

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**BIOSINTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA POR HONGO DE
PUDRICION BLANCA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

MARCELA MARTA DIAZ SALAZAR

TEMUCO – CHILE
2013

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**BIOSINTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA POR HONGOS DE
PUDRICION BLANCA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

MARCELA MARTA DIAZ SALAZAR

PROFESOR GUIA: OLGA MARGARITA RUBILAR ARANEDA

TEMUCO – CHILE
2013

**“BIOSINTESIS DE NANOPARTICULAS DE PLATA POR HONGOS DE
PUDRICION BLANCA”**

PROFESOR GUIA

: _____
OLGA MARGARITA RUBILAR ARANEDA
INGENIERO AMBIENTAL
DR EN CIENCIAS DE RECURSOS
NATURALES
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

PROFESORES CONSEJEROS

: _____
GONZALO TORTELLA FUENTES
INGENIERO FORESTAL
DR CIENCIAS DE RECURSOS NATURALES
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

CALIFICACION PROMEDIO TESIS : _____

*Dedico esta tesis a mi pequeño hijo
Bastian Benjamín Leal Díaz
Fortaleza de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Antes que todo, quiero manifestar mis agradecimientos a Dios y todas las personas quienes contribuyeron en esta etapa de mi vida, por su constante apoyo, afecto y compañía.

Agradezco el apoyo de mi tutor, Dr. Olga Rubilar y co-tutor Dr. Gonzalo Tortella por entregarme la orientación y confianza desde el inicio hasta el término de mi trabajo de título, en particular a mi tutor por brindarme la oportunidad de permanencia para mi desarrollo como profesional. Mis sinceros agradecimientos a Raphael Cuevas por su paciencia en la entrega de conocimientos prácticos y teóricos, sin duda sus consejos y cooperación fueron un gran aporte para mi formación académica y profesional.

Agradezco también al proyecto Fondecyt 1130854 por el financiamiento y recursos entregados para el desarrollo de esta tesis.

Quiero agradecer de manera particular a mis amigas Claudia Beltrán, Daniella Campos y Karina Romero, grandes personas que conocí y con las cuales viví día a día mi periodo universitario, compartir su manera tan peculiar de ver la vida y transmitir sus emociones fue una de las mejores y más gratas experiencias que pude adquirir durante mi proceso como estudiante.

En especial quiero agradecer a mi familia, que me ha apoyado incondicionalmente no solo en este periodo sino en cada etapa de mi vida. Agradezco a mis padres que siempre se han sacrificado por entregarme lo mejor, por su dedicación, cariño y valores que me han permitido llegar hasta esta instancia. A mis hermanos que me conocen mejor que nadie y con los cuales he compartido cada momento de tristeza y felicidad. A mi amado hijo, el regalo más grande que me dio la vida, por enseñarme lo simple que es alcanzar la felicidad. A mi abuelita por su confianza, preocupación y solidaridad infinita.

A Jonnathan Leal por cada palabra y sonrisa que me regalo en los momentos más críticos de este proceso, por su comprensión, paciencia, respeto y cariño sin límite. Por enseñarme a ser tolerante y una mejor persona. Gracias por compartir mi vida.

INDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	2
2	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	5
2.1	Biosíntesis de nanopartículas metálicas por hongos	5
2.1.1	Biosíntesis intracelular de nanopartículas	6
2.1.2	Biosíntesis extracelular de nanopartículas	7
2.2	Mecanismos de formación de nanopartículas metálicas por hongos	9
2.3	Biosíntesis de nanopartículas metálicas y producción enzimática por hongos de pudrición blanca	12
2.4	Caracterización de nanopartículas metálicas sintetizadas por cepas de hongos	14
2.4.1	Espectroscopia UV-Vis	15
2.4.2	Técnicas de microscopía	15
2.4.3	Espectroscopía FTIR	16
2.4.4	Potencial zeta	16
2.5	Efectos de los parámetros de reacción en la biosíntesis de nanopartículas metálicas	17
2.5.1	Efectos del pH	18
2.5.2	Efectos de la concentración de iones en el metal	18
2.6	Aplicación de las nanopartículas	19
3	HIPOTESIS	21
4	OBJETIVOS	22
4.1	Objetivo general	22
4.2	Objetivos específicos	22
5	MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1	Compuestos químicos	23
5.2	Microorganismos utilizados	23
5.3	Medio de cultivo	23

5.3.1	Cultivo de conservación de la cepa	23
5.3.2	Cultivo de mantenimiento	24
5.3.3	Cultivo de crecimiento	24
5.4	Ensayos	25
5.4.1	Caracterización del medio de cultivo y extracto libre de micelio	25
5.4.1.1	Actividad enzimática Lacasa (Lac), Manganese peroxidasa (MnP) y Manganese independiente peroxidasa (MiP)	25
5.4.1.2	Determinación de proteínas	26
5.4.1.3	Determinación de la biomasa, peso fresco y peso seco	27
5.4.2	Selección de cepa hongo de pudrición blanca para la biosíntesis de nanopartículas de plata	27
5.4.3	Efectos del pH y concentración de AgNO_3 sobre la biosíntesis de nanopartículas de plata por hongos de pudrición blanca	28
5.4.4	Caracterización de las nanopartículas de plata	28
5.4.4.1	Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)	28
5.4.4.2	Espectroscopía Infrarroja transformada de Fourier (FTIR)	29
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1	Crecimiento de los hongos y caracterización del extracto libre de micelio	30
6.2	Selección de cepa hongo de pudrición blanca para la biosíntesis de nanopartículas de plata	32
6.3	Efectos del pH y concentración de AgNO_3 sobre la biosíntesis de nanopartículas de plata por hongo de pudrición blanca	35
6.4	Caracterización de las nanopartículas de plata	42
7	CONCLUSION	46
8	LITERATURA CITADA	47
9	ANEXOS	54

RESUMEN

La nanotecnología ha sido un campo de investigación de gran interés debido a las propiedades físicas, químicas y biológicas que presentan los nanomateriales, siendo uno de los desafíos más importantes producir nanomateriales mediante métodos biológicos que reduzcan el uso de solventes tóxicos y a la vez sean de bajo costo. En este contexto, diversas investigaciones han estado orientadas a la biosíntesis de nanopartículas de plata con actividad antimicrobiana mediadas por proteínas producidas por hongos y bacterias. Sin embargo, una cantidad limitada de estudios han evaluado la biosíntesis de nanopartículas de plata por hongos de pudrición blanca, los cuales, presentan un alto potencial para la biosíntesis de nanopartículas metálicas debido su elevada producción de proteínas. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la biosíntesis extracelular de nanopartículas de plata mediada por hongos de pudrición blanca aislados de bosques del sur de Chile. Se realizó un estudio preliminar con extractos libres de micelio de las cepas *Anthracoephyllum discolor* y *Stereum hirsutum* donde se seleccionó la cepa que mostró una mayor biosíntesis de nanopartículas de plata con AgNO_3 como sustrato evaluado por espectroscopía UV-Vis. Posteriormente, con la cepa seleccionada se evaluó el efecto de la concentración de AgNO_3 (1 mM, 3 mM y 5 mM) y el pH inicial del medio (pH 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0 y 10,0) en la formación de las nanopartículas de plata. Finalmente, en las condiciones de reacción con mayor formación de nanopartículas se determinaron las características morfológicas y la identificación de grupos funcionales en la superficie de las nanopartículas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), respectivamente. Los resultados demostraron que el uso de extracto libre de micelio de *A. discolor* y *S. hirsutum* biosintetizaron nanopartículas de plata, mostrando una banda de absorbancia entre 400-420 nm, siendo el extracto libre de micelio de *A. discolor* el que presentó un mayor espectro de absorbancia. En cuanto al efecto del pH y la concentración de AgNO_3 , se demostró que la biosíntesis de nanopartículas de plata fue mayor a pH 9,0 y 5 mM de AgNO_3 , de lo cual se observó mediante FTIR la presencia de grupos aminos unidos a las nanopartículas de plata, lo que sugiere la liberación intracelular and/or extracelular de proteínas por hongos de pudrición blanca que cumplen la función de formación y estabilización de las nanopartículas.

SUMMARY

The nanotechnology has been a research field of great interesting due to physical, chemistry and biology properties that have the nanomaterials. However, an important challenger of the nanotechnology is the nanomaterials production by biological methods that reduce the use of toxic solvent and the same time inexpensive. In this context, several studies have been oriented to the biosynthesis of silver nanoparticles with antimicrobial activity mediated by fungi and bacteria proteins. However, a limited amount of studies has evaluated the biosynthesis of silver nanoparticles by white-rot fungi, which have a potential for biosynthesis of metallic nanoparticles due to its high protein production. Therefore, the main of this study was to evaluate the extracellular biosynthesis of silver nanoparticle mediated by white-rot fungi isolated of forest from Southern Chile. A preliminary study with mycelium free extract of *A. discolor* and *S. hirsutum* where the strain with higher biosynthesis of silver nanoparticle evaluated by spectroscopy UV-Vis was developed. Then, the effect of AgNO_3 concentration (1 mM, 3 mM and 5 mM) and initial pH in the culture (pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 and 10.0) were evaluated in the formation of silver nanoparticles with the strains previously selected. Finally, in the reaction conditions with higher nanoparticles formation the morphological characteristics and identification of organic functional group in the nanoparticle surface was determined by transmission electron microscope (TEM) and Fourier transformed infrared (FTIR), respectively. Results demonstrated that the use of mycelium free extract of *A. discolor* and *S. hirsutum* biosynthesized silver nanoparticles, showing a absorbance peak between 400 and 420 nm, being the mycelium free extract of *A. discolor* with higher absorbance spectra. In relation to the effect of pH and AgNO_3 concentration was demonstrated that the biosynthesis of silver nanoparticle was higher to pH 9.0 and AgNO_3 5 mM. In the same way, the presence of amine group binding to the silver nanoparticles was determined by FTIR, which suggest the intracellular and/or extracellular proteins release by the whire-rot fungi that have as function the formation and stabilization of the nanoparticles.

1. INTRODUCCION

Actualmente existe una necesidad por el desarrollo de tecnologías confiables y eco-amigables con el medio ambiente. Así es como la nanotecnología, es considerada como uno de los campos con mayor potencial de investigación y aplicación tecnológica, siendo el desarrollo de tecnologías a escala nanométrica, en un rango de tamaño de 1 a 100 nanómetros, una de sus mayores proyecciones. Los objetos en esta escala, como las nanopartículas, presentan propiedades y funciones que han despertado gran interés en diferentes área de la investigación puesto que podrían ser aplicables en farmacología, medicina, ciencias ambientales, agricultura, industria textil, entre otros (Durán *et al.*, 2007; Ingle *et al.*, 2008; Saravanan y Nanda, 2010).

En los últimos años se han orientado los estudios a la producción de nanopartículas metálicas, con el fin de controlar el resultado de la síntesis y minimizar las variaciones en su distribución, tamaño y estructura, características que constituyen uno de los principales desafíos para su implementación en futuras aplicaciones. Otra área de gran interés es el estudio de su potencial como bactericida y fungicida contra diversos patógenos de plantas y humanos, muchos de ellos resistentes a los tratamientos actuales (Sondi y Salopek-Sondi, 2004; Morones *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2008; Jaidev *et al.*, 2010). Si bien, las nanopartículas metálicas han sido sintetizadas mediante procesos físicos y químicos; estos métodos en general son costosos, ineficientes y generan desechos peligrosos que son un riesgos para el medio ambiente y la salud humana (Azim *et al.*, 2009). Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar procesos para la síntesis de nanopartículas que no generen impactos en el medio ambiente, siendo los procesos biológicos una alternativa que ha demostrado una eficiente formación de nanopartículas (Durán *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). En este contexto, se ha demostrado que microorganismos tales como bacterias, hongos y levaduras, juegan un papel importante en la reducción de iones metálicos para la producción de las nanopartículas, siendo considerados o denominados como nanofábricas (Durán *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Si bien, los métodos biológicos para la síntesis de nanopartículas están aun en desarrollo se han descrito muchos microorganismos capaces de producir nanopartículas, dentro de los cuales se ha destacado la biosíntesis por hongos, principalmente por las ventajas que presenta en cuanto a un fácil manejo durante su cultivo, su

alta tolerancia a los metales y además secretan un gran número de proteínas que permiten la producción de nanopartículas (Mohanpuria *et al.*, 2008).

La biosíntesis de nanopartículas por hongos se desarrolla mediante un mecanismo de oxido/reducción, donde participan las enzimas como agente reductor del metal, llevando a compuestos que forman las nanopartículas (Durán *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2008). Este mecanismo puede ser desarrollado intracelular o extracelularmente. Ambos mecanismos de cultivo han sido estudiados (Durán *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2008), no obstante, la síntesis extracelular es la técnica más utilizada ya que produce un gran número de nanopartículas libres de las células, permitiendo un proceso relativamente sencillo (Mukherjee *et al.*, 2002; Shaligram *et al.*, 2009).

En el proceso de biosíntesis de nanopartículas las características deseadas en la producción son tamaño y forma homogénea, que definen la dispersidad de las partículas, además de presentar una alta área de superficie específica dado por su menor tamaño; estas características (forma y tamaño) son fundamentales para aumentar su capacidad antimicrobiana al interactuar directamente con las membranas microbianas, generando la muerte celular (Durán *et al.*, 2010). Por lo tanto, el control directo de varios parámetros de reacción como pH, concentración de sustrato, temperatura y tiempo de reacción, se han estudiado para optimizar el proceso de biosíntesis de nanopartículas (Gericke *et al.*, 2006; Nayak *et al.*, 2011).

En este contexto, se han reportado diversos estudios para la biosíntesis de nanopartículas metálicas, tales como nanopartículas de plata (Durán *et al.*, 2005; Fayaz *et al.*, 2010, Castro-Longoria *et al.*, 2011; Dar *et al.*, 2012); nanopartículas de cobre por *Fusarium oxysporum* (Hosseini *et al.*, 2012); también han sido biosintetizadas nanopartículas de CdS y Si por *Fusarium oxysporum* (Ahmad *et al.*, 2002; Bansal *et al.*, 2005); entre otras. Estos antecedentes demuestran que el uso de diferentes cepas fúngicas permite la obtención de materiales de dimensiones nanométricas cuya aplicabilidad es aun indefinida.

Muchos hongos han sido probados en la biosíntesis de nanopartículas metálicas, una de las reacciones más estudiadas corresponde a la biosíntesis utilizando por *F. oxysporum* utilizando como sustrato AgNO₃ (Durán *et al.*, 2005; Fayaz *et al.*, 2009; Sanghi *et al.*, 2011). Sin embargo, son pocas las investigaciones que han evaluado nuevas cepas fúngicas, tales como hongos de

podrición blanca que sean capaces de biosintetizar nanopartículas y que además se considere el uso de estas, como potenciales agentes antimicrobianos. En este contexto, los hongos de pudrición blanca aislados de los bosques de Chile podrían tener un alto potencial para la biosíntesis de nanopartículas metálicas debido a su alta producción de enzimas extracelulares oxidativas como Lacasa y diferentes peroxidasas, las cuales tienen la capacidad para transformar o mineralizar compuestos peligrosos para el ambiente a través de diversos mecanismos (Rubilar *et al.*, 2007; Tortella *et al.*, 2008).

Debido a lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la biosíntesis de nanopartículas de plata mediada por proteínas extracelulares de cepas nativas, aisladas de los boques del sur de Chile, correspondiente a los hongos pudrición blanca *Anthracophyllum discolor* y *Stereum hirsutum*. Además, se evaluó el efecto de reacción de los parámetros pH y concentración sustrato sobre la biosíntesis de las nanopartículas de plata.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biosíntesis de nanopartículas metálicas por hongos

Recientemente en los diccionarios, han aparecido palabras como: nanométrica, nanoescala, nanociencia, nanotecnología, nanoestructuras, nanotubos, nanopartículas, nanocables y nanorobot, entre otras (Buzea *et al.*, 2007). Investigaciones en el campo de la nanotecnología se han enfocado en el estudio de la síntesis de nanopartículas metálicas, debido a las propiedades inusuales que estas exhiben, presentando materiales con dimensiones entre 1 y 100 nm. Las nanopartículas son partículas potencialmente comparable con las escalas de longitud atómica y molecular (~ 0.2 nm), de tal manera que comprender la diversidad de procesos biológicos a nivel de nano-escala constituye la base para el desarrollo de la nanobiotecnología (Kristiansen *et al.*, 1986).

Existen diversas nanopartículas metálicas dentro de las que encontramos; Au, Ag, Pt, Pd, entre otras. Las nanopartículas de plata han recibido considerable atención debido a las propiedades físico-químicas atractivas que presenta, como actividad catalítica, conductividad térmica y fotoemisión (Liu, 2006). Además, la plata, ha sido ampliamente utilizada por sus propiedades antimicrobianas por cientos de años, siendo demostrada su eficiencia contra quemaduras, osteomielitis crónica severa, infecciones del tracto urinario e infecciones por catéteres venoso centrales (Feng *et al.*, 2000).

Aunque las nanopartículas metálicas han sido sintetizadas por varios procesos físicos y químicos; estos métodos involucran grandes costos, pueden ser ineficientes y además generan desechos peligrosos que son tóxicos para el medio ambiente (Azim *et al.*, 2009). Así es, como investigaciones orientadas a la producción de nanopartículas han recurrido a sistemas biológicos como una opción amigable y poco invasiva para el ambiente (Ahmad *et al.*, 2003, Durán *et al.*, 2005). Numerosos microorganismos como bacterias, hongos, actinomicetos y levaduras han demostrado ser capaz de sintetizar nanopartículas de metálicas+

(Durán *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). No obstante, la biosíntesis por hongos presenta mayores ventajas en comparación con otros microorganismos. Los hongos permiten un fácil manejo durante su cultivo; además, la mayoría de los hongos poseen una alta tolerancia a metales y también secretan una gran cantidad de proteínas que permiten una mayor producción de nanopartículas (Mohanpuria *et al.*, 2008).

La biosíntesis de nanopartículas se produce comúnmente por un mecanismo de oxido-reducción de los iones metálicos, siendo las enzimas responsables de la reducción de los compuestos de metal que forman las nanopartículas. La biosíntesis de nanopartículas mediada por hongos puede ser desarrollada mediante dos métodos; de manera intracelular (Mukherjee *et al.*, 2001; Gericke y Pinches 2006) o extracelular (Bansal *et al.*, 2004; Bajali *et al.*, 2009).

2.1.1 Biosíntesis intracelular de nanopartículas

Cuando el proceso de biosíntesis de nanopartículas es intracelular, éstas se producen en la superficie de membrana y el citoplasma de micelio fúngico. (Senapati *et al.*, 2005).

Se postula que la fase inicial en la formación de nanopartículas comienza por interacciones electrostáticas entre los iones y los grupos carboxilo cargados de enzimas presentes en la pared celular. En la fase siguiente los iones se reducen por enzimas que conducen a la formación del núcleo de las nanopartículas (Mandal *et al.*, 2006). A su vez, el núcleo está estabilizado por proteínas en la pared celular o en el citoplasma formando completamente la nanopartícula.

La biosíntesis intracelular de nanopartículas tiene una limitación de tamaño, lo cual podría estar relacionado con la nucleación de partículas dentro de los organismos (Narayanan *et al.*, 2010). Para la recuperación de nanopartículas intracelulares, es necesario llevar a cabo procesos físicos o químicos (Navazi *et al.*, 2010), lo cual presenta una desventaja para la producción a mayor escala. Las nanopartículas formadas dentro de la biomasa requiere la aplicación de una etapa adicional en el procesamiento para la liberación de las nanopartículas, dentro de las cuales se

podrían mencionar el uso de ultrasonidos o la aplicación de detergentes u otro proceso mecánico para la lisis celular. (Mandal *et al.*, 2006; Bhainsa *et al.*, 2006).

2.1.2 Biosíntesis extracelular de nanopartículas

Los hongos secretan gran cantidad de compuestos orgánicos, principalmente proteínas, polisacáridos y ácidos orgánicos (Balaji *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2011) los cuales son los principales responsables de la biosíntesis extracelular, esto se debe a que están involucrados en la reducción de los iones metálicos presentes en la solución (Narayanan *et al.*, 2010).

La biosíntesis de nanopartículas mediada por hongos consiste en la separación de la biomasa del medio de cultivo, con el fin de eliminar componentes de medios de crecimiento que podrían interferir en la reacción con los iones metálicos presentes. La biomasa se incuba en agua desionizada o destilada, donde los hongos liberan por lisis celular sus componentes orgánicos de interés, proteínas, polisacáridos y ácidos orgánicos, que intervienen en la reducción, formación y estabilización de las nanopartículas. Posterior a ello, se filtra la biomasa y la solución resultante es utilizada para la biosíntesis de nanopartículas, donde metales como el Cu, Ag o Au, entre otros, se agregan en forma de sales para la formación de la nanopartículas metálicas de síntesis biológica (Durán *et al.*, 2005; Bhainsa *et al.*, 2006; Balaji *et al.*, 2009).

La metodología planteada para la biosíntesis extracelular sugiere ciertas ventajas respecto a la intracelular, tales como el fácil procesamiento del hongo y además la obtención de un gran número de nanopartículas libres de las células, permitiendo un procesamiento relativamente sencillo; además la biosíntesis involucra una catálisis homogénea para la formación de nanopartículas (Mukherjee *et al.*, 2002; Shaligram *et al.*, 2009). Se ha informado que el sobrenadante producido en cultivos de hongos contiene diversas proteínas que son capaces de estabilizar los iones metálicos a través de procesos de reducción enzimáticas y unirse a ellos en los residuos de aminoácidos (Mukherjee *et al.*, 2008; Saravanan y Nanda, 2010), logrando de esta forma la estabilización de las nanopartículas. Estas nanopartículas sintetizadas extracelularmente están presentes como una solución coloidal, que muestra un cambio de la coloración producido por los iones de metal reducidos en la solución, como ocurren en la biosíntesis de nanopartículas

de plata (Ahmad *et al.*, 2003; Durán *et al.*, 2005). La formación y estabilización de las nanopartículas puede ser monitoreado por espectroscopia UV-visible a intervalos de tiempo diferentes para determinar el cambio en el perfil de absorción de la luz de la solución y aumentar su intensidad, de esta manera se puede verificar de forma preliminar la reacción de la biosíntesis de diversas nanopartículas metálicas.

Se ha reportado la biosíntesis extracelular por hongos utilizando metales como oro, cobre, plata, zirconia, titanio como se puede observar en la Tabla 1. A partir de una solución de nitrato de plata se reporta la biosíntesis de nanopartículas de plata utilizando el hongo *Aspergillus fumigatus* (Bhainsa *et al.*, 2006); *F. oxysporum* fue capaz de producir nanopartículas de sulfato de cobre de forma extracelular (Hosseini *et al.*, 2012); mediante *Neurospora crassa* se sintetizaron nanopartículas de oro (Castro-Longoria *et al.*, 2011). Utilizando el hongo *Cryphonectria* sp. se reportó la biosíntesis de nanopartículas de plata (Dar *et al.*, 2012).

Tabla 1. Biosíntesis de nanopartículas metálicas por diversas cepas de hongos

Cepa de Hongo	Metal	Referencia
<i>Neurospora crassa</i>	Ag	Castro-Longoria et al., (2011)
<i>Cryphonectria</i> sp.	Ag	Dar et al., (2012)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ag	Ghaseminezhad et al., (2012)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Ag	Nayak et al., (2011)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ag	Navazi et al., (2010)
<i>Fusarium semitectum</i>	Au	Sawle et al., (2008)
<i>Verticillium luteoalbum</i> DSM	Au	Gericke and Pinches, (2006)
<i>Trichoderma asperellum</i>	Au	Mukherjee et al., (2012)
<i>Rhizopus</i>	Au	Das et al., (2009)
<i>Penicillium rugulosum</i>	Au	Mishra et al., (2012)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Ba-Ti	Bansal et al., (2006)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Cu	Hosseini et al, (2012)
<i>Aspergillus aeneus</i> NJP12	ZnO	Jain et al., (2012)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Pt	Govender et al., (2009)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Zirconia	Bansal et al., (2004)
<i>Fusarium oxysporum</i>	CdS	Ahmad et al., (2002)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Si	Bansal et al., (2005)

2.2 Mecanismos de formación de nanopartículas metálicas por hongos

Diversos autores han intentado describir el mecanismo involucrado en la biosíntesis de nanopartículas (Sanghi y Verma, 2009; Gericke y Pinches, 2006; Durán *et al.*, 2005). Sin embargo, este aún no se ha logrado descifrar por completo.

Uno de los mecanismos sugeridos por Mukherjee *et al.*, (2008) plantea que el mecanismo de formación de las nanopartículas plata se inicia con la biorreducción de AgNO_3 y continúa con la estabilización o encapsulación de la nanopartícula por un agente de protección adecuado.

Durán *et al.*, (2005) sugiere un posible mecanismo para la biosíntesis de nanopartículas de plata por *F. oxysporum*, donde actúa la enzima nitrato reductasa y posterior a ello mediante un proceso extracelular de transporte participa una quinona. Resultados similares avalan el mecanismo propuesto, siendo utilizados los hongos *F. oxysporum* (Ahmad *et al.*, 2003); *F. acuminado* (Ingle *et al.*, 2008); *Aspergillus niger* (Jaidev *et al.*, 2010) y *Amylomyces rouxii* (Musarrat *et al.*, 2010) para la biosíntesis de nanopartículas de plata y atribuyéndose a la acción de la enzima nitrato reductasa.

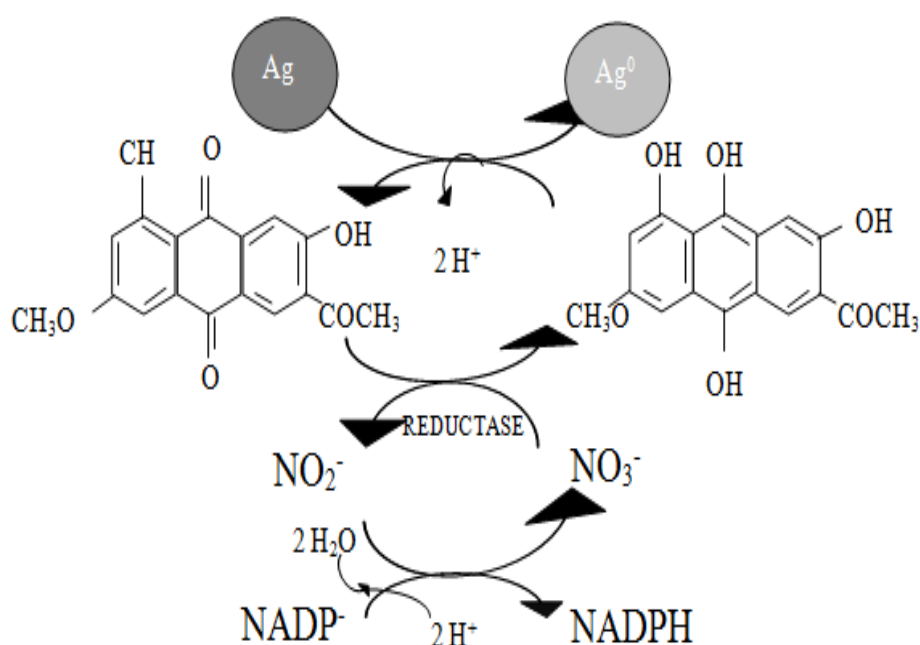


Figura 1. Esquema del mecanismo propuesto para la biosíntesis de nanopartículas de plata propuesto por Duran *et al.*, (2005)

Otro mecanismo propuesto por Jain *et al.*, (2011) propone la participación de dos grupos proteicos en la biosíntesis de nanopartículas de plata por *Aspergillus flavus*. La biosíntesis

podría ocurrir mediante una proteína de 32 kDa, posiblemente la enzima reductasa secretada por el hongo y además en una segunda etapa una proteína de 35 kDa se uniría a las nanopartículas participando en formación y estabilidad. Resultados similares han sido reportados por Bansal *et al.* (2004) donde la biosíntesis de nanopartículas de óxido de circonio por *Fusarium oxysporium* mostró dos proteínas extracelulares con peso molecular de 24 y 28 kDa. A su vez, Balaji *et al.* (2009) postulan que proteínas, polisacáridos y exudados de ácidos orgánicos son capaces de producir cristales de diferentes formas, pero con un crecimiento dirigidos a la producción de nanopartículas esféricas.

Aunque los hongos de pudrición blanca se utilizan comúnmente en biorremediación, ha sido reportado que estos hongos también pueden ser utilizados como una plataforma para la producción de nanopartículas de plata. Estudios desarrollados por Sanghi y Verma (2009) demostraron que el hongo de pudrición blanca *C. versicolor* produjo nanopartículas de sulfuro de cadmio (CdS), demostrando que el grupo tiol de la proteína fúngica fue un principal responsable de la síntesis de nanopartículas de CdS. Estudios realizados por Sanghi *et al.*, (2011) reportaron que en la biosíntesis de nanopartículas de oro por *P. chrysosporium* la enzima Lacasa fue dominante, atribuyendo esto a la formación de las nanopartículas.

2.3 Biosíntesis de nanopartículas metálicas y producción enzimática por hongos de pudrición blanca

Los hongos de pudrición blanca son del tipo *basidiomicetos*, tales como *Anthracoxyllum discolor* y *Stereum hirsutum* (Figura 2) (Eaton y Hale, 1993). Su nombre se deriva a partir de la apariencia que deja en la madera en la que se encuentra, proceso en el cual la degradación de la lignina da un aspecto blanquecino a la madera (Pointing, 2001). Estos hongos han sido utilizados con eficiencia en la degradación de variados compuestos orgánicos contaminantes de diferente naturaleza química y varios grupos de plaguicidas (Tortella *et al.*, 2005, Tortella *et al.*, 2008; Rubilar *et al.*, 2008., Tortella *et al.*, 2013). Por ello es que desde la última década, los hongos de pudrición blanca se han utilizado de forma intensiva para procesos de biorremediación, ya que tienen la capacidad para transformar o mineralizar compuestos peligrosos para el ambiente a través de mecanismos enzimáticos oxidativos (Rubilar *et al.*, 2008).



Figura 2. Hongos de pudrición blanca. a) *Anthracoxyllum discolor*, b) *Stereum hirsutum*

El sistema enzimático que tiene una acción activa en la degradación de compuestos contaminantes está constituido principalmente por enzimas ligninolíticas extracelulares no específicas en relación al sustrato, entre las cuales se destaca la enzima lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP), manganeso independiente de peroxidasa (MiP) y la enzima lacasa

(Kertsen *et al.*, 1990). Estas enzimas rara vez se encuentran todas en un mismo microorganismo. Sin embargo, se ha demostrado que con diversas combinaciones se produce el mismo efecto, con respecto a la degradación de la madera (Poiting, 2001).

El principal efecto que provocan las enzimas lignolíticas durante la degradación de la lignina, es la formación de radicales libres intermedios que se forman cuando un electrón es removido o agregado de una estructura química en su estado más estable (Reddy y Mathew, 2001).

La LiP es un fuerte oxidante y no solamente oxida los usuales sustratos de las peroxidasas tales como, fenoles y anilinas, sino que también una variedad de estructuras no-fenólicas y éteres aromáticos que se asemeja a las unidades estructurales básicas de la lignina (Tien y Kirk, 1998). La principal función de la enzima MnP es la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} usando H_2O como oxidante (Paszczyński *et al.*, 1992). La MiP difiere de la MnP y LiP porque es capaz de oxidar de Mn^{2+} a Mn^{3+} y catalizar reacciones sobre sustratos aromáticos en ausencia de Mn^{2+} (Martínez *et al.*, 1996). La lacasa es una fenol oxidasa que cataliza la oxidación de un amplio espectro de compuestos fenólicos y aminas aromáticas utilizando oxígeno molecular como aceptor de electrones, reducción a agua (Rodakiewicz-Nowak, 2000).

Según lo reportado por algunos investigadores, los hongos de pudrición blanca más común utilizados en la biorremediación son *Phanerochaete chrysosporium* (Wang *et al.*, 2008), *Schizophyllum commune* (El-Rahim *et al.*, 2009) y *Pycnoporus sp* (Esposito *et al.*, 1993). El estudio de los hongos mencionados y su elevada producción enzimática ha impulsado su investigación en el área de biorreducción de nanopartículas de plata (Vigneshwaran *et al.*, 2006).

Aunque el desarrollo de la tecnología en el uso de los hongos de pudrición blanca para la biosíntesis de nanopartículas de metal es una rama reciente, se han reportado ya un número limitado de hongos tales como: *Phanerochaete chrysosporium* (Vigneshwaran *et al.*, 2006; Sanghi *et al.*, 2011), *Pleurotus sajor caju* (Nithya *et al.*, 2009), *Coriolus versicolor* (Sanghi y

Verma, 2009a; Sanghi y Verma, 2009b) y *Shizophyllum commune* (Mashitahet *et al.*, 2011); los cuales han sintetizado nanopartículas en base a los metales Au, Ag y Cd.

Uno de los trabajos realizados por Sanghi *et al.*, (2011) reporta al hongo *P.chrysosporiumun* para la biosíntesis de nanopartículas de oro, demostrando que éstas se encuentran en un rango de tamaño de 10 a 100 nm. El mismo estudio informa de biosíntesis intracelular y extracelular de nanopartículas de oro por *P. chrysosporiumun*, las cuales son mediadas por enzimas ligninolíticas.

La biosíntesis de nanopartículas de plata por el hongo de pudrición blanca *Pleurotus sajor caju* fue reportado por Nithya *et al.* (2009) informando como resultados un rango de tamaño de estas entre 5 a 50 nm. La formación de nanopartículas se analizó por espectroscopia UV-Vis y además se evaluó la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas contra las cepas bacterianas *Escherichia coli*; *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* informando como resultado que las nanopartículas de plata presentan mayor actividad antimicrobiana frente a bacterias gram-positivas.

Teniendo en cuenta la naturaleza no patógena de los hongos de pudrición blanca, que presentan una gran producción de biomasa y fácil manejo de ésta; es que son altamente considerados como candidatos para la producción de nanopartículas metálicas en escala mayor (Vigneshwaran *et al.*, 2006).

2.4 Caracterización de nanopartículas de plata biosintetizadas por hongos

Diversas técnicas son consideradas para la caracterización de nanopartículas metálicas siendo las más utilizadas: espectroscopía de ultravioleta-visible (Uv-Vis), técnicas de microscopía, análisis de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X, potencial zeta y distribución de tamaño de partícula transformada de Fourier.

2.4.1 Espectroscopia UV-Vis

El uso del método de espectroscopía Uv-Vis permite determinar la formación y estabilidad de nanopartículas de metal. La detección de nanopartículas de metal se evalúa mediante la detección de cambios de color de las soluciones de la reacción. Estos cambios se atribuyen a la excitación de la resonancia de plasmón en las nanopartículas metálicas (Durán *et al.*, 2010; Narayanan *et al.*, 2010)

Diferentes investigaciones han demostrado que máximo pico de absorción en la biosíntesis de nanopartículas Ag se produce entre 410 y 420 nm (Ahmad *et al.*, 2003; Basavaraja *et al.*, 2008; Nayak *et al.*, 2011), lo que indica que la Ag^+ se redujo a Ag^0 obteniendo como resultados un aumento gradual en la absorbancia con respecto al tiempo de reacción para la formación de nanopartículas. Resultados similares fueron reportados por Nayak *et al.*, (2011) donde se demostró que el máximo pico de absorción en la biosíntesis de nanopartículas de plata por *Penicillium purpurogenum* era 420 nm.

2.4.2 Técnicas de Microscopía

Dentro de las técnicas de microscopía más utilizadas se encuentran la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y la microscopia electrónica de barrido (SEM), las cuales permiten analizar la morfología de las nanopartículas metálicas.

La microscopía TEM permite visualizar el tamaño y la forma de nanopartículas. Ahmad *et al.*, (2003) señalan que a través del uso esta técnica se logró identificar partículas individuales de plata y agregados biosintetizadas por *F. oxysporium*. La morfología de las nanopartículas fue principalmente esférica pero también de tipo triangular las que varían en el rango de 5 a 50 nm. Asimismo, Sanghi y Verma (2009) demostró que micrografías TEM de nanopartículas de Ag sintetizadas por *P. chrysosporium* fueron simétricas y de forma esférica, con un tamaño de aproximadamente 10 nm.

Otra ventaja que otorga el uso de microscopia TEM es que permite caracterizar la estabilización de las nanopartículas mediante una nivelación alrededor de las partículas para probar si las

proteínas de los hongos son responsables de cubrir la partícula (Durán *et al.*, 2007; Sanghi y Verma, 2009).

El análisis de SEM permite la determinación de la monodispersidad de las nanopartículas y su caracterización elemental por SEM combinado con espectroscopía de energía dispersiva (EDS).

2.4.3 Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía FTIR permite caracterizar la unión a proteínas con nanopartículas de metal mediante la identificación de la estructura secundaria en la interacción de la proteína de nanopartículas metálicas (Durán *et al.*, 2010). Vigneshwaran *et al.*, (2007) demostraron que el espectro FTIR de la biosíntesis de nanopartículas de plata por *A. niger* reveló bandas 3280 cm^{-1} y 2924 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de estiramientos de aminas primarias y secundarias, respectivamente. Además, se observaron dos bandas en 1379 cm^{-1} y 1033 cm^{-1} correspondiente a las vibraciones de estiramientos de C N de aminas aromáticos y alifáticos, respectivamente. Similares resultados fueron obtenidos por Hosseini *et al.* (2012) en la biosíntesis de nanopartículas de cobre biosintetizada por *F. oxysporium*.

Por lo tanto, en base a los estudios que se han reportado es posible confirmar la presencia de proteína en la nanopartículas de metal biosintetizadas por hongos.

Estas evidencias sugieren que las moléculas biológicas, posiblemente, pueden desempeñar un papel en formación y estabilización de nanopartículas en la solución de reacción. (Ahmad *et al.*, 2003; Vigneshwaran *et al.*, 2007; Ingle *et al.*, 2009; Sanghi y Verma, 2009; Hosseini *et al.*, 2012).

2.4.4 Potencial zeta

El potencial zeta y la distribución de tamaño de partícula de nanopartículas de metal es posible determinarlos utilizando un equipo Nano Zetasizer. El potencial zeta es una técnica que determina la estabilidad de las nanopartículas debido a la repulsión electrostática. En la Tabla 2 se muestran valores referenciales de comportamiento de estabilidad de los coloides. Coloides con potencial zeta mayores a $\pm 30\text{ mV}$ indican estabilidad de las partículas. Estudios desarrollados

por Sadowski *et al.*, (2008) demuestran que las nanopartículas de plata biosintetizada con *Penicillium* evidenciaron un potencial zeta negativo de $-26,3 \pm 0,3$ demostrando que las nanopartículas son bastante estables debido a la repulsión electrostática que existe entre ellas.

Tabla 2. Potencial zeta referencial que indican el comportamiento de estabilidad de coloides

Potencial Zeta [mV]	Comportamiento de estabilidad del coloide
de 0 a ± 5	Coagulación o floculación rápida
de ± 10 a ± 30	inestabilidad incipiente
de ± 30 a ± 40	estabilidad moderada
de ± 40 a ± 60	Buena estabilidad
más de ± 61	Excelente estabilidad

2.5 Efectos de los parámetros de reacción en la biosíntesis de nanopartículas

Uno de los principales desafíos en la producción de nanopartículas consiste en una metodología que controle su formación, morfología y tamaño.

Estudios realizados por Morones *et al.*, (2005) informaron que el efecto antimicrobiano de nanopartículas de plata puede atribuirse principalmente a su concentración, pequeño tamaño, monodispersidad y superficies altamente específicos. En estas condiciones, las nanopartículas pueden interactuar directamente con las membranas microbianas de bacterias y hongos patógenos, generando la muerte celular (Duran *et al.*, 2010). Esto sugiere lo importante que es determinar el valor óptimo de los parámetros de la reacción en la biosíntesis de nanopartículas metálicas. Sin embargo, los estudios de parámetros que controlan la formación, tamaño y morfología de los proceso de biosíntesis se realizaron principalmente con nanopartículas de plata (Gericke y Pinches, 2006; Kathiresan *et al.*, 2009; Nayak *et al.*, 2011), siendo la biosíntesis de otros metales raramente reportados.

2.5.1 Efectos del pH

El pH es un parámetro fundamental durante la optimización de un proceso que controla la morfología de nanopartículas. Estudios desarrollados por Nayak *et al.* (2011) demostraron que la morfología de las nanopartículas de plata biosintetizadas por *P. purpurogenum* varían dependiendo del pH inicial de la reacción. A pH 4 y 5 las nanopartículas fueron polidispersa con un tamaño promedio de 40 y 55 nm, mientras que las partículas más pequeñas se formaron a pH 8 y 9 con un tamaño promedio entre 8 y 13 nm, presentando una forma uniforme entre ellas. Resultados similares fueron obtenidos por Kathiresan *et al.*, (2009) en la producción de nanopartículas de plata por *P. fellutanum*.

Asimismo, estudios desarrollados por Sanghi y Verma (2009) demostraron que la biosíntesis de las nanopartículas de plata por *C. versicolor* a pH 10 fue más rápida que a pH normal 5.6. Mishra *et al.*, (2010) reportó la formación de nanopartículas de plata en condiciones de pH alcalino utilizando *Penicillium rugulosum*.

Por otra parte, se ha demostrado que el efecto del pH en la biosíntesis depende del tipo de nanopartícula que se quiere biosintetizar. En este sentido la formación monodispersa de menor tamaño de nanopartículas es generada principalmente a pH alcalino, mientras que por ejemplo, la biosíntesis de nanopartículas de plata se realiza principalmente a pHs ácidos.

Gericke y Pinches (2006) demostró que el pH inicial es un parámetro importante en la biosíntesis de nanopartículas de oro por *Verticillium luteoalbum*. Los resultados mostraron que a pH 3 y 5, las nanopartículas de oro eran predominantemente esféricas y uniformes presentando un tamaño de 10 nm de diámetro, mientras que a pH 7 y 9, la partícula aumenta de tamaño a 30 nm presentando varias formas tales como triángulos, hexágonos, esferas y varillas.

2.5.2 Efectos de la concentración de iones en el metal

La concentración de iones metálicos ha sido estudiada con respecto al efecto que puede ocasionar sobre el tamaño y la monodispersidad de las nanopartículas. Estudios de Nayak *et al.*, (2011) demostraron que un aumento en la concentración de AgNO_3 aumenta la formación de

nanopartículas de plata en el filtrado fúngico de *P. purpurogenum*. Al utilizar una concentración de 5 mM de AgNO_3 se observó una alta polidispersidad de las nanopartículas.

Resultados reportados por Gericke y Pinches (2006b) informan de una alta monodispersidad observada en las nanopartículas esféricas que presentaban un tamaño entre 8-10 nm al utilizar una concentración de 1 mM de AgNO_3 .

2.6 Aplicaciones de las nanopartículas

En la actualidad las nanopartículas de diferente naturaleza son utilizadas en diversas disciplinas, como la medicina, agricultura y la industria debido a que sus propiedades permiten su uso tanto en la física, biología y química.

En el área de la biomedicina los nanomateriales poseen múltiples aplicaciones relacionadas tanto con el diagnóstico como con la terapia de enfermedades. Los avances logrados en la última década han abierto oportunidades para el diseño de nanopartículas multifuncionales para aplicaciones médicas y farmacéuticas (Simon de Dios y Díaz-García, 2010). En este contexto, la plata ha sido utilizada por sus propiedades antimicrobianas por cientos de años, los iones de plata han sido conocidos por tener efectos inhibitorios, bactericidas y propiedades antimicrobianas de amplio espectro. En diversos estudios se han observado las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata, tanto en virus como en bacterias. Saravanan y Nanda (2010) e Ingle *et al.*, (2008) probaron el efecto bactericida de nanopartículas de plata contra múltiples bacterias resistentes a los fármacos. Con el aumento de los microorganismos resistentes a múltiples antibióticos y antifúngicos, diversas investigaciones se han dirigido al desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos sin resistencia y bajo costo. En este contexto, las nanopartículas metálicas se han estudiado con resultados prometedores. Así es como diversas investigaciones demuestran la acción antimicrobiana de las nanopartículas metálicas como plata, contra microorganismos como bacterias *Staphylococcus sp* (Jaidev *et al.*, 2010; Fayaz *et al.*, 2010), *Salmonella typhi* (Fayaz *et al.*, 2010), *Bacillus sp.* (Jaidev *et al.*, 2010), *Escherichia coli* (Jaidev *et al.*, 2010; Fayaz *et al.*, 2010; Nithya y Ragunathan, 2009; Vigneshwaran *et al.*, 2007; Sondi *et al.*, 2004) y también contra hongos (AgNP) *Aspergillus niger* (Jaidev *et al.*, 2010), *Fusarium*

oxysporium (Musarat *et al.*, 2010), *Phoma glomerata* (Gajbhiye *et al.*, (2009) y *Candida albicans* (Musarat *et al.*, 201; Panacek *et al.*, 2009).

Otra aplicación de nanopartículas metálicas se basa en reducir el uso de fertilizantes y pesticidas, logrando de esta forma aumentar el rendimiento en los cultivos (Rickman *et al.*, 1999). Varios estudios han mostrado que las nanopartículas metálicas tienen actividad antifúngica contra patógenos de plantas, como *B. cinerea* (Oh *et al.*, 2006; He *et al.*, 2011), *P. expansum* (Oh *et al.*, 2006) y *Raffaelea SP* (Kim *et al.*, 2009), demostrando su gran potencial como fungicida. Hongos como *B. cinerea* y *F. oxysporum* causan daños importantes en cultivos, principalmente en el de arándanos siendo controlados mediante la aplicación de de oxiclورو de cobre, óxido de cobre y sulfato de cobre, sin embargo, la concentración de estos puede matar a todo el tejido de la planta. Por lo tanto, el uso de nanopartículas de metálicas podría reducir este riesgo, básicamente por las concentraciones nanomolar que se utilizan.

En cuanto al área de la industria la aplicación de las nanopartículas abarca una amplia gama de procesos de producción, tales como cosméticos, productos farmacéuticos, pinturas y electrónica, entre otros. La nanotecnología también promete revolucionar la industria en la producción de alimentos, elaboración, envasado, transporte, almacenamiento, nuevos sabores, texturas de alimentos (Chaudhry *et al.*, 2010). Otra aplicación relacionada a esta área propone el uso de las nanopartículas como compuestos bioactivos en alimentos funcionales (Chau *et al.*, 2007), estos tienen beneficios fisiológicos y pueden ayudar a reducir el riesgo de ciertas enfermedades, como el cáncer (Sozer y Kokini, 2004). Lo fundamental para llevar a cabo la producción de nanopartículas en esta área de procesos industriales es asegurar el desarrollo de una tecnología basada en organismos no patogénicos (Thakkar *et al.*, 2010).

3. HIPÓTESIS

Hongos de pudrición blanca, aislados de bosques templados del sur de Chile, poseen un alto potencial para la biosíntesis de nanopartículas de plata debido a su alta producción de enzimas extracelulares.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la síntesis extracelular de nanopartículas de plata mediada por proteínas de hongos de pudrición blanca.

4.2 Objetivos Específicos

Evaluar y seleccionar cepas de hongos de pudrición blanca para la biosíntesis de nanopartículas de plata.

Evaluar el efecto del pH del extracto libre de micelio y la concentración de nitrato de plata (AgNO_3) en la síntesis de nanopartículas.

Caracterizar morfológicamente las nanopartículas de plata biosintetizadas por el hongo de pudrición blanca *Anthracophyllum discolor*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Compuestos químicos

Se utilizó nitrato de plata (Sigma-Aldrich, 100% de pureza), se preparó 100 mL de una solución 1 mM. Se almacenó en un frasco ámbar protegido de la luz y se mantuvo a 4 °C. A partir de esta solución se adicionó a cada extracto libre de micelio según los requerimientos de cada experimento.

Para la determinación de proteínas se utilizó el reactivo de Bradford y posterior al uso del reactivo fue almacenado a 4 °C protegido de la luz.

Para la determinación de enzimas ligninolíticas se utilizó malonato de sodio, 2,6 dimetoxifenol, sulfato de manganeso hidratado, ácido etilendiaminotetraacético, peróxido de hidrógeno (30%), alcohol veratrílico y tartrato de sodio.

5.2 Microorganismo utilizado

Se utilizaron los hongos de pudrición blanca *Anthracophyllum discolor* y *Stereum hirsutum* perteneciente a la colección de cultivo del laboratorio de Biotecnología Ambiental de La Universidad de La Frontera (Chile).

5.3 Medios de cultivo

5.3.1 Cultivo de conservación de la cepa. Las cepas *A. discolor* y *S. hirsutum* se conservaron en tubos inclinados a 4 °C con el medio descrito en el Cuadro 1, esterilizado en autoclave por 20 minutos a 121 °C.

Cuadro 1. Medio de cultivo para conservación de hongos de pudrición blanca

Composición del medio (cantidad para 1 L)			
Agar	15 g	KH ₂ PO ₄	1,0 g
Glucosa	20 g	MgSO ₄ x5H ₂ O	0,5 g
Peptona	5,0 g	pH	5,5
Extracto de Levadura	2,0 g		

5.3.2 Cultivo de mantenimiento. A partir de los tubos de conservación, parte del micelio se colocó en el centro de placas Petri con el medio descrito en el Cuadro 2. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 7 días. Luego, las placas se almacenaron a 4 °C por no más de 7 días antes de ser utilizadas para la preparación del inóculo.

Cuadro 2. Medio de mantenimiento agar extracto de malta, glucosa (G-AEM) para hongos de pudrición blanca

Composición del medio (Cantidad para 1 L)			
Agar	15 g	Extracto de malta	3,5 g
Glucosa	15 g	pH	5,5

5.3.3 Cultivo de crecimiento. El inóculo fue preparado a partir del cultivo del hongo en placas, transfiriéndose 7 discos de agar colonizado (6 mm de diámetro) a un matraz Erlenmeyer de 500 mL conteniendo 100 mL de medio de cultivo descrito en el Cuadro 3. Los matraces se incubaron a 25 °C durante 14 días en condiciones estáticas, para la formación de micelio fúngico.

Cuadro 3. Medio de crecimiento para hongos de pudrición blanca

Composición del medio (Cantidad para 1 L)			
Glucosa	15 g	Extracto de levadura	2,5 g
Peptona	5 g	pH	5,5

5.4 Ensayos

5.4.1 Caracterización del medio de cultivo y extracto libre de micelio. Durante la etapa de crecimiento de la biomasa del hongo en medio de cultivo líquido y durante la incubación de biomasa en agua desionizada, se midió la actividad enzimática y se determinó el contenido de proteínas.

5.4.1.1 Actividad enzimática Lacasa (Lac), Manganese peroxidasa (MnP) y Manganese independiente peroxidasa (MiP). Durante la etapa de crecimiento de la biomasa del hongo en medio de cultivo líquido, se midió la actividad enzimática durante los días 0, 3, 5, 7 y 12.

La actividad de la MnP, Lacasa y MiP se determinó a partir de la oxidación del compuesto 2,6 dimetoxifenol (2,6 DMP) para producir el dímero llamado cerilignona. Esta reacción se determinó a 468 nm. La actividad lacasa se determinó a partir de la reacción que contiene 200 μL de malonato de sodio (250 mM, pH 4,5), 50 μL de 2,6 DMP (20 mM), 50 μL de muestra y 550 μL de agua destilada. La actividad MnP se determinó a partir de la misma mezcla de reacción, a la que se adicionó 50 μL de Mn^{2+} (20 mM), se inicio por la adición de 100 μL de 100 μL de H_2O_2 (4 mM) siendo corregida por la actividad lacasa.

La actividad MiP se determinó en la mezcla de reacción contenida en 200 μL de malonato de sodio (250 mM, pH 4,5), 50 μL de 2,6 DMP (20 mM), 1 mM de EDTA, 50 μL de muestra y 500 μL de agua destilada, en un volumen total de 1 mL. La reacción fue iniciada con 100 μL de H_2O_2 (4 mM) y fue corregida por la actividad lacasa.

La actividad MnP se expresó como combinación de la actividad Mn-MiP menos la actividad MiP. El coeficiente de extinción molar fue de $49.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

$$UL^{-1} = ((DO \times (1.000/50)) \times 1.000.000) / 49.600$$

La actividad LiP se determinó mediante la oxidación del alcohol veratrílico a aldehído a 310 nm. La mezcla de reacción consistió en 200 μL de tartrato de sodio (250 mM, pH 3,0), 200 μL de alcohol veratrílico (10 mM), 50 μL de muestra y 450 μL de agua destilada. La reacción se inició con la adición de 100 μL de H_2O_2 (4 mM). El coeficiente de extinción molar fue de $9.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

$$UL^{-1} = ((DO \times (1.000/50)) \times 1.000.000) / 9.600$$

5.4.1.2 Determinación de proteínas. Previo a las mediciones de las muestras se realizó la curva de calibración. Se preparó una solución Patrón en base albumina de huevo de 10 mg/mL de agua, como paso siguiente se preparó una disolución de 1 mg/mL de proteína en solución como solución stock, la curva de calibración se construyó en base a las concentraciones señaladas en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones utilizadas para la curva de calibración de proteínas

Concentración (mg/mL)	0,0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09	0,1
Solución Patrón(mL)	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
Agua destilada(mL)	10,0	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9,0

Las proteínas se midieron en la etapa de crecimiento de la biomasa del hongo en medio de cultivo líquido y durante la incubación de biomasa en agua desionizada. Las mediciones se realizaron los días 0, 5, 10 y 14. La determinación de proteínas se realizó por el método de Bradford. Se adicionó 1 mL de reactivo de Bradford, 20 μL de cada muestra y se dejó reaccionar por 2 min. Las muestras se midieron por espectroscopia UV- Vis Spectronic GENESYS 10S en base a la curva de calibración (Anexo 3).

5.4.1.3 Determinación de la biomasa, peso fresco y peso seco. Después de 14 días de inoculado el hongo en medio de crecimiento, la biomasa fue filtrada y lavada con agua desionizada para retirar los residuos que permanecen en la biomasa, posteriormente fue depositada en un matraz Erlenmeyer que contenía agua desionizada. Posterior a ello se obtuvo el extracto y se descartó la biomasa para los siguientes ensayos. La biomasa se llevó a estufa de secado a una temperatura de 50 °C durante 24 h para determinar el peso seco de la muestra.

5.4.2 Selección de cepa hongo de pudrición blanca para la síntesis de nanopartículas de plata. Se realizó un primer filtrado de la biomasa formada en el medio de cultivo líquido, utilizando Whatman N°1, se lavó con agua desionizada para eliminar todo residuo de medio de cultivo que pueda interferir en la reacción. El micelio fúngico obtenido se transfirió a matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de agua desionizada estéril. Estos se incubaron durante 24 h en un agitador orbital a 150 rpm y 25 °C en oscuridad.

Posterior a las 24 h de incubación del micelio fúngico, se separaron los componentes de la solución acuosa por filtración, utilizando Whatman N°1, obteniendo Extracto Libre de Micelio (ELM) el cual se utilizó para la biosíntesis de la nanopartículas de plata.

Se realizaron ensayos, para ambas cepas, donde a matraces Erlenmeyer con 30 mL de ELM se le adicionaron 300 µL de AgNO₃ a 1 mM para obtener la concentración de 1 mM. La solución resultante se incubó a 25 °C en un agitador orbital a 150 rpm durante 72 h en condición de oscuridad. Para cada experimento se realizó un control positivo, el cual contenía ELM sin nitrato de plata y un control negativo, el cual contenía solución de nitrato de plata sin ELM, ambos controles se mantuvieron en las mismas condiciones del experimento. Finalmente, se tomaron alícuotas de cada muestra y controles a las 0, 3, 24, 48 y 72 h de incubación, seguidamente fueron analizadas mediante espectroscopia UV-Vis un rango de 200 a 800 nm Spectronic GENESYS 10S.

La cepa que mostró un mayor señal de absorbancia entre 400 y 420 nm fue seleccionada para estudios posteriores.

5.4.3 Efectos del pH y concentración de AgNO_3 sobre la biosíntesis de nanopartículas de plata por hongo de pudrición blanca. Del ELM de la cepa seleccionada en el punto 6.4.2, fueron tomados 30 mL y depositados en matraces Erlenmeyer para luego adicionar la sal AgNO_3 , posterior a ello todas las muestras fueron sometidas a un cambio de pH, para ello se utilizaron soluciones de HCl y NaOH a 0.1 M. La escala empleada fue 5.0 - 6.0 - 7.0 - 8.0 - 9.0 - 10. La escala de pH se analizó para las concentraciones 1 mM, 3 mM y 5 mM de AgNO_3 . Para llevar las muestras a una concentración de 1mM se adicionaron 300 μL de AgNO_3 para llevarlas a una concentración de 3 mM se adicionaron 900 μL del reactivo y para llevarlas a 5 mM se adicionaron 1500 μL . Luego todas las muestras son sometidas a las condiciones de incubación señaladas en el punto 6.4.2. Finalmente, se tomaron 200 μL de cada muestra y se analizaron mediante espectroscopia UV-Vis en un rango de 200 a 800 nm en intervalos de tiempo correspondiente a 0, 3, 24, 48 y 72 h de incubación.

La condición de cultivo que mostró un mayor señal de absorbancia entre 400 y 420 nm fue seleccionada para estudios posteriores.

5.4.4 Caracterización de las nanopartículas de plata. Las muestras resultantes que contenían nanopartículas de plata fueron analizadas mediante microscopia TEM y espectroscopia FTIR

5.4.4.1 Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM). Las muestras resultantes que contenían nanopartículas de plata fueron analizadas mediante TEM. Para ello 50 mL de muestras seleccionadas fueron concentrados utilizando un sistema al vacío ‘en rota vapor EYELA Rotary Evaporator a 50 rpm y 50°C, obteniendo un volumen final de 5 mL de muestra. Las muestras fueron almacenadas en frascos ámbar de 10 mL. Las muestras fueron fijadas sobre un porta objeto metálico adicionando un volumen aproximado de 20 μL y secadas a temperatura ambiente para su observación. Para la observación de las muestras se utilizó un microscopio TEM modelo JEOL JEM 1200EX II, provisto de una cámara GATAN Modelo 782. Operando a 120 Kv (Universidad de Concepción).

5.4.4.2 Espectroscopia Infrarroja transformada de Fourier (FTIR). Las muestras resultantes que contenían nanopartículas de plata fueron analizadas mediante FTIR. Se concentró una solución de 500 mL de muestras que contenían nanopartículas de plata, utilizando un sistema al vacío de rota vapor modelo EYELA Rotary Evaporator a 50 rpm y 50 °C, obteniendo 250 mL de muestra. El concentrado resultante fue centrifugado 5 min a 5000 rpm utilizando tubos amicon de 10 kDA hasta obtener un volumen final de 5 mL de un concentrado de nanopartículas de plata. El concentrado final fue analizado en el equipo CARY 630 FTIR Agilent Technologies en fase líquida (Universidad de la Frontera, Departamento de Ciencias Químicas).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Crecimiento de los hongos y caracterización del extracto libre de micelio

Para la formación de nanopartículas de plata por los hongos de pudrición blanca *A. discolor* y *S. hirsutum* se realizó una biosíntesis extracelular, para lo cual los hongos fueron incubados durante 12 días. Durante la incubación de los hongos se evaluó periódicamente las proteínas y las enzimas extracelulares lacasa, MnP, LiP y MiP (Figura 3). Para la cepa *A. discolor* se observó que la enzima que presentó una mayor actividad fue la enzima MnP con aproximadamente 22 U L⁻¹ a los 12 días de incubación, seguida por las enzimas LiP y lacasa (Figura 3a). Asimismo, el contenido de proteínas en el medio de cultivo aumentó durante el tiempo de incubación alcanzando un valor de 1,6 mg mL⁻¹ (Figura 3a). En cuanto a la cepa *S. hirsutum* se observó que la enzima predominante en el medio fue la LiP con un valor máximo de 35 U L⁻¹ a los 7 días, la que disminuyó durante el tiempo de incubación (Figura 3).

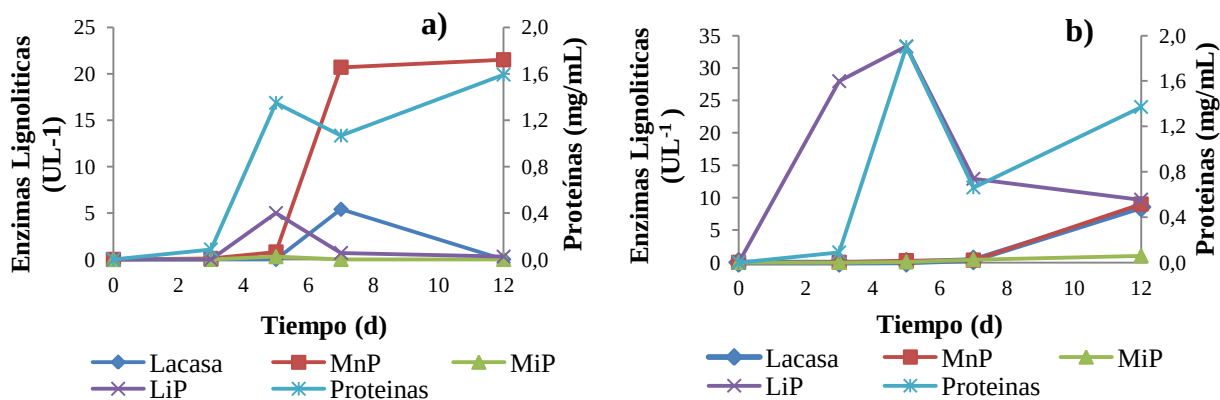


Figura 3. Actividad de la enzima Lac, MnP, MiP y LiP y proteínas presentes en el medio de cultivo de los hongos de pudrición blanca *A. discolor* (a) y *S. hirsutum* (b) durante 12 días de incubación

Posterior a la incubación del hongo, se realizó un lavado de la biomasa con agua desionizada con el objetivo de remover todos los componentes del medio de cultivo que pudieran interferir en la reacción con el ión metálico. Luego, la biomasa es cultivada en agua desionizada, en la cual el hongo libera proteínas intracelulares y extracelulares. Finalmente, la biomasa es filtrada y la solución restante denominada extracto libre de micelio es la utilizada para la formación de las nanopartículas. En este contexto, al extracto libre de micelio se realizó una determinación del contenido de proteínas, enzimas LiP, MnP, MiP y lacasa, y pH (Tabla 4). Si bien durante el crecimiento del hongo se mostró una producción de proteínas y enzimas, éstas disminuyeron considerablemente en el extracto libre de micelio.

Tabla 4. Caracterización del extracto libre de micelio de los hongos *A. discolor* y *S. hirsutum*

Parámetro	Unidad	Hongos	
		<i>A. discolor</i>	<i>S. hirsutum</i>
Proteínas	mg mL ⁻¹	0.015	0.015
Lacasa	U L ⁻¹	0.00	0.45
MnP	U L ⁻¹	1.29	0.49
LiP	U L ⁻¹	0.00	0.00
pH		6.3	6.6

La biosíntesis extracelular por hongos es la técnica más ampliamente utilizada debido a que se produce una gran cantidad de nanopartículas libres de células través de un proceso relativamente simple, donde actúan principalmente proteínas y enzimas (Durán *et al.*, 2005). En este contexto, los hongos de pudrición blanca producen un elevado contenido de proteínas y enzimas durante su crecimiento, las cuales podrían interaccionar para la formación de nanopartículas metálicas. Sin embargo, los resultados obtenidos de la caracterización del extracto libre de micelio demostraron que el lavado y filtración de la biomasa produce una eliminación considerable del contenido de proteínas así como también de enzimas ligninolíticas, obtenidas durante la etapa de crecimiento de los hongos. Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos se puede deducir que para la formación de nanopartículas se requiere una pequeña concentración de proteínas y enzimas, las cuáles no necesariamente corresponde a las enzimas ligninolíticas.

En este aspecto, una cantidad limitada de estudios se han desarrollado con este tipo de hongos y con nanopartículas de plata. Estudios realizados por Sanghi *et al.* (2011) demostraron que durante la biosíntesis de nanopartículas de oro por *Phanerochaete chrysosporium* la enzima lacasa fue la dominante en el medio fúngico, atribuyéndose a ésta la formación de las nanopartículas. Por otra parte, Sanghi y Verma (2009) demostró que el hongo de pudrición blanca *Coriolous verisolor* produce nanopartículas de sulfito de cadmio, donde el grupo tiol de las proteínas fúngicas es el principal responsable de la formación de nanopartículas.

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos y a lo reportado por otros estudios se hace imprescindible el estudio de los mecanismos de formación de las nanopartículas metálicas, debido a que de esta forma sería posible identificar las posibles reacciones que permiten la formación de las nanopartículas y así optimizar el proceso de reacción.

6.2 Selección de cepa hongo de pudrición blanca para la biosíntesis de nanopartículas de plata.

La información respecto a la biosíntesis de nanopartículas por hongos de pudrición blanca es muy limitada, en la actualidad solo, se ha reportado la biosíntesis de nanopartículas de oro por el hongo *P. chrysosporiumun* (Sanghi *et al.*, 2011.) nanopartículas de Ag por *Pleurotus sajor caju* (Vigneshwaran *et al.*, 2007; Nithya *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2012, Chan *et al.*, 2013) y de CdS por *Coriolus versicolor* (Sanghi y Verma, 2009). La biosíntesis por cepas de hongos genera una alta producción de compuestos orgánicos extracelulares (Mohanpuria *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 2011) necesarios para la biosíntesis de nanopartículas y posibles de obtener tras un proceso relativamente sencillo.

Para ellos se estudió la biosíntesis de nanopartículas de plata en el extracto libre de micelio de los hongos *A. discolor* y *S. hirsutum*, a través de la medición del espectro UV-Vis.

Lo primero que se observó en el extracto libre de micelio, de las cepas *A. discolor* y *S. hirsutum* cuando se adicionó la solución de AgNO_3 fue un cambio de coloración (Figura 4). El cambio va desde un color amarillo pálido en el tiempo 0 h (Figura 4c), a un café o marrón intenso que se observa transcurridas las 72 h de incubación (Figura 4f). El cambio de color es gradual a medida

que transcurre el tiempo (Figura 4d y 4e). El control negativo (Figura 4a) y control positivo (Figura 4b) no presentan cambio de coloración al transcurrir el periodo de incubación de la reacción.

En este sentido, la forma más simple de identificar la biosíntesis de nanopartículas de plata es observando el cambio de coloración presentado en la solución de reacción extracto libre de micelio al adicionar la sal metálica. La adición de la sal metálica en el extracto libre de micelio genera un cambio de color a amarillo en la solución, que se intensifica de forma gradual transformándose en marrón o café intenso, característica cualitativa que indica la formación de nanopartículas de plata (Durán *et al.*, 2005; Vigneshwaran *et al.*, 2007; Basavaraja *et al.*, 2008; Shaligram *et al.*, 2009; Jain *et al.*, 2010), lo cual es posible atribuirlo a la excitación de plasmón superficial en las nanopartículas (Mukherjee *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2003).

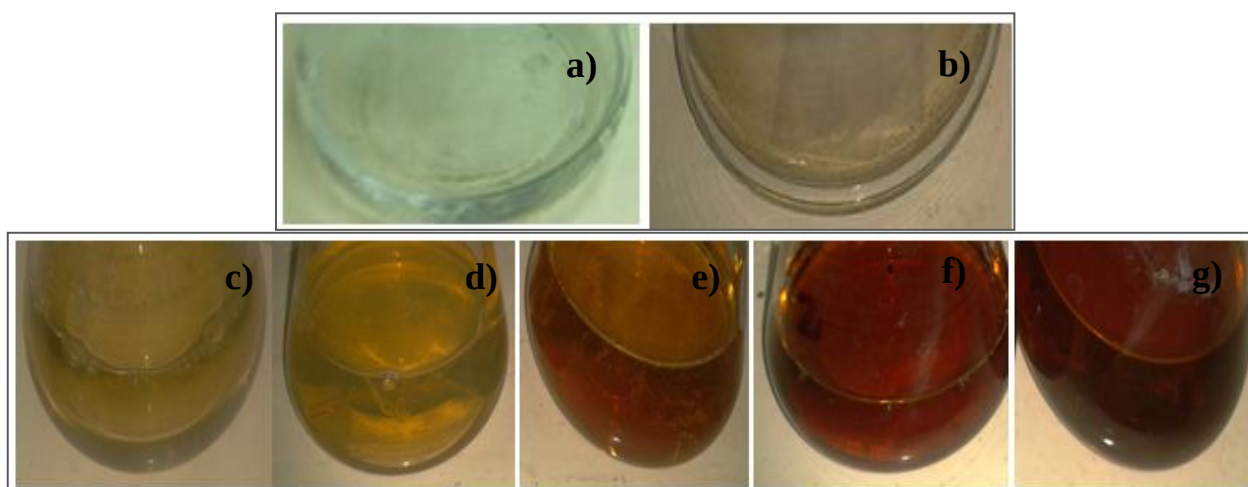


Figura 4. Cambio de coloración para la biosíntesis de nanopartículas de plata por los hongos de pudrición blanca *A. discolor* 1 mM de AgNO_3 por 72 h de reacción. Control negativo AgNO_3 (a), control positivo extracto libre de micelio (b). Cambio de coloración en extracto libre de micelio a las 0h (c), 3h (d), 24h (e), 48h (f) y 72h (g)

En la Figura 5 se muestran las bandas de absorción registrados por los extractos de las cepas *A. discolor* (Figura 5a) y *S. hirsutum* (Figura 5b). La Figura 5(a y b) presentaron dos regiones de absorbancia, una entre los 200 a 300 nm y otra entre los 400 a 420 nm. Las altas bandas de absorbancia registrados a 200 y 300 nm son atribuibles a residuos de triptófano y tirosina en las proteínas presentes en los extractos libres de micelio (Vigneshwaran *et al.*, 2007; Jaidev y Narasimba, 2010). Por otra parte, la segunda región observada en ambos gráficos (5 a y b) son de gran interés ya que exhiben una banda creciente en la zona de interés entre los 400 y 420 nm donde se reporta la formación de nanopartículas de plata. El cambio de color y el perfil del rango de absorbancia registrado por los extractos de ambas cepas entre 410 y 420 nm fue indicativo de una efectiva reducción extracelular de iones de plata en la solución lo que es coincidente con los estudios realizados por Ahmad *et al.* (2003) y Durán *et al.* (2005).

Si bien los extractos de ambas cepas, presentaron la región de interés para la formación de nanopartículas de plata, la banda de absorbancia fue mayor y el plasmón de superficie más definido para el extracto de *A. discolor* (Figura 5a) en comparación con la cepa *S. hirsutum* que presentó una banda de absorbancia inferior y menos pronunciado. Estudios realizados por Bhainsa y Souza (2006) y Shaligram *et al.* (2009) demostraron que un aumento significativo de la banda de absorbancia y la presencia de un plasmón definido son características que se asocian con un tamaño y forma deseados en la nanopartículas de plata (Bhainsa y Souza, 2006; Shaligram *et al.*, 2009).

Por lo tanto, tomando en consideración los resultados obtenidos, la cepa fúngica *A. discolor* fue seleccionada para análisis posteriores

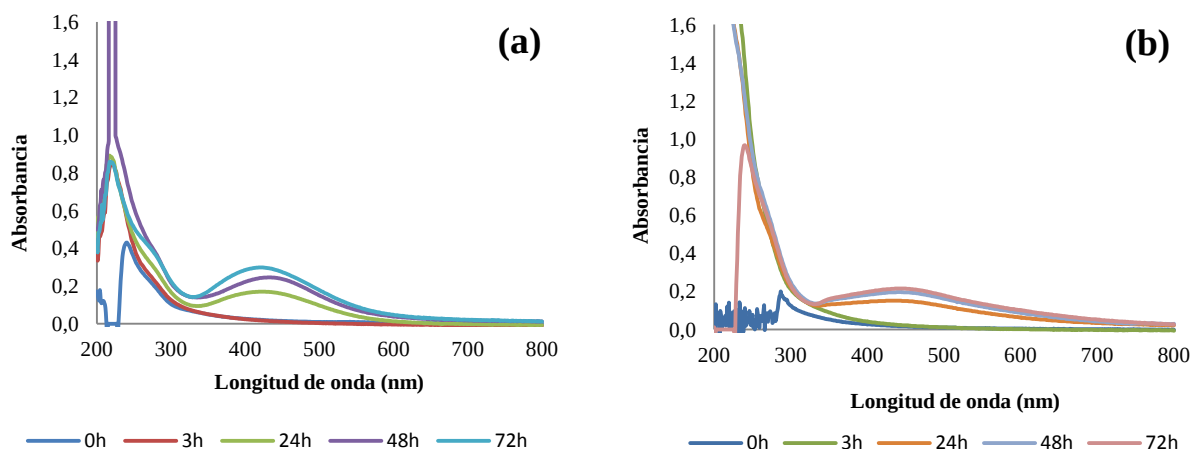


Figura 5. Espectros de absorbancia UV-Vis para la biosíntesis de nanopartículas plata por los hongos de pudrición blanca (a) *A. discolor* 200- 800 nm y (b) *S. hirsutum* 200-800 nm y con 1 mM de AgNO_3 por 72 h de reacción

6.3 Efectos del pH y concentración de AgNO_3 sobre la biosíntesis de nanopartículas plata por hongo de pudrición blanca.

La variación de pH se ha informado como uno de los parámetros de reacción para la producción de nanopartículas (Gericke y Pinches, 2006). El estudio de la cepa seleccionada *A. discolor* se llevó a cabo utilizando como sustrato AgNO_3 en diferentes concentraciones (1, 3 y 5 mM). Por otra parte, se evaluó el efecto de diferentes pH (pH 5,0, 6, 0, 7,0 8,0; 9,0 y 10,0) para cada una de las tres concentraciones en estudio, con el fin de evaluar la mejor condición para la biosíntesis de nanopartículas mediante la determinación por espectroscopia UV-Vis. Los resultados de este ensayo se muestran en las Figura 6, 7 y 8.

El análisis del espectro UV-Vis para la biosíntesis de nanopartículas de plata con 1 mM de AgNO_3 a diferentes pH se muestra en la Figura 6. A pH 5,0 no se observó ninguna banda de absorción durante las 72 h de reacción (Figura 6a). A pH 6,0 (Figura 6b) y pH 7,0 (Figura 6c) se observó que los espectros registrados presentaron formas irregulares del plasmón en el tiempo de reacción, pero no se observó formación de ninguna banda de absorción significativo. Efecto contrario fue mostrado en los extractos con pH 8,0, 9,0 y 10, donde una banda de absorbancia entre 420 y 450 nm fue expresado en diferentes magnitudes. En el extracto con pH 10 se mostró

la banda más baja (Figura 6f) mientras que en el extracto con pH 8,0 y 9,0 se mostró una banda más definida entre 420 y 450 nm, siendo mayor a pH 9,0. Cabe mencionar, que en ambas condiciones la señal se incrementó con el aumento del tiempo de reacción. En este sentido, el rango de tamaño de las nanopartículas y su distribución se relacionan con la posición de la banda plasmónica, mientras más amplia sea esta banda mas va a aumentar el rango de tamaño posible para las nanopartículas (Narayanan et al., 2010).

.

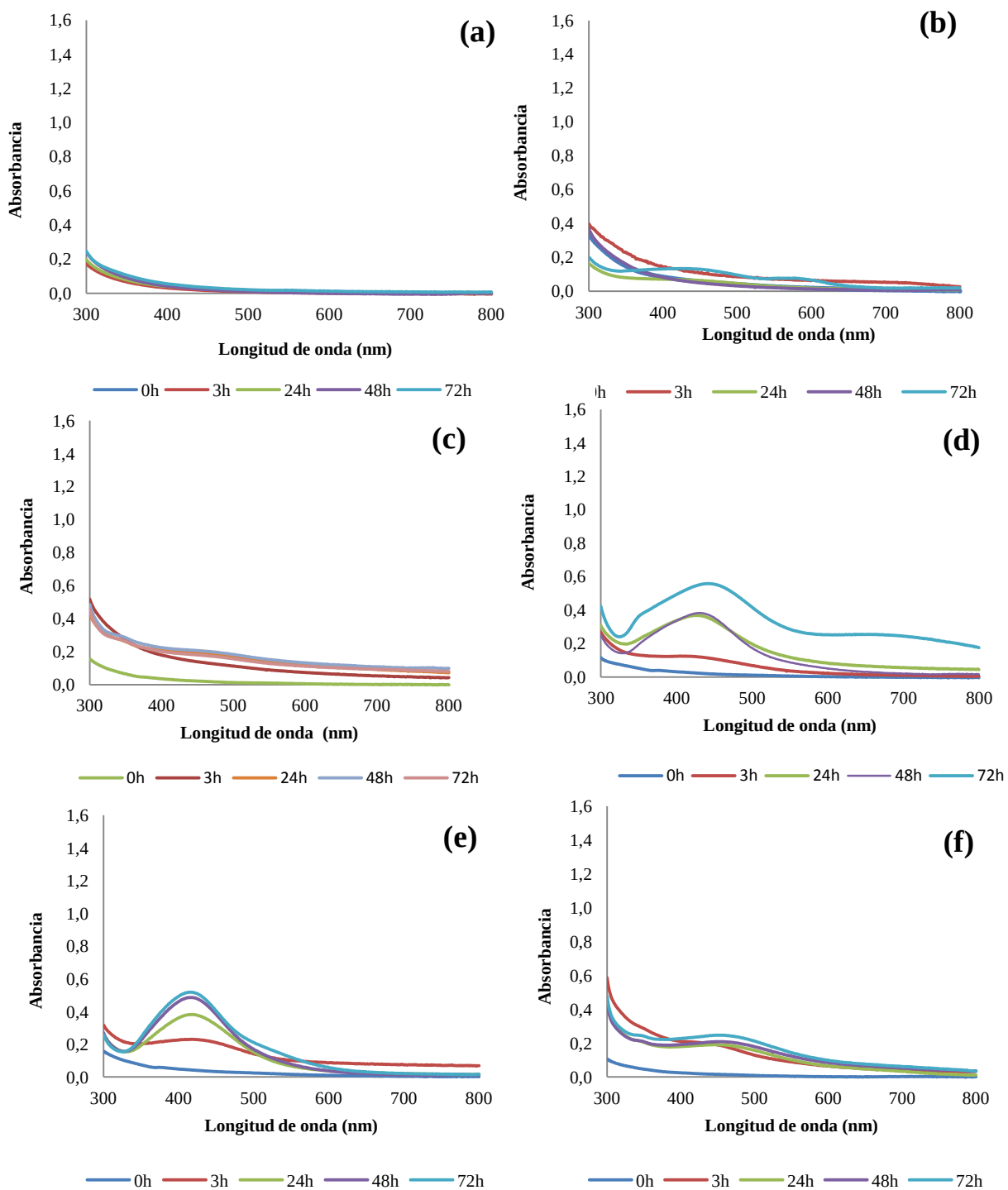


Figura 6. Espectros de absorción UV-Vis para biosíntesis de nanopartículas plata por el hongo de pudrición blanca *A. discolor* en medio con 1 mM de AgNO_3 por 72 h de reacción. Los espectros corresponden a los resultados de la reacción a diferentes condiciones de pH en la solución de reacción: (a) pH 5, (b) pH 6, (c) pH 7, (d) pH 8, (e) pH 9 y (f) pH 10

El análisis del espectro UV-Vis de la biosíntesis de nanopartículas de plata con AgNO_3 a 3 mM a diferentes pH se muestra en la Figura 7. A pH 5,0 y 6,0 no se observó ninguna banda de absorción en la región de interés (400-420 nm) durante el tiempo de reacción (Figura 7a y 7b). Estos resultados concuerdan con los obtenidos con el extracto libre de micelio a concentración de 1 mM de AgNO_3 en los valores de pH 5,0 y 6,0, los que de igual forma no presentaron bandas de absorbancia en la región de interés. Sin embargo, para los extractos con pH 7,0 8,0 9,0 y 10 se observaron diferentes bandas de absorbancia. A pH 7,0 (Figura 7c) se registró una banda de absorbancia entre 400 y 420 nm aumentado en el tiempo de reacción mostrando una plasmón de superficie amplio y poco definido. La banda de absorbancia a pH 8,0 (Figura 7d) se observó entre 400 y 420 nm, el cuál fue superior al exhibido en el extracto libre de micelio a pH 7,0 en cuanto a altura creciente en el tiempo pero no en cuanto a la amplitud de la banda. Asimismo, en el extracto a pH 9,0 (Figura 7e) se registró un aumento significativo de la banda de absorbancia entre 400 y 420 nm durante el tiempo de reacción y presentando una forma definida en altura y amplitud. Finalmente, a pH 10 (Figura 7f) se registró un pico irregular entre los 420 y 440 nm sin un crecimiento significativo de la banda en el tiempo.

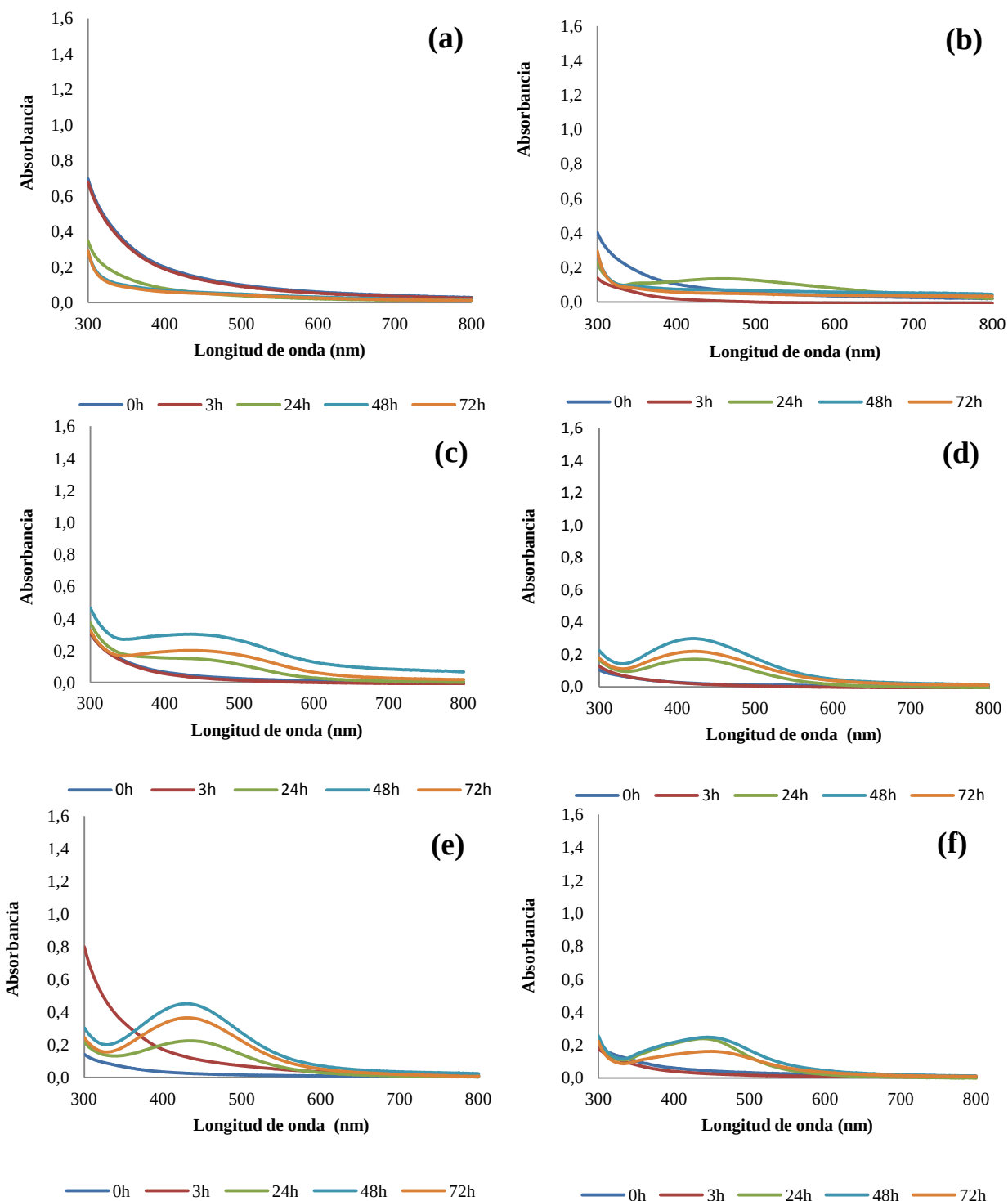


Figura 7. Espectro de absorción UV-Vis de biosíntesis de nanopartículas por el hongo de pudrición blanca *A. discolor* en medio con 3 mM de AgNO_3 por 72 h de reacción. Los espectros corresponden a los resultados de la reacción a diferentes condiciones de pH en la solución de reacción: (a) pH 5, (b) pH 6, (c) pH 7, (d) pH 8, (e) pH 9 y (f) pH 10, respectivamente

El análisis del espectro de UV-Vis de la biosíntesis de nanopartículas de plata con AgNO_3 5 mM a diferentes pH se muestra en la Figura 8. A pH 5,0 y 7,0 (Figura 8a y 8c) no se observó ninguna banda de absorbancia en la región de interés para la formación de nanopartículas de plata durante el tiempo de reacción. Sin embargo, a pH 6,0 (Figura 8b) si bien no se observó una banda de absorbancia durante las 48 h de reacción, sí se observó una débil señal a las 72 h de reacción. Efecto contrario fue encontrado en los extractos a pH 8,0, 9,0 y 10,0, en los cuales se observa claramente la banda de absorbancia entre 400 y 450 nm (Figura 8d,e,f). Bajo estas condiciones las bandas de absorbancia aumentan con el tiempo de reacción, resultando en un plasmón muy definido a través del tiempo de reacción.

Cabe señalar, que la banda de absorbancia con mayor altura y mayor definición fue la obtenida en el extracto libre de micelio con AgNO_3 5 mM a pH 10,0, lo cual indicaría que bajo esta condición existe una mayor formación de nanopartículas de plata.

Como conclusión de los resultados obtenidos en cuanto al efecto del pH, es posible señalar que para lograr la biosíntesis de nanopartículas de plata es necesario llevar a cabo la reducción del ión plata en condiciones alcalinas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Kathiresan *et al.*, (2009) y Sanghi y Verma (2009), en los cuales se señalan que la biosíntesis de nanopartículas de plata se produce principalmente en condiciones neutras y alcalinas. Asimismo, Sanghi y Verma, (2009) demostraron que la biosíntesis de las nanopartículas de Ag por *C. versicolor* a pH 10 fue más rápida y estable que a pH normal (5.6). Además, diversos estudios (Kathiresan *et al.*, 2009; Nayak *et al.*, 2009; Gericke y Pinches, 2006) han demostrado que el pH en el medio de reacción puede afectar el tamaño y forma de las nanopartículas. En este contexto, Nayak *et al.*, (2011) demostró que en la biosíntesis de Ag nanopartículas por el hongo *P. purpurogenum* en un medio a pH 4 y 5, las nanopartículas eran polidispersas con un tamaño entre 40 y 55 nm, mientras que las partículas más pequeñas se formaron a pH 8 y 9 con un tamaño entre 8 y 13 nm y una forma uniforme.

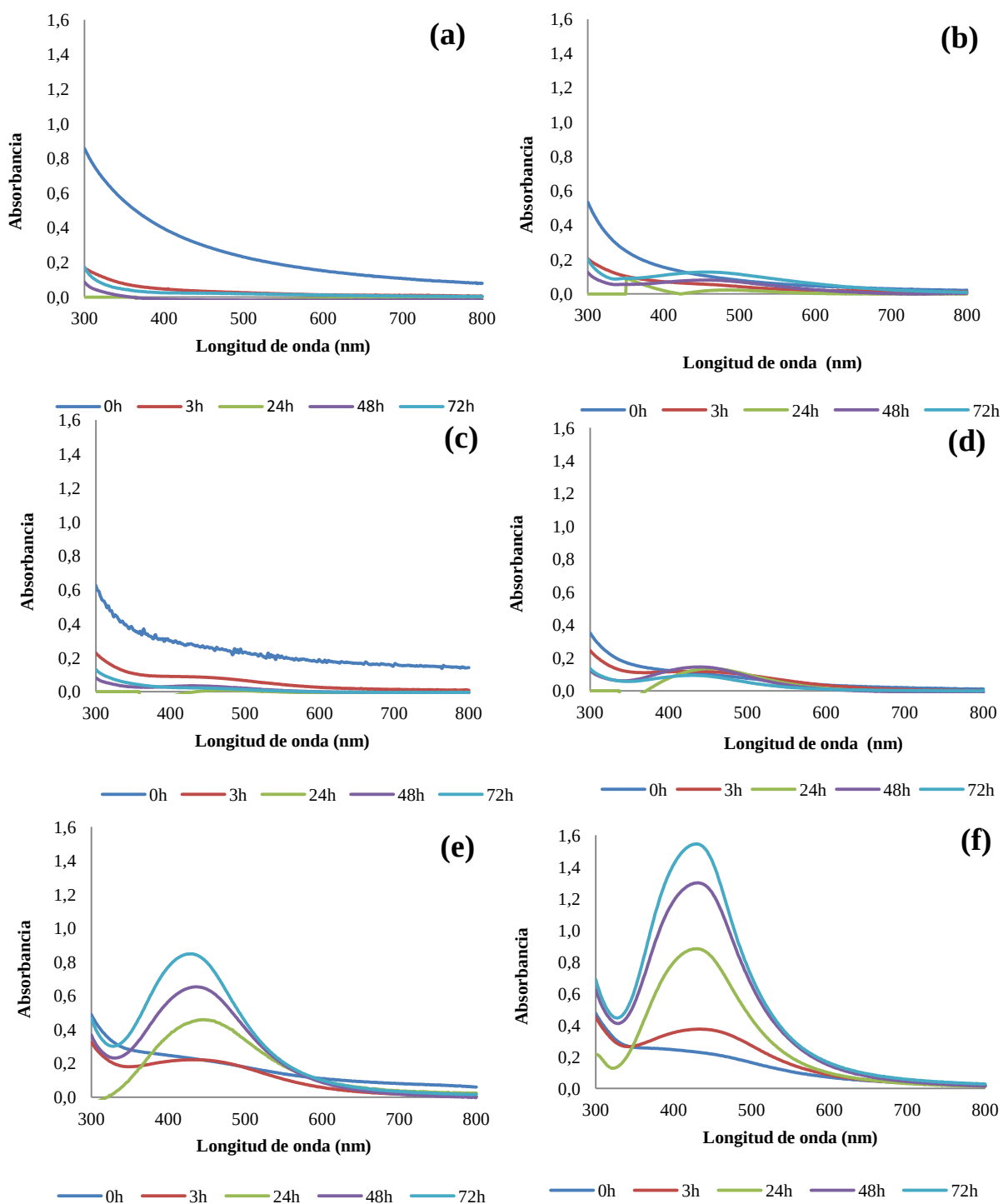


Figura 8. Espectro de absorción UV-Vis de biosíntesis de nanopartículas por el hongo de pudrición blanca *A. discolor* en medio con 5 mM de AgNO_3 por 72 h de reacción. Los espectros corresponden a los resultados de la reacción a diferentes condiciones de pH en la solución de reacción: (a) pH 5, (b) pH 6, (c) pH 7, (d) pH 8, (e) pH 9 y (f) pH 10

Por otro parte, la concentración de iones metálicos también afecta la formación de nanopartículas. Estudios de Nayak *et al* (2011) demostraron que un aumento en la concentración de AgNO_3 aumenta la formación de nanopartículas de plata por el hongo *P. purpurogenum*. A 5 mM de AgNO_3 se observaron nanopartículas altamente polidispersas y al utilizar 1 mM de AgNO_3 se obtuvieron nanopartículas de platas altamente monodispersas y esféricas de tamaño entre 8-10 nm. En este contexto, este reporte es contrario a los resultados experimentales obtenidos, en cuanto a que se obtuvo un plasmón altamente definido y creciente sugiriendo con esto la formación de partículas similares en forma y tamaño a una concentración de 5 mM de AgNO_3 .

Por lo tanto, en base a los resultados obtenidos resulta fundamental manejar la condición óptima bajo la cual se realizará la biosíntesis de nanopartículas puesto que la actividad antimicrobiana de nanopartículas de metal se da en función del tamaño de partícula, morfología y monodispersidad (uniformemente distribuida) (Durán *et al.*, 2012). Si bien el pH es un parámetro indicador para la formación de nanopartículas en una primera instancia, es esencial la determinación de la distribución de tamaño de las nanopartículas (Sadowski *et al.*, 2008).

6.4 Caracterización de las nanopartículas de plata

La cepa fúngica seleccionada para la biosíntesis de nanopartículas de plata fue *A. discolor*, en base a esto se realizó el análisis FTIR, en el cual se mostraron las siguientes bandas: 1036, 1155, 1243, 1380, 1540, 2109, 2318, 2924 y 3043 cm^{-1} (Figura 10).

En los espectros FTIR obtenidos con las bandas de nanopartículas biosintetizadas que se encuentran en la región de 3280 cm^{-1} y 2924 cm^{-1} , éstos se presentan como movimientos de tipo estiramiento de vibraciones en aminas primarias y secundarias (Vigneshwaran *et al.*, 2007, Chan *et al.*, 2013), otros informan de bandas 1640 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} los movimientos correspondientes a tipo de vibraciones de flexión (Vigneshwaran *et al.*, 2007; Basavaraja *et al.*, 2008; Shaligram *et al.*, 2009). Las bandas cerca de 1029 cm^{-1} se informan como NC estiramiento de vibraciones de aminas aromáticas y alifáticas (Shaligram *et al.*, 2009), otra banda de interés es 1243 y 1244 cm^{-1} que se designa para los movimientos de vibración de flexión en aminas I y aminas III

(Hosseini *et al.*, 2012). Otra banda es 1076 cm^{-1} correspondiente a los movimientos de vibración de flexión en aminas II, se informó por Hosseini *et al.*, (2012). Por otra parte, Chan *et al.*, (2013) informaron de la misma banda de síntesis de nanopartículas de plata usadas en la biosíntesis de los hongos de pudrición blanca. La observación general confirma la presencia de la proteína en las muestras de nanopartículas de plata. Estos resultados sugieren la liberación de proteína extracelular por los hongos de pudrición blanca, cumpliendo como función principal, la formación y estabilización de las nanopartículas biosintetizados en solución (Vigneshwaran *et al.*, 2007; Basavaraja *et al.*, 2008; Shaligram *et al.*, 2009).

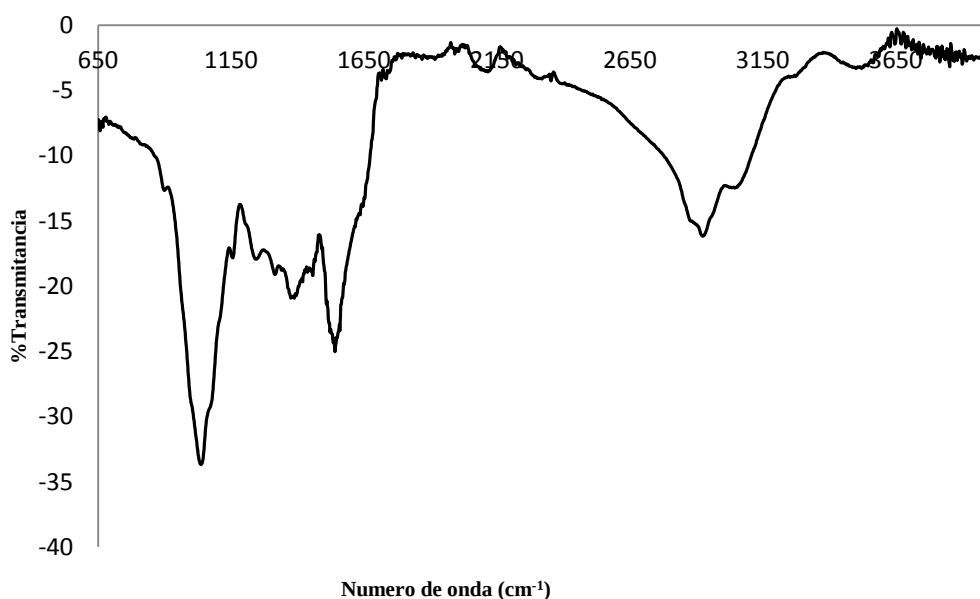


Figura 10. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) de proteína producidas por *A. discolor*

La Figura 11 muestra las imágenes obtenidas en la microscopía electrónica de transmisión (TEM) se observa la formación de nanopartículas de plata contenidas en la solución de extracto libre de micelio de 3 mM de AgNO_3 posterior a 72 h de reacción. Las nanopartículas de plata resultantes de la biosíntesis muestran una forma esférica y un tamaño aparentemente similar entre sí, indicando una alta monodispersidad. A su vez en la Figura 11(a) las nanopartículas se observan mas individualizadas que en la Figura 11(b) mostrando además agregaciones de tamaños diferentes en ambas figuras (Figura 11a y b) las cuales se demuestran en las zonas más oscuras de la imagen, manteniendo la forma esférica similar entre sí.

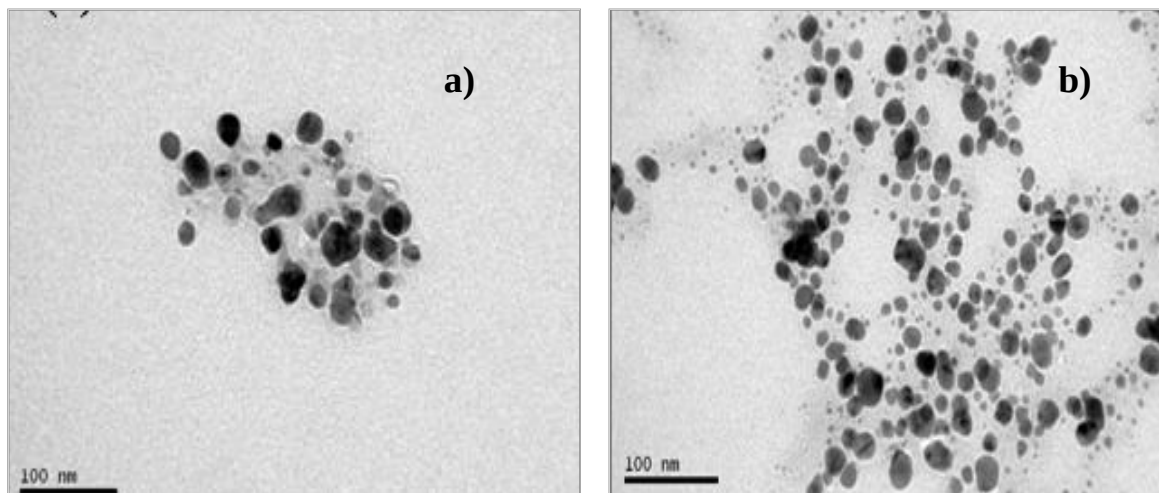


Figura 11. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (TEM) (a) y (b) de nanopartículas de plata biosintetizadas en el extracto libre de micelio de *A. discolor* a después de 72 h de incubación

El desarrollo de un protocolo para la producción de nanopartículas metálicas controlando la morfología y tamaño de partícula es el gran reto de biosíntesis. Estudios realizados por Morones *et al.*, (2005) demostraron que el efecto antimicrobiano de nanopartículas de plata puede atribuirse principalmente a su concentración, tamaño pequeño, monodispersidad y superficies altamente específicos. En estas condiciones, las nanopartículas pueden interactuar directamente con las membranas microbianas de bacterias y hongos patógenos, generando de muerte celular (Duran *et al.*, 2010). Por lo tanto, determinar el valor óptimo de los parámetros de la reacción en

la biosíntesis de nanopartículas y como afectan su distribución es sumamente importante y preciso corroborar mediante diferentes técnicas las características que esta evidencian. (Gericke y Pinches, 2006; Nayak *et al.*, 2011). Una de estas técnicas corresponde a la microscopia TEM la cual permite visualizar el tamaño y la forma de nanopartículas. La formación de nanopartículas de plata esféricas en la solución de extracto libre de micelio y con similar tamaño entre sí indican posible monodispersidad de estas, características deseadas en la muestra (Ahmad *et al.*, 2003). Si bien este tipo de microscopia permite identificar partículas individuales, también es posible identificar agregados de estas, así lo reporta Gericke y Pinches, (2006) observando una morfología irregular y a su vez agregados de las nanopartículas. Este reporte es similar en un aspecto y difiere en otro en cuanto a los resultados experimentales, ya que si fue posible observar agregado de partículas en la imagen, pero además se observó tamaño y forma similar de las nanopartículas de plata en la muestra.

7. CONCLUSION

1. El espectro UV-Vis de extracto libre de micelio de hongos de pudrición blanca *A. discolor* y *S. hirsutum* en solución con nitrato de plata, generan una banda de absorbancia entre 400 y 420 nm atribuido a la formación de nanopartículas de plata.
2. El hongo de pudrición blanca *Anthracoephyllum discolor* presenta bandas de absorbancia mayores a *Stereum hirsutum*, lo que sugiere una mayor producción de nanopartículas por este parte de este hongo.
3. El extracto libre de micelio del hongos *A. discolor* es eficaz para la biosíntesis de nanopartículas de plata en solución de nitrato de plata bajo condiciones de pH alcalina, obteniendo los mejores resultados a pH 9 en las tres concentraciones de AgNO_3 utilizadas.
4. La biosíntesis de nanopartículas de plata en el extracto de *A. discolor* presenta bandas de absorbancia variables según la concentración de iones metálicos que se utiliza la banda más alta se genera con 5 mM de AgNO_3 , luego a 1 mM se genera un pico de absorbancia medio, y la banda más bajo se obtiene utilizando 3 mM de AgNO_3 .
5. La presencia de grupos amino unidos a las nanopartículas de plata se confirmó mediante espectroscopia FTIR, lo que sugiere la liberación extracelular de proteínas por el hongo de pudrición blanca. Estas proteínas, probablemente, cumplen la función de formación y estabilización de las nanopartículas biosintetizadas.

Futuras perspectivas de investigación. El hongo *Anthracoephyllum discolor* ha demostrado ser capaz de producir nanopartículas de plata. El mecanismo probable para la biosíntesis extracelular de nanopartículas de plata es uno de los desafíos posteriores de esta investigación.

8. LITERATURA CITADA

- Ahmad A, Mukherjee P, Mandal D, Senapati S, Khan M, Kumar R, Sastry M.** 2002. Enzyme mediated extracellular synthesis of CdS nanoparticles by the fungus, *Fusarium oxysporum*. Journal of the American Chemical Society 124: 12108–12109.
- Ahmad A, Mukherjee P, Senapati S, Mandal D, Khan MI, Kumar R, Sastry M.** 2003. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 28: 313-318.
- Azim A, Davood Z, Mohammad R , Dariush N, Shahram T, Majid M, Nasim B.** 2009. Synthesis and characterization of gold nanoparticles by tryptophane. American Journal Applied Science. 6: 691-695.
- Balaji D, Basavaraja S, Deshpande R, Mahesh D, Prabhakara B, Venkataramanb A.** 2009. Extracellular biosynthesis of functionalized silver nanoparticles by strains of *Cladosporium cladosporioides* fungus. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 68: 88–92.
- Bansal V, Poddar P, Ahmad A, Sastry M.** 2006. Room-temperature biosynthesis of ferroelectric barium titanate nanoparticles. Journal of the American Chemical Society 128: 11958–11963.
- Bansal V, Rautaray D, Ahmad A, Sastry M.** 2004. Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. Journal of Materials Chemistry 14: 3303-3305.
- Bansal V, Rautaray D, Bharde A, Ahire K, Sanyal A, Ahmad A, Sastry M.** 2005. Fungus-mediated biosynthesis of silica and titania particles. Journal of Materials Chemistry 15: 2583-2589.
- Basavaraja S, Balaji S, Lagashetty A, Rajasab A ,Venkataraman A.** 2008. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium semitectum*. Materials Research Bulletin 43: 1164–1170.
- Bhainsa K, D'Souza S.** 2006. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus fumigates*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 47: 160–164.
- Buzea C, Blandino I, Robbie K.** 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Biointerphase. 2:17-172.
- Castro-Longoria E, Vilchis-Nestor A, Avalos-Borja M.** 2011. Biosynthesis of silver, gold and bimetallic nanoparticles using the filamentous fungus *Neurospora crassa*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 83: 42–48.

Chau C, Wu S, Yen G. 2007. The development of regulations for food nanotechnology. Trends in Food Science & Technology 18, 269– 280.

Chaudhry Q, Castle L, Watkins R. 2010. Nanotechnologies in food. Royal Society of Chemistry Publishers, ISBN 9780-85404-169-5.

Dar M, Ingle A, Rai M. 2012. Enhanced antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by *Cryphonectria* sp. evaluated singly and in combination with antibiotics. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine DOI:10.1016/j.nano.2012.04.007. In press.

Das S, Das A, Guha A. 2009. Gold nanoparticles: microbial synthesis and application in water hygiene management. Langmuir 25: 8192–8199.

Durán N, Marcato P , Alves O, De Souza G, Esposito E. 2005. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. Journal Nanobiotechnology. 2005: 3- 8.

Durán N, Marcato P, De Conti R, Alves O, Costa F, Brocchi M. 2010. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. Journal of the Brazilian Chemical Society. 21: 949-959.

Durán N, Marcato P, De Souza G , Alves O, Esposito E. 2007. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. Journal Biomedical Nanotechnology. 3:203–208.

Eaton R y Hale M. 1993. Wood, decay, pests and prevention. Chapman and Hall, London. pp 546.

El-Rahim W, El-Ardy O, Mohammad F . 2009. The effect of pH on bioremediation potential for the removal of direct violet textile dye by *Aspergillus niger*. 249: 1206–1211.

Esposito E, Innocentini-Mei L, Ferraz A, Canhos V P, Durán N . 1993. Phenoloxidases and hydrolases from *Pycnoporus sanguineus* (UEC-2050 strain): applications. Journal of Biotechnology. 29: 219–228.

Fayaz A , Balaji K, Girilal M, Yadav R, Kalaichelvan P , Venketesan R. 2010. Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria. Nanomedicine: Naotechnology, Biology and Medicine. 6: 103-109.

Fayaz A, Balaji K, Kalaichelvan P, Venketesan R. 2009. Fungal based synthesis of silver nanoparticles – An effect of temperature on the size of particles. Colloids and Surface B: Biointerfaces. 74: 123-126.

Feng Q, Wu J, Chen G , Cui F , Kim T , Kim J . 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J.Biomed Mater.Res.* 52:662-668.

Gericke M y Pinches A. 2006a. Biological synthesis of metal nanoparticles. *Hydrometallurgy* 83: 132–140.

Gericke M y Pinches A. 2006b. Microbial production of gold nanoparticles. *Gold Bulletin.* 39: 22-28.

Ghaseminezhad S, Hamed S, Shojaosadati S. 2012. Green synthesis of silver nanoparticles by a novel method: Comparative study of their properties. *Carbohydrate Polymers* 89: 467-472.

Govender Y, Riddin T, Gericke M, Whiteley C. 2009. Bioreduction of platinum salts into nanoparticles: a mechanistic perspective. *Biotechnology Letters* 31: 95–100.

He L, Liu Y, Mustapha A, Lin M. 2011. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiological Research.* 166: 207-215.

Hosseini M, Schaffie M, Pazouki M, Darezereshki E, Ranjbar M. 2012. Biologically synthesized copper sulfide nanoparticles: Production and characterization. *Materials Science in Semiconductor Processing.* (In Press).

Ingle A, Gade A, Pierrat S, Sönnichse C, Rai M. 2008. *Mycosynthesis of* silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. *Current Nanoscience* 4: 141-144.

Jaidev L, Narasimha G. 2010. Fungal mediated biosynthesis of silver nanoparticles, characterization and antimicrobial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 81: 430–433.

Jain N, Bhargava A, Majumdar S, Tarafdar J, Panwar, J. 2012 A biomimetic approach towards synthesis of zinc oxide nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology.* DOI: 10.1007/s00253-012- 3934-2. In press.

Jain N, Bhargava A, Majumdar S, Tarafdar J, Panwar J. 2011. Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: A mechanism perspective. *Nanoscale* 3: 635-641.

Kathiresan K, Manivannan S, Nabeel M, Dhivya B. 2009. Studies on silver nanoparticles synthesized by a marine fungus, *Penicillium fellutanum* isolated from coastal mangrove sediment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 71, 133–137.

Kertsen P, Kalyanaraman B, Hamel K, Reinhammar B, Kirk T. 1990. Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes. 475–480.

Kim S, Kim K, Lamsal K, Kim Y, Kim S, Jung M, Sim S, Kim H, Chang S, Kim J, Lee Y. 2009. An in vitro study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogens *Raffaelea* sp. *Journal Microbiology and Biotechnology*. 19: 760-764.

Kristiansen J, Andersen R A .1986. (Eds.), *Chrysophytes: Aspects and Problems*, Cambridge University Press, New York, 1986).

Liu W. 2006 Nanoparticles and Their Biological and Environmental Applications. *Journal of bioscience and bioengineering*. 1: 1–7.

Mandal D, Bolander M , Mukhopadhyay D, Sarkar G, Mukherjee P. 2006. The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69: 485–492.

Martinez M, RuizDuenas F, Guillen F, Martinez A. 1996. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *European Journal of Biochemistry* 237:424-432.

Mashitua M , Chan Y . 2011. *Schizophyllum commune* As Nano- Factory for biosynthesis of silver nanoparticles (U. Sains Malaysia, Pulau Pinang). ICCE-19 July 24-30, Shanghai, China. www.icce-nano.org.

Mishra A, Tripathy S, Yuna S. 2012. Fungus mediated synthesis of gold nanoparticles and their conjugation with genomic DNA isolated from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Process Biochemistry* 47: 701–711.

Mohanpuria P, Rana N, Yadav S .2008. Biosynthesis of nanoparticles: technological concepts and future applications. *Journal of Nanoparticle Research* 10: 507-517.

Morones J , Elechiguerra J , Camacho A, Holt K, Kouri J , Ramirez J, Yacaman M . 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 16: 2346-2353.

Mukherjee P, Ahmad A, Mandal D, Senapati S, Sainkar S, Khan M , Ramani R, Parischa R, Ajayakumar P , Alam M, Sastry M, Kumar R. 2001. Bioreduction of AuCl_4^- Ions by the Fungus, *Verticillium sp.* and Surface Trapping of the Gold Nanoparticles Formed. *Angewandte Chemie International Edition* 40: 3585-3588.

Mukherjee P, Roy M , Mandal B, Dey G , Mukherjee P ,Ghatak J, Tyagi A , Kale S P. 2008. Green synthesis of highly stabilized nanocrystalline silver particles by a non-pathogenic and agriculturally important fungus *T. asperellum*. *Nanotechnology* 19: 7 pp.

Mukherjee P , Senapati S, Mandal D, Ahmad A, Khan M , Kumar R, Sastry M. 2002. Extracellular Synthesis of Gold Nanoparticles by the Fungus *Fusarium oxysporum*. *Chembiochem* 3: 461-463.

Musarrat J, Dwivedi S, Singh B , Al-Khedhairi A , Azam A, Naqvi A. 2010. Production of antimicrobial silver nanoparticles in water extracts of the fungus *Amylomyces rouxii* strain KSU-09. *Bioresource Technology* 101: 8772–8776.

Narayanan K, Sakthivel N. 2010. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. *Advances in Colloid and Interface Science* 156: 1–13.

Navazi Z, Pazouki M, Halek F. 2010. Investigation of culture conditions for biosynthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus fumigates*. *Iranian journal of biotechnology* 8: 56-61.

Nayak R , Pradhan N, Behera D, Pradhan K , Mishra S, Sukla L , Mishra B . 2011. Green synthesis of silver nanoparticles by *Penicillium purpurogenum* NPMF: the process and optimization. *Journal of Nanoparticles Research*. 13: 3129-3137.

Nithya R, Ragunathan R. 2009. Synthesis of silver nanoparticle using *Pleurotus sajor caju* and its antimicrobial study. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 4: 623 – 629.

Oh S, Lee S, Choi S, Lee I, Lee Y, Chun J, Park H. 2006. Synthesis of Ag and Ag-SiO₂ by γ -irradiation and their antibacterial and antifungal efficiency against *Salmonella enteric serovar Typhimurium* and *Botrytis cinerea*. *Colloids and Surface A: Physicochemical Engineering Aspects*. 275: 228-233.

Panacek A, Kvitek L, Pucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, Sharma V, Nevecna T, Zboril R. 2006. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J.Phys.Chem.B* 110:16248- 16253.

Paszczynski A, Pastigrigsby M, Goszczynski S, Crawford R, Crawford D. 1992. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3598-3604.

Pointing S. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57:20-33.

Reddy C y Z. Mathew. 2001. Bioremediation potential of white rot fungi. In. Gadd G. (Eds.) *Fungi in bioremediation*. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.

Rickman D, Luvall J, Shaw J, Mask P, Kissel D, Sullivan D. 1999. Precision agriculture: changing the face of farming. (www.ghcc.msfc.nasa.gov/precisionag).

Rodakiewicz-Nowak J. 2000. Phenols oxidizing enzymes in water-restricted media. *Topics in Catalysis* 11:419-434.

Rubilar O, Diez M, Gianfreda L. 2008. Transformation of chlorinated phenolic compounds by White rot fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 38:227-268.

Rubilar O, Feijoo G, Diez C, Lu-Chau T, Moreira M, Lema J. 2007. Biodegradation of pentachlorophenol in soil slurry cultures by *Bjerkandera adusta* and *Anthracoxyllum discolor*. Industrial and Engineering Chemistry Research. 46: 6744-6751.

Sadowski Z, Maliszewska I H, Grochowalska B, Polowczyk I, Kozlecki T. 2008. Synthesis of silver nanoparticles using microorganisms. Materials Science-Poland. 26: 419-424.

Sanghi R, Verma P. 2009a Biomimetic synthesis and characterization of protein capped silver nanoparticles. Bioresource Technology 100:501-504.

Sanghi R, Verma P. 2009b. A facile green extracellular biosynthesis of CdS nanoparticles by immobilized fungus. Chemical Engineering Journal. 155: 886–891.

Sanghi R, Verma P, Puri S. 2011. Enzymatic formation of gold nanoparticles using *Phanerochaete chrysosporium*. Advances in Chemical Engineering and Science. 1: 154-162.

Saravanan M, Nanda A. 2010. Extracellular synthesis of silver bionanoparticles from *Aspergillus clavatus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. Colloids and surfaces B: Biointerfaces 77: 214-218.

Sawle B, Salimath B, Deshpande R, Bedre M, Prabhakar B, Venkataraman A. 2008. Biosynthesis and stabilization of Au and Au–Ag alloy nanoparticles by fungus, *Fusarium semitectum*. Science and Technology of Advanced Materials 035012: 6pp.

Simón de Dios, Díaz-García M. 2010. Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects. Analytica Chimica Acta 666: 1–22.

Senapati S, Ahmad A, Khan M , Sastry M, Kumar R. 2005. Extracellular biosynthesis of bimetallic Au-Ag alloy nanoparticles. Small 1: 517-520.

Shaligram N , Bule M, Bhambure R, Singhal R , Singh S , Szakacs G, Pandey A. 2009. Biosynthesis of silver nanoparticles using aqueous extract from the compactin producing fungal strain. Process Biochemistry 44: 939–943.

Sondi I y Salopek-Sondi B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. J.Colloid Interface Sci. 275:177-182.

Sozer N, Kokini, J. 2004. Nanotechnology and its applications in the food sector. Cell press. Trends in Biotechnology 27: 82-89.

Thakkar, K.N., Snehit, M.S., Mhatre, S., Rasesh M.S., Parikh, M.S. (2010) Biological synthesis of metallic nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 6: 257–262

Tortella G, Diez M, Duran N. 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Critical Reviews in Microbiology* 31:197-212.

Tortella G, Rubilar O, Gianfreda L., Valenzuela E., Diez M. (2008). Enzymatic characterization of Chilean native wood-rotting fungi for potential use in the bioremediation of polluted environments with chlorophenols. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 2805-2818.

Tuor U, Wariishi H, Schoemaker, M Gold. 1992. Oxidation of phenolic arylglycerol beta-aryl ether lignin model compounds by manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* - oxidative cleavage of an alpha-carbonyl model-compound. *Biochemistry* 31:4986-4995.

Vigneshwaran N, Ashtaputre N M, Varadarajan P V, Nachane R P, Paralikar K M, Balasubramanya R H. 2007. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Materials letters*. 61: 1413-1418.

Vigneshwaran N, Kathe A, Varadarajan P, Nachane R, Balasubramanya R. 2006. Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.53: 55–59.

Wang C, Xi J, Hu H, Wen X. 2008. Biodegradation of Gaseous Chlorobenzene by White-rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Biomedical and Environmental Sciences*.21: 474–478

Yoon K, Byeon J, Park J, Hi J, Bae G, Hwang J. 2008. Antimicrobial Characteristics of Silver Aerosol Nanoparticles against *Bacillus subtilis* Bioaerosols. *Environmental Engineering Science* 25:289-294.

Zhang X, Yan S, Tyagi R, Surampalli R. 2011. Synthesis of nanoparticles by microorganisms and their application in enhancing microbiological reaction rates. *Chemosphere*. 82: 489–494

9. ANEXOS

Anexo 1. Tabla peso fresco y peso seco para biomasa de la cepa fúngica *A. discolor*.

Muestras(biomasa)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
1	6,0	0,62
2	5,1	0,43
3	3,8	0,48
4	2,8	0,51
5	3,8	0,61
6	4,9	0,60
7	5,1	0,56
8	4,9	0,65
9	5,9	0,72
10	3,3	0,58
11	6,0	0,64
12	5,3	0,98

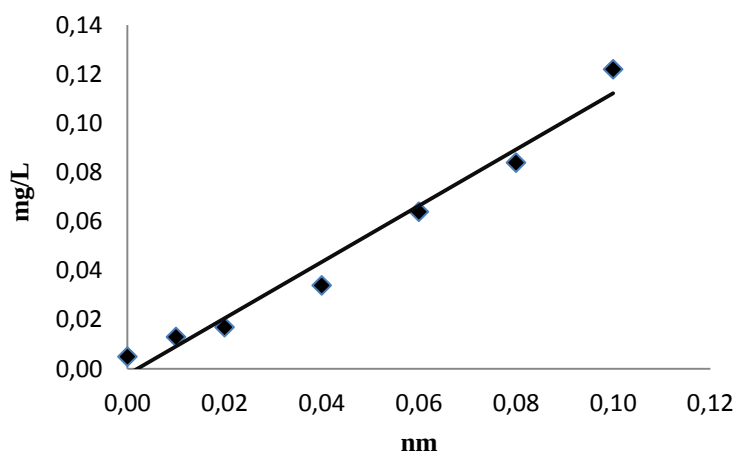
Anexo 2. Tabla de pH inicial y pH ajustado correspondiente al extracto libre de micelio (ELM) obtenido de la cepa *A. discolor*

Muestras (ELM)	pH inicial	pH ajustado
1	6.6	5.0
2	6.7	5.0
3	7.2	6.0
4	7.1	6.0
5	7.2	7.0
6	7.2	7.0
7	7.2	8.0
8	7.4	8.0
9	7.4	9.0
10	7.4	9.0
11	7.4	10
12	7.5	10

Anexo 3. Concentraciones utilizadas para realizar la curva de calibración de proteínas

mg/L	0,00	0,01	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1
nm	0,005	0,013	0,017	0,034	0,064	0,084	0,122

Curva de calibracion para proteinas


Anexo 4. Tabla determinación de proteínas en medio de cultivo para la cepa *A.discolor*

Tiempo(d)	Muestra1		Muestra 2		Muestra 3		Promedio	Desvest
	Abs	mg/mL	Abs	mg/mL	Abs	mg/mL		
0	0,01	0,107	0,029	0,273	0,014	0,142	0,17	0,0875
3	0,02	0,194	0,041	0,378	0,02	0,194	0,26	0,1062
6	0,034	0,317	0,036	0,334	0,004	0,055	0,24	0,1564
8	0,031	0,291	0,015	0,151	0,017	0,168	0,20	0,0763
14	0,078	0,701	0,062	0,561	0,051	0,465	0,58	0,1186

Anexo 5. Tabla Actividad enzimática de Lacasa (Lac), Manganese peroxidasa (MnP), Manganese independiente (MiP), Lignina peroxidasa (LiP) para la cepa *A.discolor*

Tiempo(d)	Lac (U L-1)	MnP (U L-1)	MiP (U L-1)	LiP (U L-1)
0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0,0	0,1	0,0	0,0
5	0,0	0,8	0,3	5,0
7	5,4	20,7	0,0	0,7
12	0,0	21,5	0,0	0,3

Anexo 6. Cambio de coloración para la biosíntesis de nanopartículas plata por el hongo de pudrición blanca *A. discolor* en medio con (a) 1 mM, (b) 3mM y (c) 5mM de AgNO_3 por 72 h de reacción a diferentes condiciones de pH en la solución de reacción. Imagen (I) pH 5, imagen (II) pH 6, imagen (III) pH 7, imagen (IV) pH 8, imagen (V) pH 9 y imagen (VI) pH

