

## MICOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA, SU CARACTERIZACIÓN Y SU ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA FRENTE AL FITOPATÓGENO *BOTRYTIS CINEREA*

Martín A. Fernández-Baldo, Jorge G. Fernández, Matías Regiart, Sirley V. Pereira, María I. Sanz, Julio Raba

INQUISAL, Departamento de Química. Universidad Nacional de San Luis, CONICET.  
Chacabuco 917. D5700BWS. San Luis, Argentina.  
E-mail: mbaldo@unsl.edu.ar

### Introducción

*Botrytis cinerea* es un hongo fitopatógeno que causa la podredumbre gris, una enfermedad de postcosecha que afecta una amplia variedad de frutas [1]. Además, el crecimiento de este hongo es difícil controlar, debido a que ha desarrollado resistencia a muchos fungicidas efectivos utilizados para su control [2]. Para vencer esta resistencia, es importante investigar nuevos agentes antifúngicos, que puedan sustituir a las estrategias actuales de control. Recientes trabajos indican que la síntesis biológica, en particular micosíntesis de nanopartículas de plata (Ag NPs), es confiable, respetuosa del medio ambiente y han recibido una atención especial debido a sus propiedades antimicrobianas [3,4].

El objetivo del presente trabajo fue sintetizar extracelularmente Ag NPs a partir de *Aspergillus niger*, caracterizar las mismas y evaluar su actividad antifúngica contra el fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

### Metodología

Se inoculó 100 mL de *A. niger* NRRL 1419 ( $2 \times 10^6$  esporas mL<sup>-1</sup>) en un medio líquido que contenía 2,0 NaNO<sub>3</sub>; 0,1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O; 0,5 KCl; 3,0 sacarosa; 0,03 estreptomycin (g L<sup>-1</sup>) y se lo incubó a 28±1 °C con agitación orbital a 100 rpm. Luego de 72 h de incubación, la biomasa fúngica se filtró a través de un papel de filtro Whatmann N°1 y se lavó con agua destilada. A continuación, 20 g de biomasa fúngica se transfirió a un Erlenmeyer que contenía 150 mL de agua destilada y se incubó durante 72 h (28±1 °C, 100 rpm). Posteriormente, la biomasa se filtró nuevamente, al filtrado se le adicionó 100 mL de AgNO<sub>3</sub> (1mM) y se lo incubó por 72 h (28±1 °C, 100rpm) en oscuridad. El filtrado de la biomasa (sin el agregado de AgNO<sub>3</sub>) y el AgNO<sub>3</sub> en solución se utilizaron como controles negativos y positivos respectivamente. Posteriormente, las Ag NPs sintetizadas fueron caracterizadas por espectrofotometría UV-visible y por microscopía electrónica de transmisión (MET). Además, se determinó la presencia de la enzima nitrato reductasa obtenida a partir del filtrado de la biomasa de *A. niger* siguiendo el procedimiento propuesto por Harley [5] y Saifuddin [6]. Para esto, 5 mL de alícuotas del filtrado se mezclaron con 5 mL de medio de ensayo (30 mM KNO<sub>3</sub> y 5% propanol en tampón fosfato, 0,1 M, pH 7,5) y se lo incubó en oscuridad durante 1 h. Luego de la incubación, los nitritos formados se estimaron mediante la adición de 2,5 mL de sulfanilamida y N-etileno (1-naftil)-diamina dihidrocloruro. El color desarrollado se midió en un espectrofotómetro UV-vis. La actividad de la enzima se expresó finalmente en nmoles de nitrito h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup>. Finalmente, la actividad antifúngica de las Ag NPs fue evaluada por inhibición del crecimiento de *B. cinerea* BNM 0527 en placas de cultivo Agar-Papa-Dextrosa. Para esto, se sembraron 200 µL del fitopatógeno a una concentración de 10<sup>6</sup> esporas mL<sup>-1</sup>,

posteriormente se practicaron orificios de 3x3 mm de diámetro y se adicionaron a los mismos 60  $\mu$ L de Ag NPs, el control negativo y el positivo, respectivamente. Luego, las placas se incubaron a  $28\pm 1$   $^{\circ}$ C durante 7 días y finalmente, se midieron los halos de inhibición expresando los resultados en mm.

## Resultados

El objetivo principal del presente trabajo fue la producción, caracterización y aplicación de una nueva estrategia para obtener Ag NPs por síntesis biológica. Estas Ag NPs fueron aplicadas al control de *B. cinerea*. La biosíntesis de Ag NPs se realizó a partir de una cepa pura de *A. niger* (NRRL 1419). Esta cepa de *A. niger* se cultivó y se obtuvo el filtrado del hongo, el cual se lo incubó a continuación con  $\text{AgNO}_3$  apareciendo un color marrón oscuro, mientras que los frascos que contenían los controles permanecieron sin cambios durante el período de incubación de 72 h. El color marrón oscuro, luego de la síntesis, indica la presencia de Ag NPs, las cuales fueron confirmadas por espectrofotometría mostrando una banda de absorción alrededor de los 440 nm para la cepa de *A. niger* estudiada (Figura 1). Además, las Ag NPs fueron caracterizadas por MET, mostrando una distribución de tamaños de  $40\pm 20$  nm (Figura 2).

Figura 1

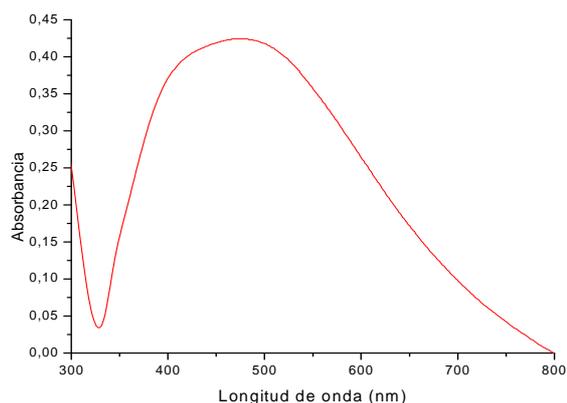
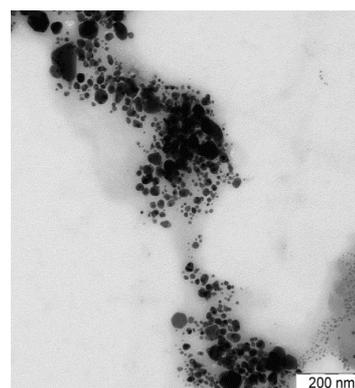


Figura 2



La actividad de nitrato reductasa desde el filtrado de *A. niger* fue medida por la prueba de nitrato reductasa, donde su concentración fue de  $267 \text{ nmol h}^{-1}\text{mL}^{-1}$ , lo que confirma el mecanismo de síntesis fúngica propuesto por Durán et al. (2010). Las Ag NPs biosintetizadas ocasionaron halos de inhibición en el crecimiento de *B. cinerea* "in vitro" después de 7 días de incubación. Los diámetros obtenidos fueron de  $14,6\pm 0,24$  mm para las Ag NPs y de  $7,55\pm 0,31$  mm para el control positivo. El control negativo no presentó halos de inhibición.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que las Ag NPs sintetizadas por *A. niger* presentaron actividad antifúngica frente a *B. cinerea* en ensayos in-vitro, demostrando que podría ser utilizado como un eficaz fungicida frente a este peligroso fitopatógeno. Por otra parte, se deberán realizar más estudios para investigar la viabilidad de la incorporación de estas nanopartículas en films, papeles y otros materiales de embalaje de frutas, lo cual puede ser de gran interés para la industria frutícola.

## **Referencias**

- [1] Sansone G, Rezza I, Calvente V, Benuzzi, D, Sanz MI. Postharvest Biology and Technology, 2005, 35, 245-251.
- [2] Elad Y, Yunis H, Katan T. Plant Pathol, 1992, 41, 41-46.
- [3] Bawaskar M, Gaikwad S, Ingle A, Rathod D, Gade A, Durán N, Marcato PD, Rai M. Current Nanoscience, 2010, 6, 376-380.
- [4] Durán N, Marcato PD, Ingle A, Gade A, Rai M. Fungi-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles: Characterization Processes and Applications. In: Progress in Mycology, Rai M e Kovics G (Eds). Ch 16. Springer, Heidelberg, 2010, pp 425-449.
- [5] Harley, SM. Am Biol Teacher, 1993, 55, 161-164.
- [6] Saifuddin N, Wong CW, Nur Yasumira AA. E-J Chem, 2009, 6, 61-70.