camacho et al., 2017); así como también deslignificación de biomasa lignocelulósica (Rodríguez et al., 2003).

Si tomamos en cuenta la biomasa seca total, de los residuos en el país, por ejemplo: el pinzote de banano representa el 45 %, el bagazo de caña un 28 % y los rastrojos de piña el 100 %, la cantidad de desechos agrícolas que quedan dispersos en el campo, podrían superar las 134 toneladas (Padilla & Correa, 1986). Los tres cultivos, antes mencionados, se encuentran entre los que aportan la mayor cantidad de (ton/ha) de biomasa húmeda (Coto, 2013). En el presente estudio nos dimos a la tarea de investigar el potencial biodegradador de la enzima lacasa sobre los residuos agrícolas, que constituyen un problema actual en el país.

Materiales y métodos

Mantenimiento de las cepas de estudio

Las cepas de *G. applanatum* y *T. harzianum* fueron donadas por el laboratorio de Metabolitos de la Escuela de Química, Universidad Nacional de Costa Rica. Ambas cepas se mantuvieron en agar papa dextrosa (PDA) a 28°C y un pH de 5.0, por 10 días

antes de ser reactivados en caldo extracto de malta (AEM), durante 5 días a 28°C y agitadas a 100 rpm.

Desechos agroindustriales

Los residuos agroindustriales fueron obtenidos de subproductos agrícolas de banano, caña de azúcar y piña.

Preparación del pre inóculo

Seis fragmentos (5 mm) del hongo crecido en AEM se colocaron en erlenmeyers de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo líquido, a 28°C y 150 rpm durante 4 días. De la biomasa obtenida se tomaron 0.4 g en base húmeda y se agregaron a erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de medio Wunder modificado, a 28°C, 125 rpm durante 10 días.

Extractos enzimáticos

El fluido extracelular se obtuvo centrifugando a 6000 rpm durante 30 min, a temperatura ambiente. Se tomaron muestras por triplicado a: 0, 2, 5, 7, y 10 días de cultivo. A estas muestras se les realizaron las pruebas de proteínas totales, y actividad enzimática de la lacasa como lo describe Bourbonnais et al., 1990.

Determinación de proteínas solubles

La determinación fue llevada a cabo por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Actividad de la enzima lacasa (U/I)

Las muestras obtenidas a los tiempos (días) de cultivo (t_0 , t_2 , t_5 , t_7 , t_{10}),

fueron filtradas con papel de filtro Whatman No 1, usando una bomba de vacío. Posteriormente, los extractos enzimáticos se centrifugaron a 5000 rpm durante una hora, se añadió un inhibidor de proteasas y el sobrenadante se almacenó a 4°C para su posterior medición de actividad enzimática.

La determinación de la actividad de la enzima lacasa se llevó a cabo por la oxidación ABTS [Acido 2,2'- azinobis (3 - etilbenzotiazolin)-6-sulfónico] al catión ABTS+. Para ello, se añadieron 3000 µl del extracto enzimático, luego 1500 µl de buffer acetato de sodio 0.1M, pH 5 y, finalmente, 500 µl de ABTS 1mM. La absorbancia se midió por triplicado a 420 nm en un espectrofotómetro Jasco V-730 realizando mediciones al inicio de la reacción y cinco minutos después (Tinoco et al., 2001). La actividad específica se calculó a partir de las lecturas de absorbancia mediante la siguiente ecuación (Chaparro y Rosas, 2006):

$$AE = \frac{\Delta DO \times fd \times V_t}{\Delta t \times \epsilon \times L \times V_{enz}}$$

donde:

AE: actividad enzimática en unidades internacionales por L de disolución de enzima (UL-1 enz);

Δ DO: Diferencia de densidad óptica;

fd: Factor de conversión debido al coeficiente de extinción molecular;

Vt: Volumen total de la disolución (mL);

Δ t: Tiempo de reacción en el baño maría (min); ε: coeficiente de extinción molar (ε 420

nm = 36 M⁻¹, para ABTS);

L: longitud de celda (cm);

V_{enz}: Volumen de la solución de extracto crudo utilizado (mL).

Una unidad (U) de actividad de lacasa se definió como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 µmol de ABTS, por minuto, (U = µmol / min) bajo las condiciones del ensayo.

Purificación parcial de la enzima lacasa

Se tomaron 20 mL de las muestras obtenidas del filtrado del hongo con mayor actividad enzimática lacasa y fueron colocadas en filtros de 20 ml de corte de peso molecular 50 kDa. Se centrifugó a 5000 rpm por 25 minutos a una temperatura de 25°C. Previamente el filtro fue enjuagado con agua de-ionizada y esterilizado con etanol al 70 %.

Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

La pureza de la enzima se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) según el método descrito por Laemmli, 1970, empleando algunas modificaciones. De igual manera se asociaron las bandas encontradas, con los pesos moleculares para la lacasa. Para el análisis se emplearon estándares de pesos moleculares de 3, 6, 14, 17, 28, 38, 49, 62, 98, y 198 kDa (See Blue, Plus 2, Novex, Life Technologies). El tampón concentrador se preparó en Tris HCl 0.5 M pH 6.8 y el tampón separador en Tris HCl 1.5 M a pH 8.8. En ambos casos, se añadió SDS a una

concentración de 0.4%.

Para la preparación de la muestra se añadieron 10 μL de buffer de muestra LDS (4X), 4 μL de agente reductor 10X y 26 μL de muestra parcialmente purificada, para un total de 40 μL , se mezcló en vortex, se realizó una centrifugación y se colocó a 70°C por 10 minutos. Posteriormente, se colocaron los 40 μL de las muestras en los pozos 3-8. En el pozo 2 se colocó el patrón de pesos moleculares. El tiempo de corrida fue de 60 minutos a 200 V. Una vez terminado el proceso, se dejó el gel en solución de tinción y en agitación durante toda la noche. La solución de tinción se preparó con metanol a 40 % (v/v): 10 % ácido acético (v/v): 0.25 azul de Coomassie R-250 (p/v). Para el desteñido el gel se enjuagó con agua de-ionizada, por unos segundos.

Determinación del contenido de lignina

Para la preparación de los residuos y determinación de la humedad de los residuos y del porcentaje de materia orgánica (MO_{lig}), las muestras fueron lavadas, luego esterilizadas en autoclave y secadas a 60°C durante tres días. Una vez secas, fueron guardadas en bolsas selladas e identificadas como RBC (residuos de bagazo de caña), RPB (residuos de pinzote de banano) y RCP (residuos de corona de piña). Los residuos

Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) con base en la teoría de los modelos lineales y mixtos con el software

fueron tratados de acuerdo con el procedimiento descrito en TAPPI T264 cm-07. Para la determinación de humedad se usaron los procedimientos estándares descritos en TAPPI T257. La determinación de cenizas se basó en la norma UNE 57050. *Efectividad de la enzima lacasa sobre los desechos agroindustriales*

Se pesaron 0.5 g de cada uno de los desechos agrícolas y se procedió a incubarlos con 50 mL del extracto enzimático purificado parcialmente, a 30°C y con 100 rpm en agitador orbital, durante 45 días. Cada desecho se evaluó por duplicado, a los tiempos (días) 0, 15, 30 y 45. Se colocó un grupo control que contenía solo el residuo agrícola. Luego se pesó y se calculó el porcentaje de lignina (Schwanninger et al., 2002).

$$\% \text{ de lignina} = \frac{(P_3 - P_2) \times (\% \text{ MO}_{\text{lig}}) \times 100}{P_1 \times 100 - \% H}$$

donde:

P₁: peso inicial de la muestra;

P₂: peso de la muestra después de filtrado y secado a 100 °C;

P₃: peso de la muestra después de lavado y secado;

MO_{lig}: % materia orgánica;

H: % agua respecto a la muestra molida.

estadístico InfoStat (nivel de confianza del 95%). En los casos donde no se encontró igualdad de varianza se realizó el análisis de varianza no paramétrica: Kruskal Wallis. También se utilizaron las pruebas de

comparación de medias de Turkey al 95 % de confianza.

Resultados y discusión

Actividad de la enzima lacasa (U/l)

En los resultados obtenidos del cultivo durante 10 días en medio Wunder se observó que, aunque ambas especies mostraron un comportamiento similar, el hongo *G. applanatum* mostró más actividad lacasa en el tiempo de estudio ($43,8 \times 10^{-4}$ UI) que el hongo *T. harzianum* ($32,8 \times 10^{-4}$ UI) (Tabla 1). La mayor actividad de lacasa en el ensayo se obtuvo en el día 8 y disminuyó en el día 9, debido a que el micelio comienza a cubrir el sustrato. Lo anterior es indicativo del

proceso de fructificación de *G. applanatum* (Murrieta et al., 2002; Manjarres et al., 2010).

Aunque se ha reportado la existencia de actividad lacasa producida a nivel intracelular en hongos de pudrición blanca como *Trametes versicolor* (Chernykh et al., 2008; Karp et al., 2012), la técnica utilizada en este estudio cuantificó únicamente la actividad lacasa extracelular. La actividad intracelular podría revelar valores más altos de lacasa, por lo que sería necesario realizar investigaciones que evalúen este tipo de actividad en los hongos estudiados.

Tabla 1. Actividad enzimática en los hongos *Trichoderma sp* y *Ganoderma sp*, durante 10 días.

	AE (U) $\times 10^{-4}$ t_0	AE (U) $\times 10^{-4}$ t_2	AE (U) $\times 10^{-4}$ t_5	AE (U) $\times 10^{-4}$ t_8	AE (U) $\times 10^{-4}$ t_9	AE (U) $\times 10^{-4}$ t_{10}
Hongo	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$	$x \pm DE$
<i>T. harzianum</i>	$0,02 \pm 0,01^a$	$22,1 \pm 0,27^{abcd}$	$24,7 \pm 0,03^{bcd}$	$32,8 \pm 0,04^{cd}$	$9,2 \pm 0,13^{abc}$	$9,3 \pm 0,13^{abc}$
<i>G. applanatum</i>	$0,03 \pm 0,01^{ab}$	$14,5 \pm 0,19^{abc}$	$31,2 \pm 0,38^{cd}$	$43,8 \pm 0,03^d$	$11,8 \pm 0,17^{cd}$	$26,2 \pm 0,32^{cd}$

p = 0,0434. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Determinación de proteínas solubles por el método de Bradford

Los resultados de los análisis del contenido de proteínas y la liberación de azúcares reductores permiten tener una idea general de la dinámica de crecimiento y metabolismo de cada hongo. Con base en la naturaleza de los crecimientos fúngicos, se asume que una fracción considerable de la proteína extracelular presente en el medio de cultivo corresponde a las enzimas, en este caso lacasas, que llevan a cabo la degradación del sustrato.

La concentración de proteínas solubles aumenta a medida que aumenta la actividad lacasa durante el crecimiento del

hongo (Mansur et al., 2003). En la Tabla 2 se puede observar que la mayor concentración de proteínas se presentó a los 8 y 10 días, lo cual está en concordancia con la mayor actividad enzimática observada con el hongo *G. applanatum* (Tabla 1).

La incorporación de glucosa al inicio, para incrementar el crecimiento del micelio, permite que los hongos produzcan otros tipos de proteínas necesarias para su metabolismo y crecimiento, algunas de las cuales son secretadas al medio (Vílchez, 2002). Lo anterior podría explicar el comportamiento de *G. applanatum* al día 12 del cultivo ($0,96 \pm 0,03$).

Tabla 2. Determinación de proteínas solubles en el hongo *Ganoderma sp* a los 10 días de crecimiento.

Tiempo (días)	Proteínas solubles $x \pm DE$
0	$0,66 \pm 0,01^a$
5	$0,83 \pm 0,04^{a,b,c}$
8	$0,93 \pm 0,02^{b,c}$
10	$0,76 \pm 0,06^{a,b}$

$p=0,0096$. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Purificación parcial de la enzima lacasa

La filtración permite separar la biomasa presente en el cultivo y con la membrana de 50 kDa se logra eliminar proteínas, de menor peso molecular al del

tamaño del poro y concentración de la lacasa. Lo anterior se constató con los resultados obtenidos mediante SDS-PAGE.

La electroforesis en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE (Fig 1)

evidenció una banda de proteínas con un peso molecular que oscilaba entre 28 y 38 kDa. Lo descrito corrobora lo reportado por la base de datos Protein Data Bank FAST, donde se reporta un peso molecular para la enzima lacasa de 30 kDa. No obstante, algunos reportes bibliográficos indican que el peso molecular de la lacasa oscila entre 40-60 kDa (Ramírez et al., 2003). Cabe destacar que la variabilidad podría estar relacionada

con la cepa o con las diferentes condiciones de cultivo. En entornos diferentes se pueden producir diferentes patrones de isoenzimas o inducir la aparición de isoenzimas aún no identificadas (Muñoz et al., 1997; Chernykh et al., 2008). Ramírez et al. (2003) han reportado la presencia de las isoenzimas de lacasa en fermentación sumergida empleando Cu como inductor.

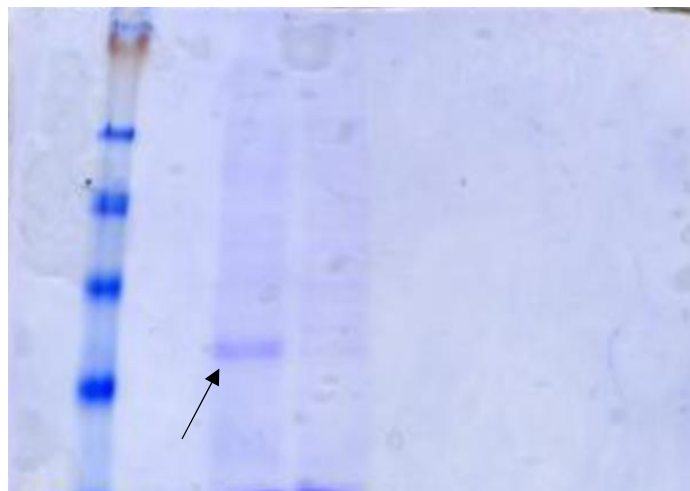


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes SDS-PAGE. La flecha muestra la enzima lacasa del hongo *G. applanatum* purificada parcialmente y concentrada al vacío. MW: patrón de peso molecular See Blue Plus 2.

Efectividad de la enzima lacasa sobre los desechos agroindustriales

La descomposición de la lignina es realizada por un número limitado de microorganismos, principalmente hongos debido a su capacidad para mineralizar la lignina (Tuomela et al., 2000). Los hongos de pudrición blanca en su hábitat natural degradan la lignina solo cuando necesitan

tener acceso a los carbohidratos presentes en la madera (Ortiz, 2009).

En los hongos, tras agotar la glucosa, conseguirán una segunda fuente de carbono mediante la degradación de lignina u otros compuestos fenólicos del medio, empleando la enzima lacasa (Xiao et al., 2006). Galhaup et al. (2002), han demostrado una relación directa entre la producción de

lacasa y el agotamiento de glucosa, que puede deberse a la transcripción del gen de lacasa en presencia de glucosa.

Al determinar los porcentajes de humedad y materia orgánica, se puede observar que los residuos de pinzote de banano (RPB) fueron inferiores a lo reportado (Tabla 3) por Ortega et al. (2005), mientras que para los residuos de corona de piña (RCP) el porcentaje de humedad fue inferior

a lo reportado (Córdoba, 2011). Con referencia a lo anterior, debemos tomar en cuenta que el valor de humedad es altamente dependiente del tipo de residuo que se va a secar, las condiciones del equipo, la temperatura y el tiempo de secado. Por otro lado, la materia orgánica se encuentra muy relacionada con las condiciones del suelo, así como la composición química del residuo (Ranganna, 1977).

Tabla 3. Porcentajes de humedad y materia orgánica obtenidos en el ensayo y reportados por la literatura.

Residuo	% H	% H reportado	% MO	% MO reportado
RBC	9,2	4-10*	11,8	9,6*****
RCP	11,4	49,2**	12,6	12,0**
RPB	14,0	82,1***	6,5	16,1***

Ortega y col, 2005; ** Córdoba, 2012, ***Turrado y col, 2009, **** Manals-Cutiño y col, 2015. H: humedad; MO: materia orgánica; RBC: Residuos de bagazo de caña; RCP: residuos de corona de piña; RPB: residuos de pinzote de banano.

En la Tabla 4, podemos observar que los residuos que mostraron menor cantidad de lignina a los 45 días fueron banano y caña. Este último mostró la mayor disminución de lignina a los 15 días. El comportamiento del banano fue diferente mostrando el mayor porcentaje de disminución de lignina a los 45 días. A diferencia de los residuos mencionados con anterioridad, en la piña no se observaron

grandes diferencias, en ninguno de los tiempos estudiados, lo cual puede deberse a la presencia de metales pesados que se encuentran en los agroquímicos que se utilizan (Collins & Dobson, 1998).

Dado que la lacasa posee un centro multicobre, estos compuestos químicos presentes en los residuos pueden actuar como quelantes sobre el Cu (II) provocando un

cambio conformacional en la proteína, y finalmente alterar la actividad enzimática (Ortellado et al., 2016). Según reportes de Pinzon et al. 2011, en el fruto de piña (*Ananas comosus*) han sido hallados plaguicidas altamente tóxicos, como endosulfan, heptacloro, aldrin, metilparation y thionazin.

Como podemos observar en la Tabla 4, entre los días 15 y 30 no hubo variación del comportamiento para ninguno de los residuos, lo cual pudo deberse a una disminución de la temperatura en el laboratorio (10°C) donde se encontraban las muestras, lo cual pudo provocar la alteración de la actividad enzimática, tomando en cuenta que la actividad óptima de la enzima lacasa se encuentra reportada a temperaturas superiores a 25°C (Sunil et al., 2011).

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre los residuos de caña y banano respecto al residuo de piña, e incluso entre ellos. Para la caña las diferencias fueron marcadas al tiempo 15 y para banano a los 45 días (Tabla 4). Lo anterior mostró que la acción de la enzima lacasa sobre la lignina en caña, ocurre mucho antes que el resto de los residuos (día 15) y no muestra variación posterior, mientras que en el banano la enzima fue más eficiente al tiempo 45.

No podemos obviar que la degradación de la biomasa vegetal es un proceso complejo que involucra la acción conjunta de un gran número de enzimas extracelulares. Sin embargo, para una eficiente hidrólisis de lignocelulosa hasta azúcares simples, se requiere la combinación sinérgica de enzimas

(Quevedo, 2011; Castro, 2013).

En los ecosistemas naturales los residuos procedentes de los organismos se depositan sobre el suelo iniciándose el ciclo de descomposición-humificación- mineralización del humus característico de la evolución de la materia orgánica del suelo (Julca-Otiniano, 2006). En este ciclo intervienen numerosos factores, entre los cuales destacan factores abióticos (humedad, temperatura, oxígeno, y composición mineralógica de la tierra) y factores bióticos (microorganismos del suelo). A diferencia de los sistemas naturales, en los agrícolas el ciclo de la materia se ve fuertemente alterado por la biomasa de la cosecha. De esta forma, la materia orgánica queda disponible para que se lleven a cabo los procesos de mineralización primaria y formación de humus estable (Quemada et al., 1997; Sánchez et al., 1989).

Sobre la base de las consideraciones anteriores, una de las alternativas para la transformación de los residuos es la implementación de la biotecnología con la utilización de enzimas. Actualmente, países con mayor desarrollo científico y tecnológico aplican la biorremediación con enzimas debido a los altos niveles de eficiencia y efectividad. Costa Rica necesita implementar este tipo de procedimiento, y con ello, disponer de metodologías eficaces para solventar los serios problemas que genera la contaminación por la acumulación de residuos.

Para la obtención de enzimas que puedan biodegradar desechos, es preciso seleccionar

Artículos

primero a los microorganismos que posean la capacidad de producir enzimas para degradar ligninas y celulosas, que son los principales componentes de los desechos agrícolas. Por lo anterior, es necesario el conocimiento de los hongos de podredumbre blanca y de su capacidad enzimática en la degradación de la ligninocelulosa, ya que son capaces de metabolizar los componentes de la madera hasta agua y CO₂.

Dada la diversidad microbiana en el planeta y la capacidad adaptativa de ciertas cepas a condiciones adversas se ha incrementado la búsqueda de nuevos microorganismos que tengan dicho potencial. A nivel de

Latinoamérica se han realizado varios trabajos enfocados a la identificación de cepas para mejorar la eficiencia de estos procesos (Gaitan, 2007). La heterogeneidad en los resultados, la necesidad de obtener mejores rendimientos; además de mejorar las metodologías existentes, sugiere la posibilidad de buscar cepas más específicas. Tal y como se ha visto, con el uso de la biotecnología existe la posibilidad de investigar nuevas enzimas fúngicas de gran potencial para superar el reto de los sustratos recalcitrantes, como la lignina (Godliving, 2012).

Tabla 4. Porcentajes de lignina en los residuos estudiados y los valores reportados por la literatura.

Tiempo (días)	% Lignina RBC	% Lignina reportado	% Lignina RCP	% Lignina reportado	% Lignina RPB	% Lignina reportado
0	20,6	19-24*	14,1	10-30**y***	12,5	11,5** 18-20***
15	12,0		13,5		11,0	
30	11,9		12,7		10,2	
45	11,2		12,5		3,0	

*Hunter, 2001; ** Sun y Cheng, 2002; Sosa y col, 2011*** Gonzales y col, 2016. RBC: Residuos de bagazo de caña; RCP: residuos de corona de piña; RPB: residuos de pinzote de banano.

Conclusiones

La cepa de *G. applanatum* mostró un mayor potencial para producir enzimas lacasas que la cepa de *T. harzianum*.

Además, se logró determinar que la actividad de las enzimas lacasas disminuyó la concentración de lignina, en desechos agroindustriales de banano y caña, en un

lapso que osciló entre 15 y 45 días del tratamiento enzimático. Estos resultados hacen de la continuación del estudio, un tema interesante en la degradación de residuos agrícolas.

Agradecimientos

Le agradecemos al PhD. Javier Alvarado Mesén, del Laboratorio de Biotecnología y Proteínas, de la Escuela de Biología, Universidad Nacional, por brindarme de manera sincera su tiempo, materiales y conocimientos para llevar a cabo la electroforesis desnaturalizante.

Referencias

- Almaraz I, Robledo A, Hernández C, y Vázquez M (2016) Producción de enzimas ligninocelulosicas a partir del uso de residuos de *Agave salmiana* como soporte-sustrato. Tesis Ingeniero en Ciencias y Tecnología de Alimentos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México. pp. 1-51.
- Bourbonnais R, Paice M (1990) Oxidation of nonphenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. FEBS Letters. 267:99–102.
[http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80298-W](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(90)80298-W)
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem.* 72:255-260.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Camacho R, Gerardo J, Navarro K & Sánchez J (2017) Producción de enzimas ligninolíticas durante la degradación del herbicida paraquat por hongos de la pudrición blanca. *Revista Argentina de Microbiología.* 49(2):89-196.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.004>
- Castro, R (2008) Marco legal moderno para la gestión integral de residuos en Costa Rica. *Ambientico.* 178: 7-8.
<http://www.ambientico.una.ac.cr/178.pdf>.
- Castro Y (2013) Estudio de la bioquímica de enzimas lignocelulolíticas. Trabajo de grado de especialización en Microbiología Industrial. Universidad Católica de Manizales, Instituto de Investigación de Microbiología y Biotecnología. Colombia. pp. 1-53.
<http://hdl.handle.net/10839/954>
- Chang V, Holtzapple M (2000) Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol.* 86:5-37.
<https://doi.org/10.1385/ABAB:84-86:1-9:5>
- Chaparro F, Rosas D (2006) Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera en la Reserva Natural La Montaña del Ocaso, Quimbaya-

Artículos

- Quindío. Tesis de grado Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. Pp 1-109.
- Collins P, Dobson A, & Field J (1998) Reduction of the 2, 2'-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazoline- 6 Sulfonate) Cation Radical by Physiological Organic Acids in the Absence and Presence of Manganese. *Appl Environ Microbiol* 64 (6):2026-2031. <http://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getRecordDetail&idt=2275226>
- Córdoba M (2011) Determinación del efecto de la concentración de la base NaOH de la celulasa y celobiasa en la hidrólisis para la producción de etanol a partir del rastrojo de piña. Tesis de licenciatura en Ingeniería química, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. pp.1-63.
- Coto O (2013) Evaluación de la generación de residuos agrícolas orgánicos (RAO) en Costa Rica e identificación de sector prioritario. (Consultoría No. 1). San José, Costa Rica. http://www.mag.go.cr/proyectos/proy_residuos-agricolasorg/productos/Informe%20RAO%20CR%20Producto%201.pdf
- Chernykh A, Myasoedova N, Kolomytseva M, Ferraroni M, Briganti F, Scozzafava A, Golovleva L (2008) Laccase isoforms with unusual properties from the basidiomycete *Steccherinum ochraceum* strain 1833. *J Appl Microbiol*. 2008 Dec; 105(6):2065-75. <http://doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03924.x>.
- Fermanelli C, Saux C & Pierella L (2018) Revalorización de Residuos Agrícolas por Pirólisis Térmica y Catalítica. *Revista Tecnología y Ciencia*. 30:217-224. <http://rtyc.utn.edu.ar/index.php/rtyc/article/view/158>
- Gaitán D, Pérez L (2007) Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Trabajo de grado título de Microbiología Industrial. Universidad Javeriana. Colombia. pp 1-81.
- Galhaup C, Goller S, Peterbauer C, Strauss J & Haltrich D (2002) Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiol* 148 (7):2159-2169. <http://doi:10.1099/00221287-148-7-2159>.
- García N, Bermúdez R, Téllez I, Chávez M & Perraud I (2017) Enzimas lacasa en inóculos de *Pleurotus spp.* *Tecnología Química*. 37(1): 39-45. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445552837004>
- Godliving Y (2012) Lignocellulolytic enzymes from tropical fungi: Types, substrates

- and applications. *Scient Res Ass.* 7 (15):1544-1555. [http://doi: 10.5897/SRE11.1812](http://doi.org/10.5897/SRE11.1812)
- González K, Daza D, Caballero P & Martínez C (2016) Evaluación de las propiedades físicas y químicas de residuos sólidos orgánicos a emplearse en la elaboración de papel. *Revista Luna Azul.* 43:499-517. <http://dx.doi.org/10.17151/luaz.2016.43.21>.
- Pinzón M, Londoño A, Blach D, Gutiérrez J, Rojas A (2011) Determinación de residuos de plaguicidas organoclorados POR gc-uECD en frutos de piña (*Ananas comosus* L.) variedad Golden MD2 en el departamento del Quindío. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas,* 9(2), 4-8. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90322644009>
- Hunter W (2001) Bagasse pulp uses in papermaking. *Database.* (<https://www.researchgate.net/publication/262597055>).
- Julca A, Meneses L, Blas R & Bello S (2006) La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia (Arica).* 24(1):49-61. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292006000100009>
- Karp SG, Faraco V, Amore A, Birolo L, Giangrande C, Soccol VT, Pandey A, Soccol CR (2012) Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol.* Jun. 114:735-9. [http://doi: 10.1016/j.biortech.2012.03.058](http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.058).
- Kumar R, Wayman CE (2009) Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments. *Biotechnol and Bioengin* 103(2):252-67. [http://doi: 10.1002/bit.22258](http://doi.org/10.1002/bit.22258)
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685. [http://doi: 10.1038/227680a0](http://doi.org/10.1038/227680a0)
- Manals E, Penedo M & Salas D (2015) Caracterización del bagazo de caña como biomasa vegetal. *Tecnología Química.* 35(2):244-255. <http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S224-61852015000200010&script=sci>
- Manjarres K, Castro A & Rodríguez E (2010) Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación.* 7(2):9-15. ISSN: 1794-4449. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69519014002>
- Mansur M, Suarez T & Gonzales A (2003) Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197).

- Appl Environ Microbiol. 64:771– 774.
<https://europepmc.org/article/med/16349507>
- Ministerio de Salud (2010) Política Nacional para la Gestión Integral de Residuos 2010-2021. 1ª. ed. San José, Costa Rica: El Ministerio, 2010. pp.1-52.
- Morales J, Herrera M, Millán A, Ruíz E, Sánchez T, Rodríguez M & Delgado, R (2018) Un estudio sobre el potencial del uso de residuos lignocelulósicos. Revista MICA. 1(1):6-23. <http://440-1805-2-PB.pdf>
- Muñoz C, Guillen R, Martínez A & Martínez M (1997) Laccase Isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties and participation in activation of molecular oxygen and Mn 2 oxidation. Appl Environ Microbiol 63(6):2166-2174
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168508/>.
- Murrieta D, Iglesias G & Iglesias L (2002) Cambios en la producción de lacasa por el hongo *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Qué. cultivado en pulpa de café en confrontación con *Trichoderma viride* Pers., un moho contaminante. Foresta Veracruzana. Foresta Veracruzana [en línea]. 2002, 4(1), 47-52 ISSN: 1405-7247.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49740109>
- Ortega G, Bueno G, Betancourt D, Alvarez I, & Gonzales AL (2005) Biotransformación de residuos lignocelulósicos con hongos *Pleurotus*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas [en línea]. 2005, 36. ISSN: 0253-5688.
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220525083>
- Ortellado L, Fonseca M, Barchuk M, Afanasiuk S, Silvana S, Villalba L & Zapata P (2016) Efecto de de iones metálicos y compuestos aromáticos sobre la actividad lacasa en *Trametes sp.* nativo de Misiones. Revista de Ciencia y Tecnología. 26: 4-10.
<https://www.researchgate.net/publication/317530247>
- Ortiz M (2009) Aproximaciones a la comprensión de la degradación de la lignina. Orinoquia. Redalyc. 13(2):37-144.
<https://www.researchgate.net/publication/45534329>
- Padilla J & Correa J (1986) Utilización de residuos. En: La industria de los derivados de la caña de azúcar. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). Ed Científico Técnica La Habana. pp. 143-158.
- Quemada M, Cabrera M & McCracken D (1997) Nitrogen release from surface-applied covercrop residues: Evaluating the CERES N submodel. Agron.J. 89:723-729. <http://doi:10.2134/agronj1997.00021962008900050003x>
- Quesada K, Alvarado P, Sibaja R & Vega J (2003) Utilización de las fibras del

- rastrajo de piña (*Ananás comosus*, variedad champaka) como material de refuerzo en resinas de poliéster comercial. Revista Iberoamericana de Polímeros. 6(2):1-23. <https://www.researchgate.net/publication/28087816>
- Quevedo B (2011) Evaluación de la degradación de residuos de floricultura para la obtención de azúcares con el uso de tres hongos lignocelulolíticos. Tesis de doctorado. Universidad Nacional de Colombia. Colombia. pp 1-178.
- Ramírez N & col (2003) Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. Revista Colombiana de Biotecnología.5(2):64-72. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/580/1096>
- Ranganna S (1977) Manual of Analysis of Fruits and Vegetable Products. New. Delhi: Tata Mc Graw. Hill Pub Co. Ltd. 634.
- Rodríguez S, Fernández M, Bermúdez R & Morris H (2003) Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus sp.* Revista Iberoamericana de Micología. 20(4):164-168. <https://pdfs.semanticscholar.org/0722/94b4bd6f085f1d9d52892249a205f9bf4b34.pdf>
- Salazar F & Castellanos R (2018) Biodecoloración de tintes sintéticos industriales por bacterias termófilas con actividad enzima tipo lacasa. Revista Ciencia y Tecnología para el Desarrollo-UJCM. 4(7):9-21. <https://pdfs.semanticscholar.org/4754/304726830d61a1f5c02e0b8311873b55aa85.pdf>
- Sánchez S, Crespo G, Hernández M & García Y (2008) Factores bióticos y abióticos que influyen en la descomposición de la hojarasca en pastizales. Pastos y Forrajes.31(2):1. <https://pdfs.semanticscholar.org/4754/304726830d61a1f5c02e0b8311873b55aa85.pdf>
- Sánchez P, Cheryl A, Scott L, Cuevas E & Lal R (1989) Organic input management in tropical agro ecosystems. In: Dynamics of soil organic matter in tropical ecosystems (J. M. O. D.C. Coleman, G. Uehara, Ed.). Universities of Hawaii y of Georgia, Maui Hawaii. pp. 125-152
- Saval S (2012). Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, presente y Futuro. BioTecnología. 16(2):14-46. <https://smbb.mx/revista-biotecnologia-2012-vol-16-no2>
- Schwanninger M & Hinterstoisser B (2002) Klason lignin: Modifications to improve the precision of the standardized determination. Holzforschung. 56(2):161-166. <https://doi.org/10.1515/HF.2002.027>
- Scott G, Akhtar M, Lentz M, Kirk T, Swaney R, & Shipley D (1998) An overview of

- Biopulping Research: discovery engineering. J Korea TAPPI. 30(4):17-27.
<https://www.esf.edu/pbe/scott/research/papers/100.pdf>
- Sun Y & Cheng J (2002) Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production. A Review. *Biores Tech* 83:1-11.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00212-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00212-7)
- Sunil SM, Renuka PS, Pruthvi K, Swetha M, Malini S, Veena SM (2011) Isolation, Purification and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus sp.* *Enz Res* 2011:7.
<https://doi.org/10.4061/2011/248735>
- TAPPI T (2002) 257 cm-02. Sampling and Preparing Wood for Analysis. Technical Association of the Pulp and Paper Industry.
<https://infostore.saiglobal.com/en-us/tappi-t-257-c>
- TAPPI T (2007) 264 cm-07. Preparation of wood for chemical analysis. Technical Association of the pulp and paper industry.
<https://infostore.saiglobal.com/en-us/standards/ta>
- Tinoco R, Pickard MA & Vazquez-Duhalt R (2001) Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Lett Appl Microbiol* 32, 331-335. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00913.x>
- Tuomela M, Vikman M, Hattaka A & Itävaara M (2000) Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Biores Tech* 72:169-183.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00104-2)
- Turrado J, Saucedo A, Sanjuán R & Sulbarán B (2009) Pinzote de *Musa balbisiana* y *Musa acuminata* como Fuente de Fibras para Papel. *Información tecnológica*. 20(4): 117-122.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642009000400013>
- Vilchez L (2002) Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaraz. Tesis Lic. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú pp. 6-12.
- Wang W, Yan L, Cui Z, Gao Y, Wang Y et al (2011) Characterization of a microbial consortium capable of degrading lignocellulose. *Bioresour Technol*. 102(19):9321-9324. [http://doi: 10.1016/j.biortech.2011.07.065](http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.065)
- Xiao Y, Chen Q, Hang J & Shi Y (2006) Selective induction, purification and characterization of a laccase isoenzyme from the basidiomycete *Trametes sp* AH28-2. *Mycologia*.96:2635. [http://doi: 10.1080/15572536.2005.11832993](http://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832993)

El papel de los compuestos polifenólicos en la síntesis verde de nanopartículas metálicas

Ana Santos-Espinoza*, Federico Gutiérrez-Miceli, Víctor Ruíz-Valdiviezo, Joaquín Montes-Molina.

Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Carretera panamericana km 1080, Boulevares, C.P. 29050, Chiapas, México.

**saes_am@hotmail.com*

Resumen

En esta revisión, se analizó la síntesis verde de nanopartículas metálicas, mediante el estudio de los compuestos polifenólicos de los extractos vegetales. Los productos de la naturaleza como extractos de varias plantas se han utilizado como reductores y como agentes de protección y esto es debido a la presencia de los compuestos polifenólicos que juegan un papel clave en estos procesos para obtener nanopartículas estables. Se discute la participación de los compuestos polifenólicos en los mecanismos de bio-reducción, estabilización y “bio-capping”, mediante sus propiedades y capacidad antioxidante, además se proponen extractos con potencial para la síntesis verde de nanopartículas metálicas.

Palabras clave: extractos vegetales, bioreducción, capacidad antioxidante.

Abstract

In this review, the greenest synthesis of metal nanoparticles was analyzed by studying the polyphenolic compounds of plant extracts. Nature's products as extracts from various plants have been used as reducing agents and as protective agents and this is due to the presence of polyphenolic compounds that play a key role in these processes to obtain stable nanoparticles. The participation of polyphenolic compounds in the mechanisms of bio-reduction, stabilization and “bio-capping” is discussed, through their properties and antioxidant capacity, and extracts with potential for green synthesis of metal nanoparticles are also proposed.

Key words: plant extracts, bioreduction, antioxidant capacity.

Introducción

La nanotecnología es un nuevo campo de investigación que ha ido creciendo y evolucionando desde 1980 (Shamaila et al., 2016). Esta ciencia se encarga de la creación, diseño, manipulación y control de la materia a escala nanométrica (1-100 nm), en la cual se

han combinado enfoques de ingeniería, química y recientemente la biología (Roy et al., 2013). Los elementos en su forma nanométrica o nanopartículas (NPs) muestran propiedades distintas a las que se manifiestan en la escala micro o macroscópica (Hochella et al., 2008) por lo que presentan aplicaciones

en diversas áreas. Las nanopartículas pueden sintetizarse por métodos físicos, químicos y biológicos. Por lo general, los métodos físicos y químicos se aplican ampliamente, sin embargo, los métodos físicos son muy costosos, mientras que los métodos químicos son perjudiciales para el medio ambiente y los organismos vivos (Thakkar et al., 2010; Narayanan et al., 2010). Aunado a esto, numerosos estudios han discutido la toxicidad de diferentes tipos de nanopartículas (Durnevet, 2007; Vijayaraghavan et al., 2010; Roy et al., 2013) por lo que los avances recientes realizados en el campo de la nanotecnología buscan hacer a las nanopartículas menos tóxicas y más aplicables. La síntesis verde de nanopartículas es uno de esos enfoques. La revisión tiene por objetivo analizar el papel de los compuestos polifenólicos sobre los mecanismos de reducción y estabilización durante la síntesis e identificar los extractos vegetales con potencial para la síntesis verde de nanopartículas.

Síntesis verde de nanopartículas

La síntesis biológica o también conocida como “síntesis verde” es el campo de la fabricación de nanopartículas mediante la utilización de sistemas biológicos como levaduras, hongos, bacterias y extractos de plantas (Wang et al., 2019). La utilización de extractos vegetales es una de las técnicas más populares y que ha cobrado mayor importancia recientemente debido a la facilidad de obtención de la materia, a la

seguridad en su manejo, a que presentan disponibilidad de una amplia gama de metabolitos y minimizan el desperdicio y los costos de energía (Kalaiarasi, 2010), es por ello, que esta tecnología se considera la más limpia.

Para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas metálicas, es necesario una solución metálica de interés y un extracto acuoso con alto contenido de compuestos polifenólicos debido a que estos son los principales compuestos que participan en los mecanismos de bio-reducción, estabilización y bio-protección para formar nanopartículas estables (Huang et al., 2007). Estas nanopartículas dan como resultado una toxicidad significativamente baja y por ende, presentan mayores oportunidades de aplicación en diversas áreas incluyendo a la medicina y agricultura. Los extractos vegetales que se han usado como agentes reductores y estabilizadores para la formación de nanopartículas metálicas se resumen en la Tabla 1.

Artículos

Tabla 1. Nanopartículas producidas usando extractos vegetales que contienen polifenoles involucrados en la bio-reducción.

Planta	NPs verdes	Tamaño (nm)	Moléculas involucradas en la reducción	Referencias
<i>Acalypha indica</i>	Ag	20-30	Quercetina	Krishnaraj et al., (2010)
<i>Apiin</i>	Ag	39	---	Kasthuri et al., (2009)
<i>Alternanthera sessilis</i>	Ag	40	Grupo carboxilo	Niraimathi et al., (2012)
<i>Andrographis paniculata</i>	Ag	67-88	Alcaloides y flavonoides	Suriyakalaa et al., (2013)
<i>Cinnamon zeylanicum</i>	Ag	45	----	Sathishkumar et al., (2009)
<i>Mentha piperita</i>	Au	150	Mentol	MubarakAli et al., (2011)
<i>H. canadensis</i>	Ag	113	Fenoles	Das et al., (2011)
<i>Jatropha curcas</i>	Ag	10-20	---	Bar et al., (2009)
<i>Euphorbia prostrata</i>	Ag	52	polifenoles	Zahir y Rahuman (2012)
<i>Caria papaya</i>	Ag	15	Hidroxil flavonas, catequinas	Jain et al., (2009)
<i>Justicia spicigera</i>	Ag, Cu, Ag-Cu	32-46	---	Bernardo-Mazariegos et al., (2018)
<i>Cassia fistula</i>	Au	55-98	Grupo hidroxilo	Daisy et al., (2012)
<i>Citrullus colocynthis</i>	Ag	5-70	Polifenoles	Satyavani et al., (2011)
<i>Medicago Sativa</i>	Fe	2-10	---	Herrera-Becerra et al., (2008)
<i>Green Tea</i>	nZVI	20-40	---	Kuang et al., (2013)
<i>Iresine herbstii</i>	Ag	44-64	Compuestos fenólicos	Dipankar et al., (2012)
<i>Camellia sinensis</i>	nZVI	5-15	---	Mystrioti et al., (2016)
<i>Tinospora cordifolia</i>	Ag	34	Compuestos fenólicos	Jayaseelan et al., (2011)
<i>Terminalia chebula</i>	Ag	25	---	Edison y Sethuraman (2012)
<i>Melia azedarach</i>	Ag	78	Ácido tánico, polifenoles	Sukirtha et al., (2012)
<i>Phyllanthus niruri</i>	TiO ₂	32	Grupos carboxílicos	Shanavas et al., (2019)
<i>Trigonella-foenum graecum</i>	Au	15-25	Flavonoides	Aromal et al., (2012)

--- Molécula no identificada

Propiedades de los compuestos polifenólicos

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas encontradas en las plantas. Existen varias clases y subclases de polifenoles que se definen en función del número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan estos anillos. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides (Figura 1).

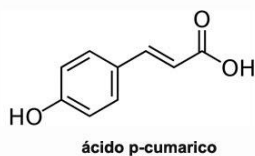
Los polifenoles exhiben una amplia gama de propiedades, dependiendo de sus estructuras particulares, pero las propiedades fundamentales que subyacen a su actividad son:

- La actividad reductora, que gobierna sus propiedades antioxidantes y su sensibilidad a la oxidación.
- Las propiedades de unión, que se atribuyen a sus actividades quelantes de metales.
- Las propiedades fisicoquímicas de los polifenoles, especialmente su reactividad química y transformaciones, tienen implicaciones potenciales en el campo de la nanotecnología como es la fabricación de nanopartículas, debido a que los polifenoles tienen la capacidad de transferir electrones y/o átomos de hidrógeno durante la neutralización de radicales libres (Brewer, 2011; Ndhlala, 2010).

Derivados del ácido hidroxibenzoico

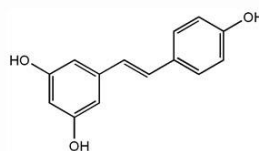


Derivados del ácido hidroxicinámico

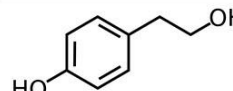


Derivados del ácido hidroxibenzoico

Estilbenos

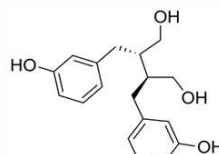


Alcoholes fenólicos



Derivados del ácido hidroxicinámico

Lignanos



Flavonoides

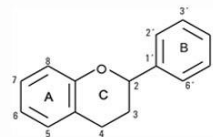


Figura 1. Estructura de los principales grupos de polifenoles.

Como se conoce comúnmente, la capacidad antioxidante y reductora de los compuestos fenólicos depende del número de grupos hidroxilo en la estructura del anillo y sus disposiciones. Una posición orto de los grupos hidroxilo confiere una alta estabilidad al radical formado después del proceso de neutralización radical (Cuvelier et al., 1992) por ende los compuestos polifenólicos con estas características son sumamente importantes a considerar en la síntesis verde para obtener nanopartículas más estables.

Sun et al., (2014) demostraron que nanopartículas de plata (AgNPs) obtenidas por síntesis verde presentaron mayor estabilidad que los preparados por diferentes procesos como AgNPs recubiertos con PVA, AgNPs sin recubrir y AgNPs comerciales, esto mediante una prueba de liberación de iones de plata de las nanopartículas, en la cual la tasa de liberación de iones de plata más baja la encontraron en nanopartículas sintetizadas con extracto de té. La razón de esto es porque la superficie de AgNPs de síntesis verde se encontraba suficientemente cubierta por los grupos del extracto de té, grupos como carboxilo, fenoles, hidroxilos etc., estos grupos funcionales de los compuestos polifenólicos inhiben la disolución de AgNPs por oxígeno para liberar los iones de plata (Adegboyega et al., 2013). Además, los iones de plata liberados podrían volver a reducirse a AgNPs debido a los diversos grupos

funcionales de los polifenoles y su gran capacidad reductora.

De acuerdo, a la literatura se conoce que cuanto mayor sea el número de grupos hidroxilo, mejores serán sus propiedades antioxidantes de los polifenoles (Villano et al., 2005). La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos está bien relacionada con el potencial de reducción. Butkovic et al. (2004), observaron la correlación lineal entre los potenciales de reducción de los flavonoides y el logaritmo de las constantes de velocidad para la reacción con los radicales DPPH. Cuanto menor es el potencial de reducción, más probable es que la molécula done su electrón al radical. Por ejemplo, en la Tabla 2 se muestran valores de los potenciales de reducción para algunos compuestos polifenólicos, los compuestos con bajos potenciales de oxidación ($E_{pa} < 0.45$ V) muestran la actividad antioxidante, mientras que aquellos con los altos valores de E_{pa} (> 0.45 V) actúan como prooxidantes (Simic et al., 2007). Un análisis estructural de los compuestos fenólicos confirma que la sustitución múltiple de OH y la conjugación de compuestos tienen un impacto en el perfil electroquímico. La presencia de un segundo grupo hidroxilo en el anillo de benceno da como resultado una reducción considerable de los valores de E_{pa} (kaempherol y quercetina en la Tabla 2), la introducción de un grupo metoxi en lugar de un grupo hidroxilo en la posición meta desplaza el E_{pa} hacia un

valor más positivo (ácidos ferúlico y cafeico en la Tabla 2) (Sousa et al., 2004; Trabelsi et al., 2004).

Tabla 2. Valores de potencial de reducción para compuestos fenólicos.

Compuestos fenólicos	Epa [V]*	Referencia
Miricetina	0.20	Freeman et al., (2010)
Quercetina	0.29	Freeman et al., (2010)
Ácido cafeico	0.31	Sousa et al., (2004)
Catequina	0.36	Butkovic et al., (2004)
Ácido clorogénico	0.39	Sousa et al., (2004)
Kaempferol	0.39	Butkovic et al., (2004)
Fisetina	0.39	Gil & Couto, (2013)
Luteolin	0.41	Freeman et al., (2010)
Ácido ferúlico	0.53	Sousa et al., (2004)
Ácido p-cumárico	0.59	Freeman et al., (2010)
Hesperetina	0.72	Freeman et al., (2010)
Naringenina	0.76	Freeman et al., (2010)

Participación de los polifenoles en la síntesis de nanopartículas metálicas

En la Figura 2 se muestra una representación esquemática de la participación de grupos fenólicos (R-OH), el mecanismo de reducción del ion metálico y la formación de nanopartículas, esta reducción se realiza mediante la presencia de grupos funcionales de los compuestos polifenólicos de los extractos de plantas. Este proceso se realiza en tres niveles: fase de activación, fase de crecimiento y fase de terminación. En la primera fase, los iones metálicos se recuperan de la sal deshidratada por la acción de

Uno de los factores que regula la síntesis de nanopartículas metálicas de

compuestos polifenólicos que tienen capacidad de reducción (el enol de los compuestos flavonoides y fenólicos puede liberar los electrones al romper el enlace O-H y el electrón liberado puede usarse para reducir los iones metálicos es decir se cambian a estados de valencia cero). Las formas enol se convierten en quinonoides estables mediante dos estructuras resonantes, posteriormente se produce la nucleación de los átomos metálicos reducidos en la fase de crecimiento, y en la fase de terminación se obtiene la forma final de las nanopartículas.

acuerdo con Haverkamp y Marshall (2008) para la transformación biológica, es el

Artículos

potencial redox (potencial de reducción electroquímico estándar) de la transformación del ion del elemento a su forma de valencia cero (ejemplo de Ag^+ a Ag^0), es un factor importante a considerar, y está limitada según los autores a valores mayores a 0 Voltios (V) (potencial electroquímico relativo a un electrodo estándar de hidrógeno) y por lo tanto incluye solamente a elementos como el Au, Ag, Cu, Se, Pd, Ir, Pt, Cr, Ru. Mientras mayor sea el valor positivo de este potencial redox más fácil ocurre la biotransformación, es decir, habrá un mayor porcentaje de recuperación del elemento en su forma nanoparticulada. Otros elementos como el Zn, Ni, Pb, Tl y Cd que tienen potenciales redox menores a 0 V para la transformación de su forma iónica común a la forma con valencia cero parecen

ser susceptibles de transformarse en nanopartículas usando extractos vegetales (Kuppusamy et al., 2016).

Por lo tanto, la síntesis de nanopartículas metálicas depende del elemento metálico a utilizar y el extracto vegetal, debido a que la suma de las capacidades reductoras de estos compuestos polifenólicos encontradas en el extracto vegetal nos daría un mayor potencial reductor global quien es el responsable del mecanismo de reducción y estabilización de las nanopartículas, por ende, son los elementos más importantes durante la síntesis verde; en la Tabla 3 se presentan algunos extractos con potencial para la síntesis verde de nanopartículas.

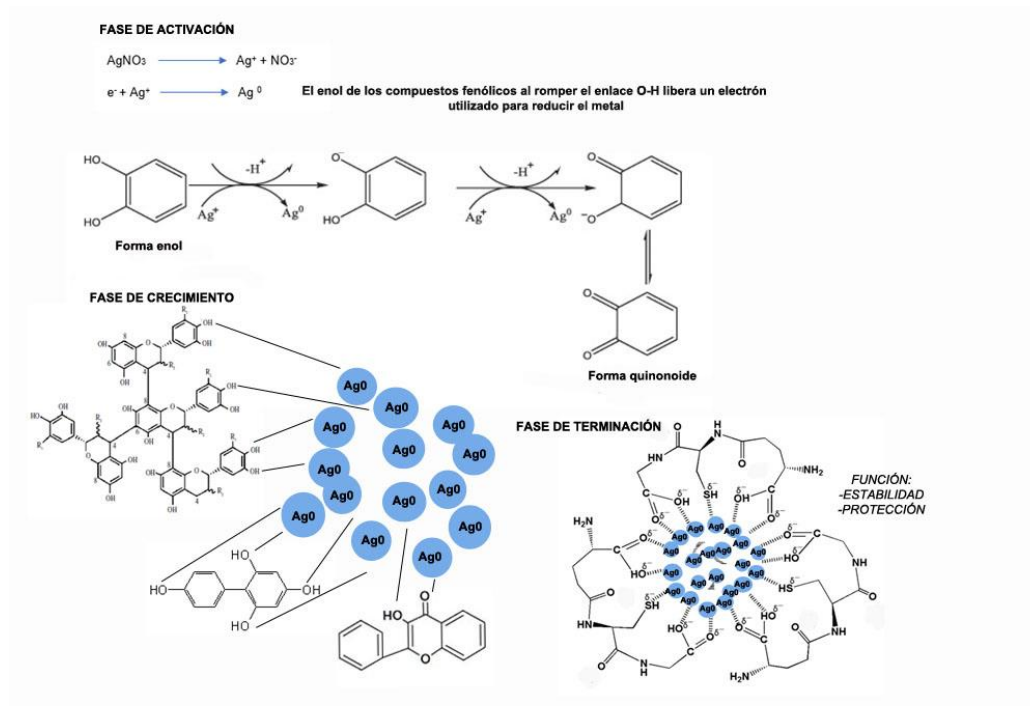


Figura 2. Posible mecanismo de bio-reducción, estabilización y bio-capping para formar nanopartículas.

Conclusiones

Los compuestos polifenólicos son los elementos más importantes en la síntesis verde de nanopartículas ya que juegan el papel de agentes reductores debido a que presentan estructuras químicas que les confiere mayor potencial reductor, protección y estabilidad. Sin embargo, hace falta mucho aún para investigar y desarrollar en cuanto al control y estandarización de las capacidades reductoras de los extractos vegetales para la manipulación de sistemas a escala industrial que permitan obtener nanopartículas con los estándares de funcionalidad.

Referencias

- Adegboyega N F, Sharma V K, Siskova K, Zboril R, Sohn M, Schultz B J & Banerjee S (2013) Interactions of aqueous Ag⁺ with fulvic acids: mechanisms of silver nanoparticle formation and investigation of stability, *Environ. Sci. Technol.* 47: 757–764.
- Alimi H, Hfaiedh N, Bouoni Z, Sakly M, & Ben Rhouma (2011) Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica f. inermis* flowers extract in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32: 406–16.
- Aromal S & Philip D (2012) Green synthesis of gold nanoparticles using *Trigonella foenum-graecum* and its size dependent catalytic activity. *Spectrochim.* 97: 1–5.
- Bar H, Bhui, D, Sahoo G, Sarkar P, De S & Misra A (2009) Green synthesis of silver nanoparticles using latex of *Jatropha curcas*. *Colloid. Surf. Physicochem.* 339:134-139.
- Bernardo-Mazariegos E, Valdez-Salas B, González-Mendoza D, Abdelmoteleb A, Tzintzun O, Ceceña Duran C, & Gutiérrez-Miceli F (2018) Silver nanoparticles from *Justicia spicigera* and their antimicrobial potentialities in the biocontrol of foodborne bacteria and phytopathogenic fungi. *Revista Argentina de Microbiología*.
- Brewer, M S (2011) Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Technology*.10: 221-247.
- Brighente I M C, Dias M, Verdi L G, & Pizzolatti M G (2007) Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Some Brazilian Species. *Pharm. Biol.* 45: 156–161.
- Butkovic V, Klasinc L & Bors W (2004) Kinetic study of flavonoid reactions with stable radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 52: 2816-2820.
- Cuvelier M E, Richard H & Berset C (1992) Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure –activity relationship. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 56: 324-325.

- Daisy P & Saipriya K (2012) Biochemical analysis of *Cassia fistula* aqueous extract and phytochemically synthesized gold nanoparticles as hypoglycemic treatment for diabetes mellitus. *Int. J. Nanomed.* 7:1189–1202.
- Das R K, Gogoi N & Bora U (2011) Green synthesis of gold nanoparticles using *Nyctanthes arbortristis* flower extract. *Bioprocess Biosys.* 34: 615–619.
- Diouf P N, Stevanovic T & Boutin Y (2009) The effect of extraction process on polyphenol content, triterpene composition and bioactivity of yellow birch (*Betula alleghaniensis* Britton) extracts, *Ind. Crops Prod.* 30: 297–303.
- Dipankar C & Murugan S (2012) The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts. *Colloid Surf.* 98: 112–119.
- Durnev A D (2007) Toxicología de nanopartículas. *Bull Exp Biol Med* 145: 72–74.
- Edison T J I & Sethuraman M G (2012) Instant green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* fruit extract and evaluation of their catalytic activity on reduction of methylene blue. *Process Biochem.* 47: 1351-1357.
- Freeman B L, Eggett D L & Parker T L (2010) Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. *Journal of Food Science.* 75: 570-576.
- García-Pérez M E, Royer M, Duque-fernandez A, Diouf P N, Stevanovic T, & Pouliot R (2010) Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes J. *Ethnopharmacol.*
- Gil E S & Couto R O (2013) Flavonoid electrochemistry: a review on the electroanalytical 4 applications. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 23: 542-558.
- Haverkamp R G & Marshall A T (2008) The mechanism of metal nanoparticle formation in plants: limits on accumulation. *J. Nanoparticle Res.* 11: 1453-1463.
- Herrera-Becerra R, Zorrilla C, Rius J L & Ascencio J A (2008) Electron microscopy characterization of biosynthesized iron oxide nanoparticles. *Appl. Phys. A* 91: 241-246.
- Hochella M F, Lower S K, Maurice P A, Penn R L, Sahai N, Sparks D L & Twining B S (2008) Nanominerals, mineral nanoparticles, and Earth systems. *Science.* 319: 1631-1635.
- Huang J, Li Q, Sun D, Lu Y, Su Y, Yang X, Wang H, Wang Y, Shao W, Ning H, Hong J & Chen C (2007) Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinna-momum*

- camphora *Microorganisms* leaf. *Nanotechnology*. 18: 105-104.
- Jain D, Daima H K, Kachhwaha S & Kothari S L (2009) Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their anti microbial activities. *Dig. J. Nanomat. Bios.* 4: 557–563.
- Jayaseelan C, Rahuman A A, Rajakumar G, Kirthi A V, Santhoshkumar T & Marimuthu S (2011) Synthesis of pediculocidal and larvicidal silver nanoparticles by leaf extract from heart leaf moon seed plant *Tinospora cordifolia* Miers. *Parasitol. Res.* 109: 185–194.
- Kalaiarasi R et al. (2010) Phytosynthesis of nanoparticles and its applications. *Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol.* 11: 1–16.
- Kasthuri J, Veerapandian S & Rajendiran N (2009) Biological synthesis of silver and gold nanoparticles using *apiin* as reducing agent. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 68: 55-60.
- Krishnaraj C, Jagan E G, Rajasekar S, Selvakumar P, Kalaichelvan P T & Mohan N (2010) Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 76: 50-56.
- Kuang Y, Wang Q, Chen Z, Megharaj M & Naidu R (2013) Heterogeneous Fentonlike oxidation of monochlorobenzene using green synthesis of iron nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* 410: 67-73.
- Kuppusamy P, Yusoff M M & Govindan N (2016) Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications - An updated report. *Saudi Pharm* 24: 473-484.
- MubarakAli D, Thajuddin N, Jeganathan K & Gunasekaran M (2011) Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 85: 360-365.
- Mystrioti C, Xanthopoulou T D, Tsakiridis P, Papassiopi N & Xenidis A (2016) Comparative evaluation of five plant extracts and juices for nanoiron synthesis and application for hexavalent chromium reduction. *Sci. Total Environ.* 539: 105-113.
- Narayanan K B & Sakthivel N (2010) Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes, *Adv. Colloid Interface Sci.* 156: 1–13.
- Ndhlala A R, Moyo M & Van Staden J (2010) Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules? *Molecules* 15: 6905-6930.
- Nidhija Roy, Archana Gaur, Aditi Jain, Susinjan Bhattacharya & Vibha Rani (2013) Green synthesis of silver nanoparticles: An approach to

- overcome toxicity. *Environmental toxicology and pharmacology*. 36: 807–812.
- Niraimathi K L, Sudha V, Lavanya R & Brindha P (2012) Biosynthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera sessilis* (Linn.) extract and their antimicrobial, antioxidant activities. *Colloid Surf. B* 88: 34–39.
- Qian Sun, Xiang Caia, Jiangwei Li, Min Zheng, Zuliang Chen & Chang-Ping Yu (2014) Green synthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract and evaluation of their stability and antibacterial activity. *Colloids and Surfaces*.
- Sajjad Shamailaa, Ahmed Khan, Leghari Sajjadb, Najam-ul-Athar Rymaa, Sidra Anis Farooqi, Nyla Jabeena, Sania Majeeda & Iqra Farooqc (2016) Advancements in nanoparticle fabrication by hazard free eco-friendly green routes. *Applied Materials Today*. 5:150–199.
- Santos S A O, Pinto P C R O, Silvestre A J D, & Neto C P (2010) Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Ind. Crops Prod.*31: 521–526.
- Santos S A O, Villaverde J J, Freire C S R, Domingues M R M, Neto C P & Silvestre A J D (2012) Phenolic composition and antioxidant activity of *Eucalyptus grandis*, *E. urograndis* and *E. maidenii* bark extracts,” *Ind. Crops Prod.* 39: 120–127.
- Sathishkumar M, Sneha K, Won S W, Cho C W, Kim S & Yun Y S (2009) *Cinnamon zeylanicum* bark extract and poder mediated green synthesis of nanocrystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloid Surf. B* 73: 332–338.
- Satyavani K, Gurudeeban S, Ramanathan T & Balasubramanian T (2011) Biomedical potential of silver nanoparticles synthesized from calli cells of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. *J. Nanobiotechnol.* 9: 43–51.
- Shanavas S, Priyadharsan A, Karthikeyan S, Dharmaboopathi K, Ragavan I, Vidya C, Acevedo R & Anbarasana P M (2019) Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Phyllanthus niruri* leaf extract and study on its structural, optical and morphological properties. *Materials Today: Proceedings*.
- Simić A, Manojlović D, Segan D & Todorović M, (2007) Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*. 12: 2327-2340.
- Sousa R W, Da Rocha C, Cardoso C L, Silva S D H & Zanoni B M V (2004) Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 17: 619-633.

Artículos

- Sukirtha R, Priyanka K M, Antony, J.J., Kamalakkannan, S., Thangam, R., Gunasekaran, P., Krishnan, M., Achiraman, S., 2012. Cytotoxic effect of Green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. *Process Biochem.* 47, 273–279.
- Suriyakalaa U, Antony J J, Suganya S, Siva D, Sukirtha R, Kamalakkannan S, Pichiah P B T & Achiraman, S (2013) Hepatocurative activity of biosynthesized silver nanoparticles fabricated using *Andrographis paniculata*. *Colloid Surf. B* 102: 189–194.
- Thakkar K N, Mhatre S S & Parikh R Y (2010) Biological synthesis of metallic nanoparticles, *Nanomedicine.* 6: 257–262.
- Trabelsi S K, Tahar N B & Abdelhedi R (2004) Electrochemical behavior of caffeic acid. *Electrochimica* 49: 1647-1654.
- Vijayaraghavan K, Kamala S P & Nalini (2010) Biotemplates in the green synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Biotechnology.* 5: 1098–1110.
- Villano D, Fernández-Pachón M S, Troncoso A M & García-Parrilla M C (2005) Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analytica Chimica* 538: 391-398.
- Yinan Wang (2019) Green synthesis of nanoparticles for the remediation of contaminated waters and soils: Constituents, synthesizing methods, and influencing factors.
- Yogendra Kumar M S, Tirpude R J, Maheshwari D T, Bansal A, & Misra K (2013) Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves in vitro. *Food Chem.* 14: 3443–50.
- Zahir A A & Rahuman A A (2012) Evaluation of different extracts and synthesized silver nanoparticles from leaves of *Euphorbia prostrate* against the plant *Haemaphysalis bispinosa* and *Hippobosca maculate*. *Vet. Parasitol.* 187: 511–520.

Síntesis de fitonanopartículas de cobre, una opción más amigable con el medio ambiente

Fermín Jonapá-Hernández*, Nancy Ruiz-Lau, Víctor M. Ruiz-Valdivieso, Federico A. Gutiérrez-Miceli

*Instituto tecnológico de Tuxtla Gutiérrez Chiapas. Carretera Panamericana
Bulevares 1080, C.P. 29050. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.*

*ferminibq@gmail.com.

Resumen

En el presente trabajo se realiza una síntesis sobre la historia de la nanotecnología enfocándose en su origen y los conceptos actualmente utilizados en esta área de la ciencia. De igual manera se retoman los puntos clave para llevar a cabo la síntesis verde y la importancia de este método para obtener nanopartículas de cobre a partir de extractos vegetales, así como las principales herramientas para su caracterización.

Palabras clave: *síntesis verde, nanotecnología, extractos vegetales.*

Abstract

In the present work a synthesis is made about the history of nanotechnology focusing on its origin and the concepts currently used in this area of science. Similarly, the key points are taken to carry out the green synthesis and the importance of this method to obtain copper nanoparticles from plant extracts, as well as the main tools for their characterization.

Key words: *green synthesis, nanotechnology, plant extracts.*

Introducción

Actualmente la ciencia se encuentra en una tendencia para lograr la miniaturización de productos dando lugar a la "nano era" implicando así la manipulación de materia en la nano-escala la cual ha

evolucionado hasta nanotecnología. Consecuentemente nacen las nanopartículas (NPs) las cuales por diversos autores (Husen y Siddiqi, 2014; Devatha y Thalla, 2018; Das y Chatterjee, 2019;) han sido clasificadas de acuerdo con su origen, forma, materiales y

tipo de síntesis. Actualmente existe una controversia respecto al uso de nanopartículas en sistemas o prácticas en las cuales se tengan que exponer directamente al medio ambiente destacando la agricultura, para la cual se está proponiendo el uso de NPs de cobre como control de fitopatógenos debido a las propiedades históricas antimicrobianas que posee este metal. Sin embargo, aún se desconocen los efectos secundarios de la aplicación de estas NPs. Aunado a eso no se cuenta con una regularización para el uso de este tipo de tecnologías la cual se pueda tomar como referencia. Es por todo lo anterior que el objetivo del presente trabajo es analizar la situación actual sobre los conceptos de síntesis verde de nanopartículas y los aspectos importantes para llevar a cabo la síntesis de nanopartículas de cobre más amigables con el medio ambiente utilizando extractos de vegetales.

Origen del concepto de nanopartícula

El inicio de la nanociencia se dio el 29 de diciembre de 1959, en una reunión de la American Physical Society en el Instituto de Tecnología de California, cuando el físico Richard Feynman dio una charla titulada "Hay mucho espacio en la parte inferior" dando así origen a la idea y las bases para el concepto de nanociencia. Posteriormente el control sobre átomos y moléculas, y su posterior manipulación, dio lugar al dominio de la nanotecnología. Sin embargo, en 1974, Norin Taniguchi usó por primera vez la palabra

"Nanotecnología" al presentar un documento titulado "Sobre el concepto básico de nanotecnología" en la Conferencia Internacional sobre Ingeniería de Producción en Tokio, Japón (Taniguchi, 1974; Kumar et al. 2019). Diversas instituciones como la Iniciativa Nacional de Nanotecnología de los Estados Unidos (NNI, por sus siglas en inglés), la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) y la Comisión Europea en la Unión Europea se han dado la tarea de construir una definición para nanotecnología. Todos estos organismos convergen en que nanotecnología es la aplicación del conocimiento y el control de la materia para obtener materiales en dimensiones entre aproximadamente 1 y 100 nanómetros (nm), donde los fenómenos únicos permiten novedosas aplicaciones (Horikoshi y Serpone, 2013; Zamorano, 2016; Das y Chatterjee, 2019). Como consecuencia de la nanotecnología nacen las nanopartículas las cuales por definición son partículas que tienen un diámetro de 1-100 nm. Estas nanopartículas tienen propiedades únicas, como una gran relación área-superficie-volumen y alta energía superficial (Taniguchi, 1974; Ali et al. 2016; Maham et al. 2017). Los primeros reportes sobre la aplicación industrial de partículas coloidales se informaron en 1676, y la aplicación de oro coloidal se remonta a principios de 1718 (Kumar et al. 2019).

Aspectos importantes sobre la utilización de síntesis verde

Artículos

Las fitonanopartículas de Cu^{2+} pertenecen a la subclasificación de nanopartículas de síntesis verde y se les denomina fitonanopartículas por el hecho de usar extractos de plantas o partes de ellas como las hojas, tallos, raíces, flores o frutos en los cuales se encuentran compuestos polifenólicos, azúcares, proteínas, aminoácidos u otros compuestos capaces de reducir a agentes metálicos como el cobre. La síntesis verde de nanopartículas representa un avance sobre otros métodos porque es simple, rentable y relativamente reproducible, y a menudo da como resultado materiales más estables comparada con otros métodos como la síntesis química. Los microorganismos también se pueden utilizar para producir nanopartículas, pero la velocidad de síntesis es lenta y solo un número limitado de los tamaños y las formas son susceptibles al método en comparación con las rutas que involucran materiales a base de plantas. En el método de síntesis verde, no hay requisito para alta presión, energía, temperatura o productos químicos tóxicos. Por lo tanto, hoy en día, muchos investigadores se están desviando del uso de métodos sintéticos. Debido a estas ventajas la síntesis verde está ganando una importancia en todos los campos centrándose en un entorno más verde. A continuación, en la tabla 1 se presentan

algunos reportes sobre síntesis verde de NPs de Cu^{2+} , lo destacable aquí es la diversidad de plantas que se pueden llegar a utilizar para la obtención de fitonanopartículas. Sin embargo, se recomienda que el contenido de polifenoles sea alto debido a que son los principales precursores para la obtención de NPs recomendándose principalmente el uso de las hojas para obtener los extractos debido a que ahí se encuentra la mayor cantidad de estos compuestos en la mayoría de las plantas. Aunque Mary et al. (2019), proponen el uso del jugo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) para obtener NPs de cobre destacando que, en su trabajo, es el tallo la parte de la planta el que se usa para el extracto, lo que comprobó que se pueden utilizar partes diferentes a las hojas para elaborar el extracto de síntesis. El tamaño de las fitonanopartículas obtenidas es muy variados entre protocolo y protocolo, probablemente debido a las diferentes estructuras de los compuestos presentes en los extractos. Así, se obtiene una amplia variedad de tamaños de NPs. Por ejemplo, Chaudhary et al. (2019) e Ismail (2020), ambos utilizando sulfato de cobre, pero obtenido de diferentes plantas (*Musa acuminata* y *Rhus coriaria* L.) no lograron obtener el mismo rango de tamaños de NPs reportando 84.40 y 7-24 nm respectivamente.

Artículos

Tabla 1. Protocolos de síntesis de fitonanopartículas de cobre.

Planta y compuesto de cobre utilizado en la síntesis	Tamaño reportado	Referencia
<i>Arachis hypogaea</i> L. y óxido de cobre	30-50 nm	(Ramesh et al, 2011)
<i>Aloe barbadensis</i> Miller y sulfato de cobre	20 nm	(Gunalan et al, 2012)
<i>Calotropis procera</i> L. y acetato de cobre	50 y 100 nm	(Harne et al, 2012)
<i>Tabernaemontana divaricate</i> y sulfato de cobre	48 nm	(Sivaraj et al, 2014)
<i>Acalypha indica</i> sulfato de cobre	26–30 nm	(Sivaraj et al, 2014)
<i>Ginkgo biloba</i> L. y cloruro de cobre	15-20 nm	(Nasrollahzadeh y Sajadi, 2015)
<i>Calotropis gigantea</i> y nitrato cúprico	20 nm	(Sharma et al, 2015)
<i>Gloriosa superba</i> L. y nitrato cúprico	5–10 nm	(Naika et al, 2015)
<i>Citrus limon</i> y acetato de cobre monohidratado	5-20 nm	(Mohan et al, 2015)
<i>Punica granatum</i> y acetato de cobre monohidratado	10–100 nm	(Ghidan et al, 2016)
<i>Thymus vulgaris</i> L. y cloruro de cobre	30 nm	(Nasrollahzadeh et al, 2016)
<i>Plantago asiatica</i> y cloruro de cobre	7–35 nm	(Nasrollahzadeh et al, 2017)
<i>Aglaia elaeagnoidea</i> y nitrato de cobre	36-54 nm	(Manjari et al, 2017)
<i>Azadirachta indica</i> y Cloruro de cobre dihidratado	48 nm	(Nagar y Devra, 2018)
<i>Ziziphus spina-christi</i> L. y sulfato de cobre	5–20 nm	(Khani et al, 2018)
<i>Syzygium aromaticum</i> y acetato de cobre	20 nm	(Rajesh et al, 2018)
<i>Camellia sinensis</i> y sulfato de cobre	26–40 nm	(Asghar et al, 2018)
<i>Sida acuta</i> y sulfato de cobre	61.7 nm	(Sathiyavimal et al, 2018)
<i>P. granatum</i> y cloruro de cobre	40–80 nm	(Nazar et al, 2018)
<i>Punica granatum</i> y sulfato de cobre	20.33 nm	(Vidovix et al, 2019)
<i>Tinospora cardifolia</i> y cloruro de cobre	63.3-143 nm	(Sharma et al, 2019)
<i>Enicostemma axillare</i> y sulfato de cobre	30 nm	(Chand et al, 2019)

Artículos

<i>Musa acuminata</i> y sulfato de cobre	50–60 nm	(Chaudhary et al, 2019)
<i>Saccharum officinarum</i> y nitrato de cobre	84.40 nm	(Mary et al, 2019)
<i>Psidium guajava</i> y acetato de cobre monohidratado	2–6 nm	(Singh et al, 2019)
<i>Euphorbia maculata</i> y sulfato de cobre	18 nm	(Pakzad et al, 2019)
<i>Justicia specigera</i> y nitrato de cobre	53 nm	(Gonzales et al, 2019)
<i>Rhus coriaria</i> L. y sulfato de cobre	7-24 nm	(Ismail, 2020)
<i>Curcuma longa</i> y acetato de cobre dihidratado	5-25 nm	(Jayarambabu et al, 2020)

Síntesis verde y caracterización de nanopartículas de cobre

La síntesis de NPs a partir de extractos de plantas implica tres fases: (1) fase de activación, (2) fase de crecimiento y (3) fase de terminación del proceso. Durante la activación, se producirá la reducción de iones metálicos, y esto conduce a la formación de nuevas estructuras mediante autoorganización (nucleación) reducción de átomos metálicos. La segunda fase implica el crecimiento de la estructura recién formada y una mayor reducción de los iones metálicos con un aumento de la estabilidad termodinámica de las NPs formadas (Devatha and Thalla, 2018). En la figura 1 se representa de forma general los pasos de la síntesis de fitonanopartículas, así como las principales

herramientas reportadas para la caracterización de las fitonanopartículas de cobre. Estas técnicas y herramientas para caracterizar NPs de cobre ayudan a conocer el tamaño, forma, propiedades hidrostáticas entre otras. Además, asegura la presencia y formación de las NPs lo que permite discutir sobre algunas de sus propiedades o mecanismos de acción sobre los sistemas en los que se emplean. Las técnicas y herramientas más reportadas son el microscopio electrónico de barrido (SEM) por sus siglas en inglés, análisis de rayos X dispersivos de energía (EDX), microscopía de fuerza atómica, espectroscopia UV-vis, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (IR-FT), difracción de rayos X (DRX) y dispersión dinámica de la luz (DLS) entre otras (Titus et al. 2019).

Artículos

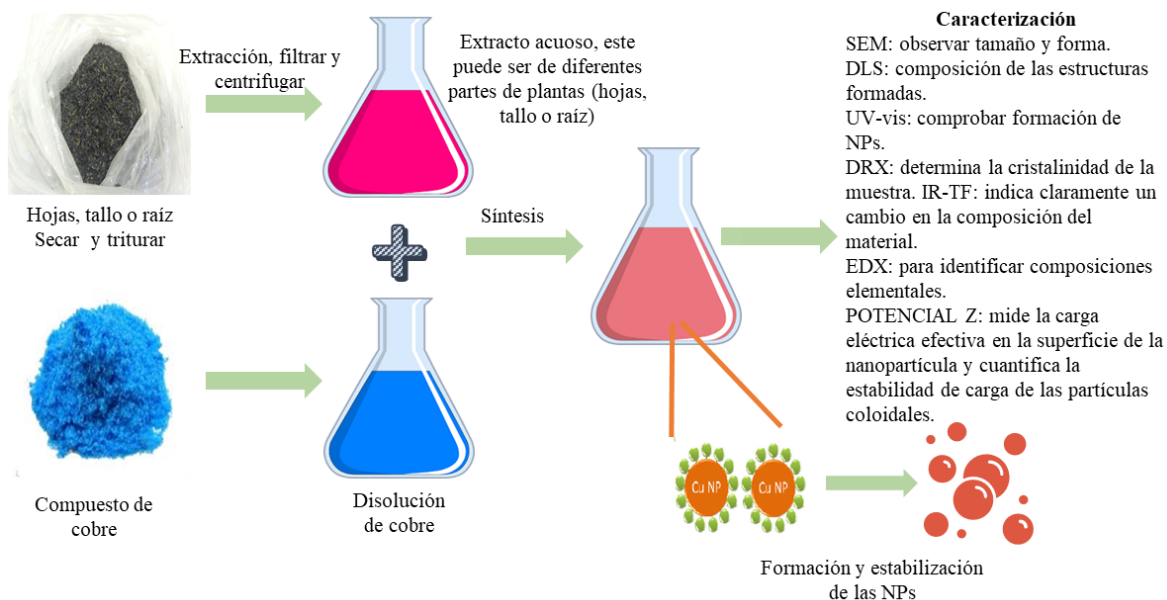


Figura 1. Esquema simplificado de la síntesis de fitonanopartículas de cobre y los principales métodos para caracterizarlas: microscopio electrónico de barrido (SEM), dispersión dinámica de la luz (DLS), difracción de rayos X (DRX), espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (IR-FT), rayos X dispersivos de energía (EDX) y potencial Z.

Conclusiones

Independientemente del origen del concepto, las nanopartículas llegaron para quedarse en el ámbito tecnológico y posteriormente en diversas áreas de aplicación. Este hecho ha provocado que se generen diversos protocolos destacando los de síntesis verde. Los protocolos de síntesis verde se presentan como una propuesta para la generación de NPs con un aspecto más amigable con el medioambiente por utilizar y generar una menor cantidad de compuestos tóxicos. Además, estas NPs poseen propiedades antimicrobianas que pueden ser útiles en el sector de la medicina o agronomía. La diferencia de los resultados reportados sobre el tamaño, actividad antimicrobiana

entre otras propiedades y características de las NPs es consecuencia del uso de diferentes plantas y parte de ellas que se utilizan para la generación del extracto aunado a las condiciones de trabajo como la temperatura, pH, presión o tiempo.

Referencias

- Ali A, Hira Zafar MZ, ul Haq I, Phull AR, Ali JS. and Hussain A. (2016). Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl.* 9-49.
- Asghar, M. A., Zahir, E., Shahid, S. M., Khan, M. N., Asghar, M. A., Iqbal, J. and Walker, G. (2018). Iron, copper and

- silver nanoparticles: Green synthesis using green and black tea leaves extracts and evaluation of antibacterial, antifungal and aflatoxin B 1 adsorption activity. *LWT*, 90, 98–107. doi:10.1016/j.lwt.2017.12.009.
- Chand Mali, S., Raj, S. and Trivedi, R. (2019). Biosynthesis of copper oxide nanoparticles using *Enicostemma axillare* (Lam.) leaf extract. *Biochem Biophys Rep* 20, 100699. doi:10.1016/j.bbrep.2019.100699.
- Chaudhary, S., Rohilla, D., Umar, A., Kaur, N. and Shanavas, A. (2019). Synthesis and characterizations of luminescent copper oxide nanoparticles: Toxicological profiling and sensing applications. *Ceramics International*. doi:10.1016/j.ceramint.2019.04.239.
- Das, M. and Chatterjee, S. (2019). Green synthesis of metal/metal oxide nanoparticles toward biomedical applications: Boon or bane. *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, 265–301. doi:10.1016/b978-0-08-102579-6.00011-3.
- Devatha, C. P. and Thalla, A. K. (2018). Green Synthesis of Nanomaterials. *Synth Inorg Nanomat* 169–184. doi:10.1016/b978-0-08-101975-7.00007-5.
- Ghidan, A. Y., Al-Antary, T. M. and Awwad, A. M. (2016). Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Punica granatum* peels extract: Effect on green peach Aphid. *Environ Nanotech Monitor Manag* 6, 95–98. doi:10.1016/j.enmm.2016.08.002.
- Gonzalez-Mendoza, D., Valdez-Salas, B., Bernardo-Mazariegos, E., Tzintzun-Camacho, O., Gutiérrez-Miceli, F., Ruíz-Valdiviezo, V. and Sanchez-Viveros, G. (2019). Influence of monometallic and bimetallic phytonanoparticles on physiological status of mezquite. *Open Life Scien* 14(1), 62–68.
- Gunalan, S., Sivaraj, R. and Venckatesh, R. (2012). *Aloe barbadensis* Miller mediated green synthesis of mono-disperse copper oxide nanoparticles: Optical properties. *Spectrochimica Acta Part A: Mol Biomol Spectros* 97: 1140-1144. doi:10.1016/j.saa.2012.07.096.
- Harne, S., Sharma, A., Dhaygude, M., Joglekar, S., Kodam, K. and Hudlikar, M. (2012). Novel route for rapid biosynthesis of copper nanoparticles using aqueous extract of *Calotropis procera* L. latex and their cytotoxicity on tumor cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 284–288. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.03.005.
- Horikoshi, S. and Serpone, N. (2013). Introduction to Nanoparticles. *Microwaves in Nanoparticle*

- Synthesis, 1–24. doi: 10.1002/9783527648122.ch1.
- Husen, A. and Siddiqi, K.S. (2014) Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application. *Nanoscale Res Lett* 9, 229 doi:10.1186/1556-276X-9-229.
- Ismail, M. I. M. (2020). Green Synthesis and Characterizations of Copper Nanoparticles. *Mat Chem Phys*, 122283. doi:10.1016/j.matchemphys.2019.122283.
- Khani, R., Roostaei, B., Bagherzade, G. and Moudi, M. (2018). Green synthesis of copper nanoparticles by fruit extract of *Ziziphus spina-christi* (L.) Willd.: Application for adsorption of triphenylmethane dye and antibacterial assay. *J Mol Liq*, 255: 541–549. doi:10.1016/j.molliq.2018.02.010.
- Jayarambabu, N., Akshaykranth, A., Venkatappa Rao, T., Rao, K. V. and Rakesh Kumar, R. (2020). Green synthesis of Cu nanoparticles using *Curcuma longa* extract and their application in antimicrobial activity. *Mat Lett* 126813. doi:10.1016/j.matlet.2019.126813.
- Kumar, I., Mondal, M. and Sakthivel, N. (2019). Green synthesis of phytogetic nanoparticles. *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, 37–73.
- Maham M, Nasrollahzadeh M, Sajadi SM. and Nekoei M. (2017). Biosynthesis of Ag/reduced Graphene oxide/Fe₃O₄ using Lotus garcinii leaf extract and its application as a recyclable nanocatalyst for the reduction of 4-nitrophenol and organic dyes. *J Colloid Interface Sci.* (497) , 33–42.
- Mohan, S., Singh, Y., Verma, D. K. and Hasan, S. H. (2015). Synthesis of CuO nanoparticles through green route using *Citrus limon* juice and its application as nanosorbent for Cr(VI) remediation: Process optimization with RSM and ANN-GA based model. *Process Saf Environ Protect* 96:156–166. doi:10.1016/j.psep.2015.05.005.
- Manjari, G., Saran, S., Arun, T., Vijaya Bhaskara Rao, A. and Devipriya, S. P. (2017). Catalytic and recyclability properties of phytogetic copper oxide nanoparticles derived from *Aglaia elaeagnoidea* flower extract. *J Saudi Chem Soc* 21(5):610–618. doi:10.1016/j.jscs.2017.02.004.
- Mary, A. P. A., Ansari, A. T. and Subramanian, R. (2019). Sugarcane juice mediated synthesis of copper oxide nanoparticles, characterization and their antibacterial activity. *J King Saud Univ-Science*. doi:10.1016/j.jksus.2019.03.003
- Nagar, N. and Devra, V. (2018). Green synthesis and characterization of copper nanoparticles using

- Azadirachta indica* leaves. Mat Chem Phys 213:44–51. doi:10.1016/j.matchemphys.2018.04.007.
- Naika, H. R., Lingaraju, K., Manjunath, K., Kumar, D., Nagaraju, G., Suresh, D. and Nagabhushana, H. (2015). Green synthesis of CuO nanoparticles using *Gloriosa superba* L. extract and their antibacterial activity. J Taibah Univ Scien, 9(1):7–12. doi:10.1016/j.jtusci.2014.04.006.
- Nasrollahzadeh, M. and Mohammad Sajadi, S. (2015). Green synthesis of copper nanoparticles using *Ginkgo biloba* L. leaf extract and their catalytic activity for the Huisgen [3+2] cycloaddition of azides and alkynes at room temperature. J Colloid Interf Scien 457:141–147. doi:10.1016/j.jcis.2015.07.004.
- Nasrollahzadeh, M., Sajadi, S. M., Rostami-Vartooni, A. and Hussin, S. M. (2016). Green synthesis of CuO nanoparticles using aqueous extract of *Thymus vulgaris* L. leaves and their catalytic performance for N-arylation of indoles and amines. J Colloid and Interf Scien 466:113–119. doi:10.1016/j.jcis.2015.12.018.
- Nasrollahzadeh, M., Momeni, S. S. and Sajadi, S. M. (2017). Green synthesis of copper nanoparticles using *Plantago asiatica* leaf extract and their application for the cyanation of aldehydes using K₄Fe(CN)₆. Journal of Colloid and Interface Science, 506, 471–477. doi:10.1016/j.jcis.2017.07.072.
- Nazar, N., Bibi, I., Kamal, S., Iqbal, M., Nouren, S., Jilani, K. and Ata, S. (2018). Cu nanoparticles synthesis using biological molecule of *P. granatum* seeds extract as reducing and capping agent: Growth mechanism and photo-catalytic activity. Int J Biol Macromol 106: 1203–1210. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.126.
- Pakzad, K., Alinezhad, H. and Nasrollahzadeh, M. (2019). Green synthesis of NiFe₃O₄ and CuO nanoparticles using *Euphorbia maculata* extract as photocatalysts for the degradation of organic pollutants under UV-irradiation. Ceramics Int doi:10.1016/j.ceramint.2019.05.272.
- Rajesh, K. M., Ajitha, B., Reddy, Y. A. K., Suneetha, Y. and Reddy, P. S. (2018). Assisted green synthesis of copper nanoparticles using *Syzygium aromaticum* bud extract: Physical, optical and antimicrobial properties. Optik, 154, 593–600. doi:10.1016/j.ijleo.2017.10.074.
- Ramesh, C., HariPrasad, M. and Ragunathan, V. (2011). Effect of *Arachis hypogaea* L. Leaf Extract on Barfoeds Solution; Green Synthesis of Cu₂O Nanoparticles and its Antibacterial

- Effect. *Curr Nanosci* 7(6):995–999. doi:10.2174/157341311798220781.
- Sathiyavimal, S., Vasantharaj, S., Bharathi, D., Mythili, S., Manikandan, E., Kumar, S. S. and Pugazhendhi, A. (2018). Biogenesis of copper oxide nanoparticles (CuONPs) using *Sida acuta* and their incorporation over cotton fabrics to prevent the pathogenicity of Gram negative and Gram positive bacteria. *Journal of Photochem Photobiol B: Biol* doi:10.1016/j.jphotobiol.2018.09.014
- Sharma, J. K., Akhtar, M. S., Ameen, S., Srivastava, P. and Singh, G. (2015). Green synthesis of CuO nanoparticles with leaf extract of *Calotropis gigantea* and its dye-sensitized solar cells applications. *Journal of Alloys and Compounds*, 632, 321–325. doi:10.1016/j.jallcom.2015.01.172.
- Sharma, P., Pant, S., Dave, V., Tak, K., Sadhu, V. and Reddy, K. R. (2019). Green synthesis and characterization of copper nanoparticles by *Tinospora cardifolia* to produce nature-friendly copper nano-coated fabric and their antimicrobial evaluation. *J Microbiol Meth* doi:10.1016/j.mimet.2019.03.007.
- Singh, J., Kumar, V., Kim, K.-H. and Rawat, M. (2019). Biogenic synthesis of copper oxide nanoparticles using plant extract and its prodigious potential for photocatalytic degradation of dyes. *Environ Res* 108569. doi:10.1016/j.envres.2019.108569.
- Sivaraj, R., Rahman, P. K. S. M., Rajiv, P., Narendhran, S. and Venckatesh, R. (2014). Biosynthesis and characterization of *Acalypha indica* mediated copper oxide nanoparticles and evaluation of its antimicrobial and anticancer activity. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectros* 129, 255–258. doi:10.1016/j.saa.2014.03.027.
- Sivaraj, R., Rahman, P. K. S. M., Rajiv, P., Salam, H. A. and Venckatesh, R. (2014). Biogenic copper oxide nanoparticles synthesis using *Tabernaemontana divaricate* leaf extract and its antibacterial activity against urinary tract pathogen. *Spectrochim Acta Part A: Mol Biomol Spectros* 133:178–181. doi:10.1016/j.saa.2014.05.048.
- Taniguchi N. (1974). On the basic concept of nano-technology. *Proc Intl Conf Prod London*; British Society of Precision Engineering.
- Titus, D., James Jebaseelan Samuel, E. and Roopan, S. M. (2019). Nanoparticle characterization techniques. *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, 303–319. doi:10.1016/b978-0-08-102579-6.00012-5.

Artículos

Vidovix, T. B., Quesada, H. B., Januário, E. F. D., Bergamasco, R. and Vieira, A. M. S. (2019). Green synthesis of copper oxide nanoparticles using *Punica granatum* leaf extract applied to the removal of methylene blue. *Mat Lett* 126685.

doi:10.1016/j.matlet.2019.126685.

Zamorano Farías, R. (2016). La relación entre el sistema de la política y el sistema del derecho en México. *Boletín Mexicano de Derecho Comparado*, 1(147), 303.



www.smbb.com.mx