

Biosíntesis de nanopartículas de ZnS utilizando cepas de hongos

Leslie Aideé Botello Salinas*, María Teresa Garza González*,
Idalia Gómez de la Fuente**, Moisés Hinojosa Rivera***

* Laboratorio de Biotecnología, CELAES, FCQ-UANL

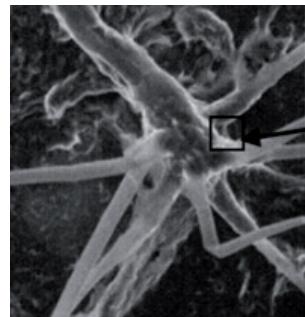
** Laboratorio de Vía Húmeda y Sol-Gel, CELAES, FCQ-UANL

*** Doctorado en Ingeniería de Materiales, FIME-UANL

mteresa@fcq.uanl.mx , idaliagomezmx@yahoo.com.mx

RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados de la síntesis de nanopartículas de sulfuro de zinc (ZnS) por medio de una ruta biotecnológica. Se utilizaron dos cepas identificadas y clasificadas como *B-1* y *Fusarium sp.*, colocándolas en contacto con disoluciones de $ZnSO_4$ a una concentración $10^{-3}M$, el estudio se siguió hasta un valor de pH de 5. Los nanocompuestos se caracterizaron mediante espectroscopía UV-Vis, Espectroscopía de Fluorescencia y Microscopía de Fuerza Atómica. Los resultados del análisis espectrofotométrico demuestran efectos de confinamiento cuántico característicos de semiconductores, con una distribución de tamaños de partícula en escala nanométrica. Las curvas de absorbancia de UV-Vis indicaron valores de energía de banda prohibida de 3.3 y 3.5 eV para *B-1* y *Fusarium sp.*, respectivamente. El análisis por fuerza atómica mostró un rango de nanopartículas obtenidas de 50 hasta 100 nm.



PALABRAS CLAVE

Biosíntesis, semiconductor, ZnS , nanopartículas.

ABSTRACT

This paper presents the results of the synthesis of zinc sulphide (ZnS) nanoparticles obtained through biotechnology. Two fungi identified and classified as *B-1* and *Fusarium sp.* were put into contact with dissolutions of $ZnSO_4$ at $10^{-3}M$, the study was conducted up to a pH level of 5. The nanocompounds were analyzed by UV-Vis spectroscopy, Fluorescence Spectroscopy and Atomic Force Microscopy. The results of the spectrophotometric analysis show the characteristic effects of quantum confinement of semiconductor materials with distribution of particle size in nanometric scale. The analysis by UV-Vis shows band gap energies values of 3.3 and 3.5 eV for *B-1* and *Fusarium sp.* respectively. The analysis by Atomic Force Microscopy showed the nanoparticles obtained, which range from 50 to 100 nm.

KEYWORDS

Biosynthesis, semiconductor, ZnS , nanoparticles.

INTRODUCCIÓN

Durante la última década se ha desarrollado un gran interés por los nanomateriales, esto debido a su gran variedad de aplicaciones en áreas como:

catálisis, semiconductores, transistores de electrones simples (SETs) y emisores de luz, dispositivos ópticos no lineales y aplicaciones fotoelectroquímicas.¹

La producción de tales materiales ha permitido el desarrollo de diferentes métodos de síntesis con el fin de controlar características esenciales como composición química, tamaño y monodispersidad.²

La búsqueda de tecnologías amigables con el medio ambiente ha llevado a los investigadores a aprovechar la biotecnología como una opción viable para la síntesis de estos compuestos.³

Por lo tanto, la nanobioteecnología proveerá de medios para la construcción de estructuras moleculares nuevas de manera precisa y flexible, a un costo menor que los procedimientos tradicionales de producción.

Se ha descubierto que los microorganismos tales como bacterias, levaduras y hongos, juegan un papel importante en la remediación de metales tóxicos a través de la reducción de iones metálicos, por lo tanto recientemente se han considerado como nanofábricas de gran interés.⁴

Una gran variedad de nanomateriales se sintetizan por procesos biológicos desde hace muchos años. Algunos materiales que se han llegado a obtener recientemente son: nanocristales de minerales como magnetita y greigita; nanopartículas de oro y plata, así como otros compuestos de metales tóxicos como el sulfuro de cadmio (CdS). Este tipo de reacción se da como un mecanismo de desintoxicación en el ambiente contaminado.⁵

Así pues en 2002, Kowshik *et al.* sintetizaron nanopartículas de Ag° utilizando la levadura MKY3, caracterizando su producto por microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de rayos-X (XRD), dispersión de rayos X de ángulo amplio (WAXS), espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS) y espectroscopía Ultravioleta-visible (UV-vis).⁴

Otras dos investigaciones, se enfocaron a la producción de compuestos semiconductores en las dimensiones de nanopartículas por la ruta bioquímica. La investigación realizada por Moskivna *et al.* mostró que bacterias asociadas a *Nostoc muscorum* presentan resistencia a la presencia de iones Cd²⁺ en solución, y posteriormente la formación de películas

de CdS aprovechando la habilidad de producción de H₂S por estos microorganismos.⁵ De manera similar, Ahmad *et al.* demostraron que la síntesis de nanopartículas en el rango de 5 a 20 nanómetros (nm) de este compuesto se podía llevar a cabo extracelularmente vía enzimática utilizando cepas de *Fusarium oxysporum*, aplicando TEM, UV-Vis y XRD para su caracterización.⁶

Posteriormente en 2005, Durán *et al.* utilizaron esta misma cepa para obtener un hidrosol de Ag° con un tamaño de partícula entre 20 y 50 nm.⁷

Tras estos antecedentes se muestra que el uso de microorganismos permite la obtención de materiales de dimensiones nanométricas con aplicación industrial, es por esto que surge el interés por la obtención de compuestos que sean aprovechables por la nanotecnología como semiconductores o agentes dopantes.

En el área de la nanotecnología, se tiene especial interés sobre el sulfuro de zinc (ZnS), ya que sus propiedades cambian e inclusive mejoran considerablemente, debido a efectos de confinamiento cuántico, a comparación con sus contrapartes en escala regular.⁸ Este compuesto a escala nanométrica ha emergido como un nuevo tipo de material para la detección biológica y conversor de imágenes celulares basado en la conjugación de puntos cuánticos semiconductores y moléculas de bioreconocimiento.⁹

Con el fin de investigar la biosíntesis de este compuesto, y tomando en cuenta que las cepas B-1 y *Fusarium sp.* han presentado la capacidad de producir nanopartículas de CdS a partir de la reducción del sulfato de cadmio (CdSO₄),¹⁰ en este trabajo se presentan los resultados del estudio de la producción microbiana extracelular de nanopartículas de sulfuro de zinc (ZnS) mediante la reducción enzimática del sulfato de zinc (ZnSO₄), las cuales se caracterizaron mediante las técnicas de Espectroscopía UV-vis, Espectroscopía de Fluorescencia y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de microorganismos

A partir de cultivos puros de los hongos *Fusarium sp.* y la cepa B-1 (resistentes a cadmio y zinc) se obtuvieron suspensiones de esporas las cuales se

inocularon en el medio YMG modificado. Los cultivos fueron incubados a 28°C por 72 horas en un sistema agitado a 120 rpm.

Separación de la biomasa

El micelio obtenido se separó por filtración a vacío. Posteriormente se lavó con agua bidestilada y se guardó en recipientes estériles para su uso posterior.

Producción de nanopartículas de ZnS

Un gramo de micelio húmedo fue puesto en contacto con disoluciones $ZnSO_4 \cdot 10^{-3} M$ en agitación a 120 rpm y 28°C durante cinco días. Se tomaron muestras cada 12 horas. Posteriormente la suspensión fue filtrada. El micelio resultante se esterilizó y el filtrado fue analizado para la caracterización de las nanopartículas de ZnS. La biotransformación se monitoreó por observación visual y midiendo su espectro UV-Vis.

Caracterización de muestras

Las muestras se analizaron por las técnicas Espectroscopía UV-vis, Espectroscopía de Fluorescencia, Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) para confirmar la producción de ZnS y obtener características morfológicas de las nanopartículas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Espectroscopía UV-vis

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos en los análisis por Espectroscopía UV-vis para las muestras de *Fusarium sp.* y la cepa B-1 respectivamente, en contacto con $ZnSO_4 \cdot 10^{-3} M$ durante cuatro días.

También se muestra la intersección con el eje que indica la longitud de onda (λ) para el cálculo de E_g en cada caso.

En general, los espectros de ambos casos presentan dos señales importantes, una alrededor de los 260 nm y otra a una longitud de onda menor, para el de *Fusarium sp.* a una longitud de onda alrededor de 220 nm y para el de la cepa B-1 a 208 nm.

La presencia de dos señales en ambos gráficos se atribuye a tres posibles factores que influyen de

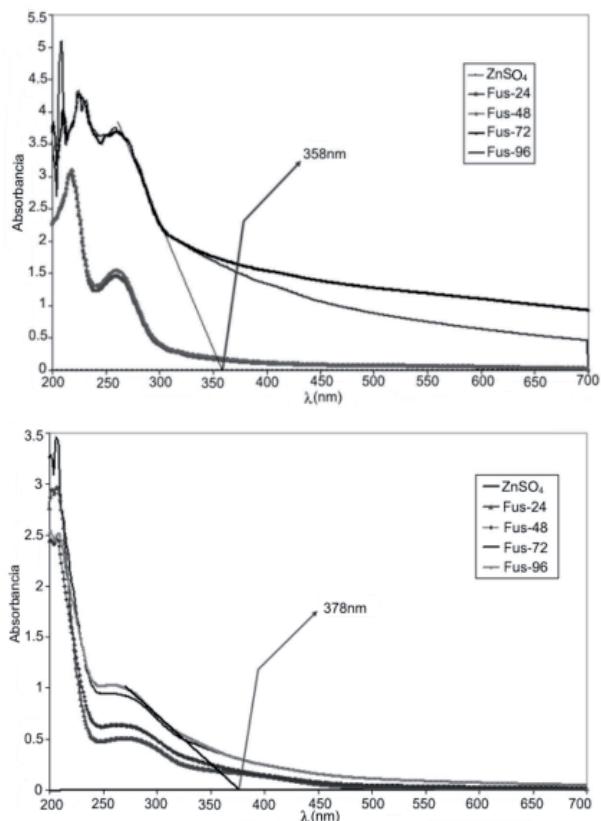


Fig. 1. Gráfica de Absorbancia vs Longitud de onda de las muestras de (a) *Fusarium sp.* y (b) la cepa B-1 en contacto con $ZnSO_4 \cdot 10^{-3} M$ (muestreo diario por cuatro días).

manera importante en este tipo de análisis. Estos son: la presencia de un tamaño de partícula menor, que ocasiona un desplazamiento hipsocrómico de la señal conforme el tamaño de partícula disminuye; un posible cambio estructural en el tipo de celda unitaria, ya que el ZnS puede poseer la estructura tipo esfalerita o wurtzita; y finalmente, la presencia de otras sustancias, como metabolitos, que presenten absorbancia en la región UV.

Es importante destacar el aumento de absorbancia en las señales conforme pasa el tiempo, el cual corresponde con un aumento esperado en la concentración de ZnS. Sin embargo, a las 72 h de reacción se presenta una mayor absorbancia, la cual es similar a las 96 h, esto indica haber llegado a un límite en la producción de ZnS.

Cálculo de la energía de banda prohibida (E_g)

El cálculo de la energía de banda prohibida se realizó tomando en cuenta el valor de la

intersección de la recta tangente a la curva (señalada en la figura 1) con el eje de longitud de onda (λ). Este valor se utiliza en la ecuación de Planck que relaciona la energía de un fotón y la frecuencia de acuerdo a la ecuación 1.

$$E = hf \quad (1)$$

donde E : energía (J), h : Constante de Planck: 6.6261×10^{-34} (Js), f : Frecuencia (Hz).

Tomando en cuenta la relación entre frecuencia y velocidad de la luz se tiene entonces la ecuación 2.

$$\lambda = \frac{c}{f} \quad (2)$$

donde: λ : longitud de onda (m), c : velocidad de la luz en el vacío y f : frecuencia (Hz)

Entonces la longitud de onda radiada se puede expresar de acuerdo a la ecuación 3.

$$\lambda = \frac{hc}{E_g} \quad (3)$$

donde: E_g : energía de banda prohibida (J), λ : Longitud de onda (m).

Teniendo finalmente la ecuación 4, la cual expresa la energía de separación en electrón volts (eV) y la longitud de onda en nm.

$$E_g = \frac{1.24 \times 10^3}{\lambda} \quad (4)$$

Con la ecuación 4 y los datos obtenidos a partir de la figura 1, se determinaron los valores de energía de banda prohibida para los experimentos realizados (tabla I), los que indican la presencia de un compuesto con comportamiento de semiconductor. Estos valores se asemejan al valor de E_g reportado para el ZnS,¹⁰ el cual pudo obtenerse por la reducción de sulfatos presentes en el medio.

Tabla I. Valores de E_g para cepas de hongos y ZnS.

	Cepa		ZnS ⁽¹⁰⁾
	Fusarium sp.	B-1	
E_g (eV)	3.5	3.3	3.7
λ (nm)	358	378	335

Espectroscopía de Fluorescencia

En este análisis se determinó que las muestras contenían compuestos que presentaban características de fluorescencia bajo radiación UV, lo cual corresponde con los resultados obtenidos en espectroscopía UV-Vis.

En las tablas II y III se presentan los resultados de emisión y excitación encontradas para cada tipo de cepa utilizada.

En ambas tablas se destaca una señal presente únicamente en las muestras que estuvieron en contacto con la disolución de $ZnSO_4$ 10^{-3} M. El compuesto ZnS es fluorescente bajo luz UV y éste puede ser obtenido por la actividad reductora enzimática, entonces estas señales sugieren la presencia del compuesto.

Las diferentes regiones en la escala de longitud de onda donde se encuentra la señal en las muestras de cada cepa se deben a los diferentes tipos de enzimas secretadas por los distintos microorganismos.

Los espectros de emisión y excitación de las señales destacadas para las muestras y el blanco se presentan en la figura 2.

Tabla II. Resultados de Espectroscopía de fluorescencia para los experimentos con *Fusarium sp.*

λ (nm) Em/Ex	<i>Fusarium sp.</i>	
	Blanco	Muestras
364 / 293	✓	✓
405 / 325	✓	✓
523 / 447	✗	✓
575 / 347	✓	✓
688 / 290	✓	✓

Tabla III. Resultados de Espectroscopía de fluorescencia para los experimentos con la cepa B-1.

λ (nm) Em/Ex	Cepa B-1	
	Blanco	Muestras
438 / 349	✓	✓
476 / 393	✗	✓
673 / 290	✓	✗
741 / 373	✓	✓

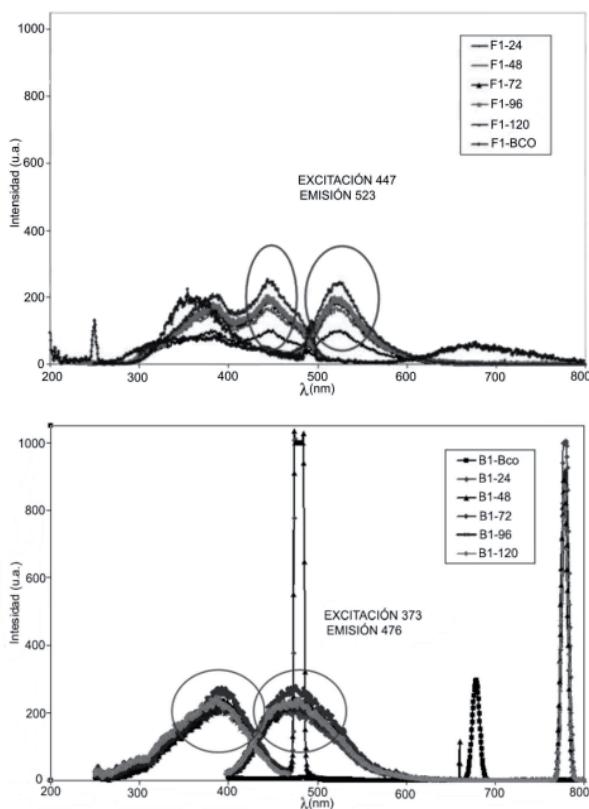


Fig. 2. Gráficas de Intensidad (u.a.) vs Longitud de onda (nm) de las muestras obtenidas con (a) *Fusarium sp.* y (b) la cepa B-1.

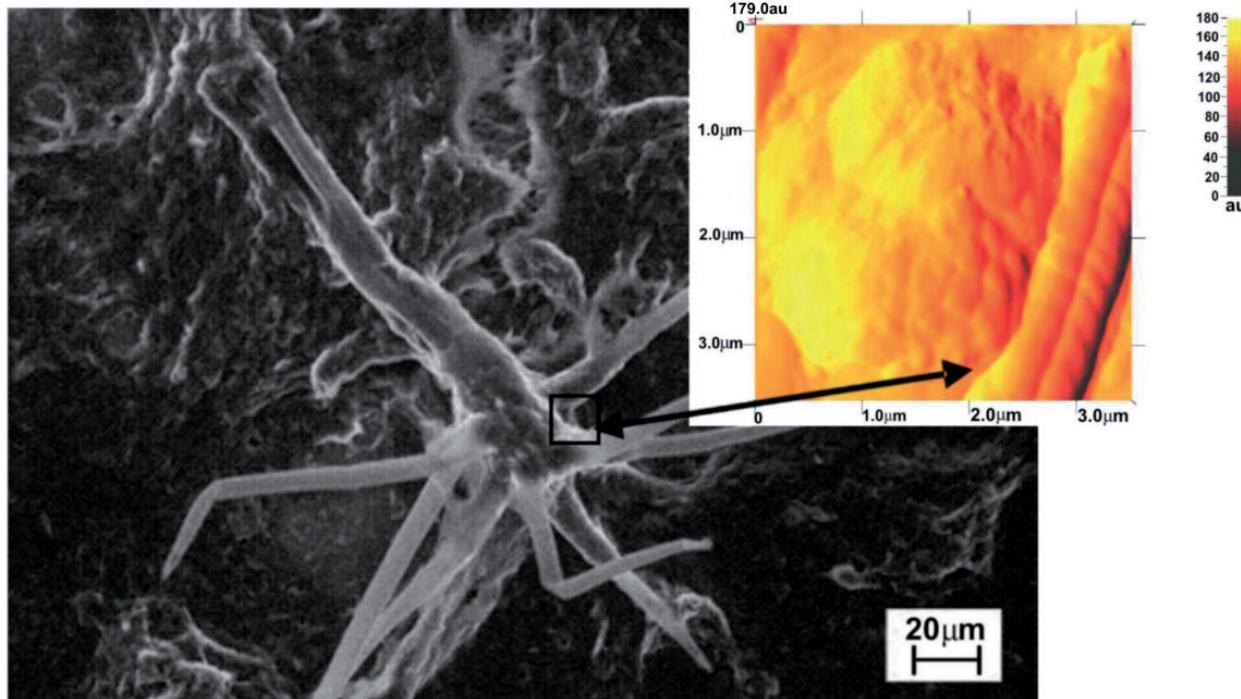


Fig. 3. Imagen de SEM de una muestra de *Fusarium sp.* Señalando la zona de la hifa analizada por AFM en donde se denotan abultamientos (imagen superior).

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

En la figura 3 se muestra una micrografía de una muestra de *Fusarium sp.* Obtenida por la técnica de microscopía electrónico de barrido en el modo de electrones secundarios. En ésta se observa el conjunto de hifas las cuales fueron posteriormente analizadas por AFM (inserto en figura 3) en donde se denotaba la presencia de abultamientos.

Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)

En la figura 4 se muestran imágenes de las muestras de *Fusarium sp.* obtenidas por la técnica de AFM. Se observa la presencia de partículas de escala nanométrica (≈ 100 nm) en muestras del sobrenadante de la mezcla de reacción de cada cepa.

Las nanopartículas encontradas presentan un amplio rango de tamaño en esta escala (50-100 nm), y su morfología es predominantemente esférica.

En la figura 5 se presentan imágenes obtenidas por AFM de las muestras obtenidas de la cepa B-1 en las cuales se distinguen también partículas de tamaño variable dentro de la escala nanométrica (≈ 70 nm).

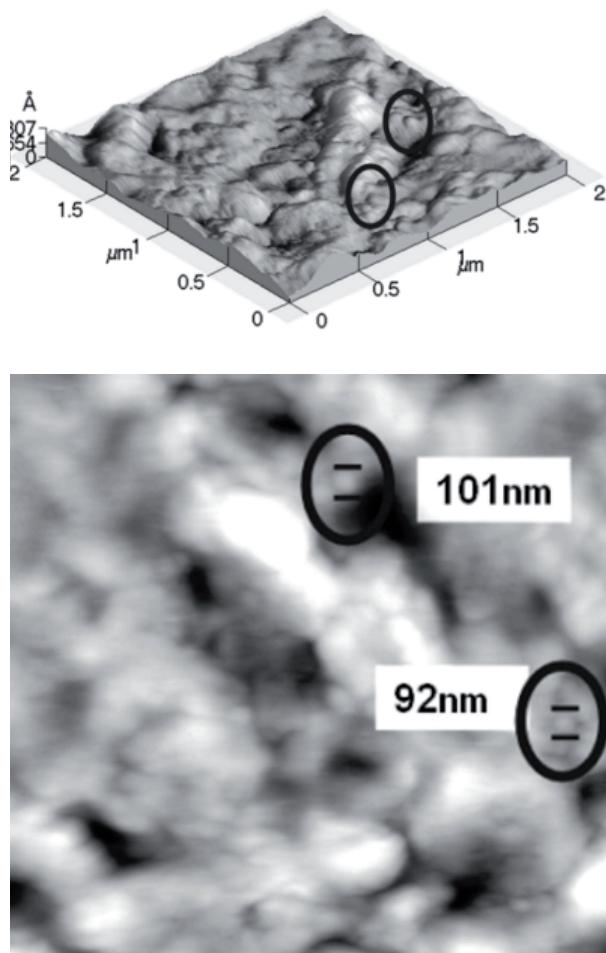


Fig. 4. Resultados de MFA para muestras de *Fusarium sp.* imagen 1(a) Topografía (b) vista superior.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados y su comparación con los datos reportados en la literatura, se comprueba la obtención de partículas en escala nanométrica de ZnS utilizando tanto la Cepa B-1 como *Fusarium sp.* en contacto con $ZnSO_4$ en disolución.

El análisis por UV-Vis presentó efectos de confinamiento cuántico característico de semiconductores en escala nanométrica, determinándose valores de energía de banda prohibida para ambos tipos de hongos, cuyos valores fueron de 3.3 y 3.5 eV, para B-1 y *Fusarium sp.* respectivamente.

Las nanopartículas obtenidas por esta vía presentan una morfología predominantemente esférica y tamaño variable de 50 a 100 nm.

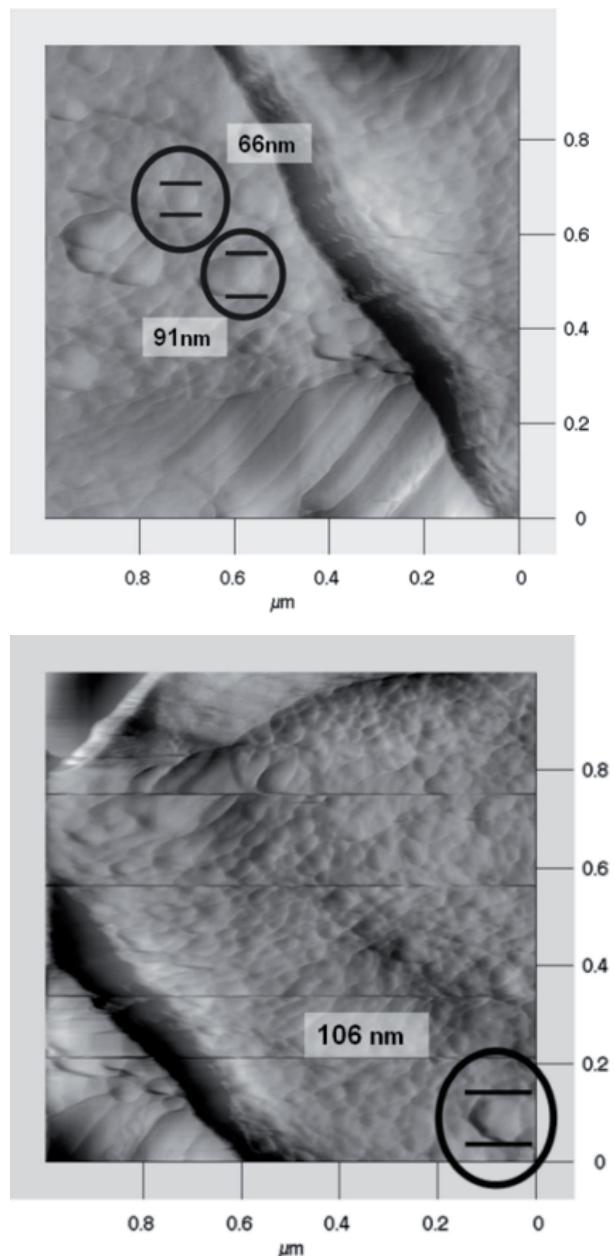


Fig. 5. Resultados de MFA de las muestras de la cepa B-1. (a) Lado izquierdo de la hifa y (b) sobre la hifa.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al apoyo obtenido a través del proyecto CA 1301-06 dentro del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica 2006 (PAICYT 2006) de la UANL. Así como al Dr. Virgilio Ángel González González y colaboradores, en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico (CIDET, FIME, UANL) por su apoyo en las observaciones de Espectroscopía de Fluorescencia y Microscopía de Fuerza Atómica.

REFERENCIAS

1. Sastry, M., Ahmad, A., Khan, I. M., Kumar R., "Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete", Current Science, (85) 162-170 (2003).
2. Bhattacharya, D., Gupta, R. K., "Nanotechnology and Potential of Microorganisms", Critical Reviews in Biotechnology, (25): 199-204 (2005).
3. Gilbert, B., Zhang, H., Huang, F., Finnegan, M.P., Waychunas, G.A., Banfield, J.F., "Special phase transformationand crystal growth pathways observed in nanoparticles", Geochemical Transactions, The Royal Society of Chemistry and the Division of Geochemistry of the American Chemical Society, 4, 20-27 (2003).
4. Kowshik, M., Ashtaputre, S., Kharrazi, S., W Vogel, J Urnam, SKKulkarni, K M Paknikar, "Extracellular synthesis of silver nanoparticles by a silver-tolerant yeast strain MKY3", Nanotechnology, (14): 95-100. (2003).
5. Moskvina, M.I. , Brekhovskikh, A.A., Nikandrov, V.V., "The Role of the Heterotrophic Bacteria Associated with the Cyanobacterium Nostoc muscorum in the Formation of Cadmium Sulfide", Microbiology, 72 (2): 246-247 (2003).
6. Ahmad, A., Mukherjee, P., Mandal, D., Senapati, S., Khan, M.I., Kumar, R., Sastry, M., "Enzyme Mediated Extracellular Synthesis of CdS Nanoparticles by the Fungus, Fusarium oxysporum", Journal of the American. Chemical Society, 124, 12108-12109, (2002).
7. Durán, N., Marcato, P. D., Alves, O. L., Souza, G. I., Esposito, E., "Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several Fusarium oxysporum strains", Journal of Nanobiotechnology, 3:8 (2005).
8. Zhao, Y., Zhang, Y., Zhu, H. Hadjipanayis, H., "Low-Temperature Synthesis of Hexagonal (Wurtzite) ZnS Nanocrystals", Journal of the American. Chemical Society, 126, 6874-6875, (2004).
9. Mandal, D., Bolander, M.E., Mukhopadhyay, D., Sarkar, G., Mukherjee. P., "The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application" Applied Microbiology Biotechnology, 69: 485-492 (2005).
10. Luis Reyes, "Biosíntesis de CdS a partir de Fusarium sp.", Tesis de Maestría, F.C.Q. (2007).
11. Henglein, A., "Catalysis Of Photochemical Reactions By Colloidal Semiconductors", Pure and Applied Chemistry, 56(9), 1215-1224, (1984).

Anúnciese en:

Ingenierías

INFORMES:
Tel: (52) (81) 83294020 Ext. 5854
Fax: (52) (81) 83320904
E-mail: revistaingenierias@gmail.mx
Internet: http://ingenierias.uanl.mx