

BIOSÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA A PARTIR DE BIOMASAS FÚNGICAS AISLADAS DE DESECHOS MINEROS

Bustos, Daniela^a; Hidalgo, Natalia^a; Allendes, Jorge^b; Senese, Ana^a; García, Laura^{c,d}; Castro, Inés^a

^a. Instituto de Investigaciones Mineras, FI, UNSJ, Av. Libertador Oeste 1109, J5400ARL San Juan, Argentina

^b. Instituto de Ciencias Básicas, FI, UNSJ, Av. Libertador Oeste 1109, J5400ARL San Juan, Argentina

^c. Instituto de Ciencias Astronómicas, de la Tierra y el Espacio, FCEFYN-UNSJ, CONICET, Av. España Sur 1512, J5402DSP, San Juan, Argentina

^d. Instituto de Mecánica Aplicada, FI, UNSJ, Av. Libertador Oeste 1109, J5402DSP San Juan, Argentina



RESUMEN

La nanotecnología es disciplina en rápido crecimiento que se ocupa de la síntesis y el desarrollo de diversos nanomateriales. En la actualidad, se están preparando varios tipos de nanomateriales metálicos como cobre, zinc, titanio, magnesio, oro y plata. Diversas investigaciones han recurrido al uso de sistemas biológicos para la síntesis de nanopartículas como alternativa a métodos químicos y físicos, ya que varios microorganismos son bien conocidos por producir materiales inorgánicos ya sea de manera intra o extracelular. En este estudio se biosintetizaron AgNPs utilizando biomasa muerta y seca de los hongos *Talaromyces amestolkiae* y *Penicillium cluniae* aislados de desechos mineros. Para ello se suspendió 1gr de biomasa inerte de cada hongo en 20 mL de una solución de AgNO_3 0,1 M, con agitación a 100 rpm y 40 °C durante 3 días, tomando muestras a las 48 y 72hs. Las muestras se analizaron por espectrofotometría UV-visible (300-600nm) y EDS-SEM. Se observó una banda de plasmón con un máximo de absorbancia a 450 nm para *Penicillium cluniae* y un plasmón menor a 460nm para *Talaromyces amestolkiae*, con una amplitud entre los 420-470 nm, lo que confirma la obtención de las nanopartículas de plata y el poder reductor de la biomasa fúngica. Los resultados de EDS-SEM confirmaron la presencia de AgNPs retenidas dentro de la biomasa y en su superficie, por lo que el método de biosíntesis fiable y económico utilizado en este trabajo resulta prometedor frente a la posibilidad de darle una utilización a hongos aislados de desechos de la industria minera.

OBJETIVO

En este estudio se biosintetizaron AgNPs utilizando biomasa muerta y seca de los hongos *Talaromyces amestolkiae* y *Penicillium cluniae* aislados de desechos mineros, e identificar la presencia de las nanopartículas de plata mediante análisis de espectrofotometría UV-visible y microscopía electrónica de barrido.

METODOLOGÍA

Obtención de biomasa fúngica

Los hongos utilizados en este trabajo fueron aislados a partir de las pilas de lixiviación de la Mina Hualilán (San Juan) y conservados por los autores del trabajo Hidalgo, N., 2020.

Para la generación de biomasa, en primer lugar, se inoculó la cepa en medio líquido en estufa de cultivo a una temperatura de 28°C hasta su máximo crecimiento desarrollado en un tiempo total de 15 días. El medio de cultivo utilizado fue Sabouraud Glucosado caldo a volúmenes crecientes. Como el objetivo es generar una biomasa inerte, una vez que la cepa llegó a su máximo desarrollo, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Después se procedió a lavar la biomasa repetidamente con agua destilada y por último se secó en estufa a 80° C hasta peso constante.

Biosíntesis de nanopartículas de plata

Para la síntesis de NP utilizando biomasa de los hongos *Talaromyces amestolkiae* y *Penicillium cluniae*, se suspendió 1gr de cada biomasa en 20 mL de una solución de AgNO_3 0,1 M, pH 7,5, con agitación a 100 rpm y 40°C durante 3 días, tomando muestras a las 48 y 72hs. De manera paralela se llevó a cabo un control de cada hongo, suspendiendo 1gr de cada biomasa en 20 mL de agua destilada.

Medición por espectrometría UV-visible

La biotransformación de los iones de plata se monitoreó mediante la medición del espectro UV-visible del medio de reacción. Se tomaron 3 mL de sobrenadante después de 48 y 72 hs y se analizaron por espectrofotometría UV-visible mediante Espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Lab Wrench, Canadá) en la longitud de onda que va de 300 a 600 nm.

Microscopía electrónica de barrido

Las AgNPs se identificaron y caracterizaron mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM, por sus siglas en inglés: Scanning Electron Microscope) EVO MA 10W de la compañía Carl Zeiss. El mismo tiene acoplado un cabezal para la obtención de imágenes de electrones retrodispersados (BSE, por sus siglas en inglés: Backscattered Electrons) y un sistema de microanálisis por espectroscopía de rayos X dispersiva en energía (EDS, por sus siglas en inglés: Energy Dispersive Spectrometry). El mismo se encuentra instalado en el Instituto de Investigaciones Mineras de la Universidad Nacional de San Juan.

Para su análisis, la biomasa se montó en portamuestras individuales y se recubrió con un depósito de oro para lograr muestras conductoras y evitar la acumulación de carga en su superficie luego de la interacción del haz de electrones con éstas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La disposición experimental para la obtención de las biomasas fúngicas se evidencia en la figura 1. En el cultivo de ambos microorganismos se obtuvo el mayor crecimiento fúngico a los 12 días, siendo mayor para el género *Talaromyces amestolkiae*.

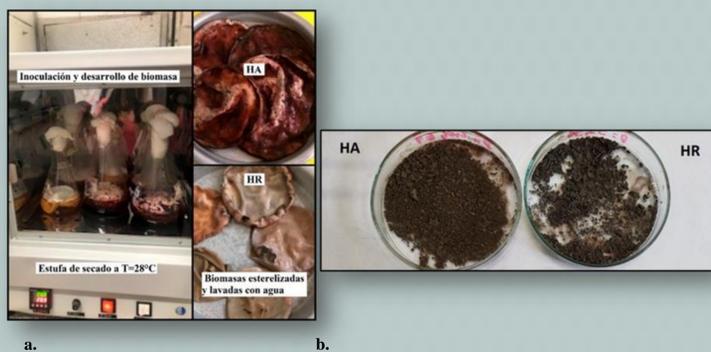


Figura 1. a. Generación de Biomasa, b. biomasa seca. Donde HA= *Talaromyces amestolkiae* y HR= *Penicillium cluniae*.

A continuación, se presentan los resultados de la medición de la absorbancia por espectrometría UV-visible de las muestras líquidas tomadas a las 48 y 72 horas en la longitud de onda que va de 300 a 600 nm.

REFERENCIAS

- AbdelRahim, K, Younis Mahmond, S., Mohamed Ali, A., Salmeeen Almaary, K., Mustafa, A and Moussa, S. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. Saudi Journal of Biological Sciences 24, 208–216 (2017).
- Salvadori, M., Rómulo, A., Oller Nascimento and C., Correa, B. Extra and Intracellular Synthesis of Nickel Oxide Nanoparticles Mediated by Dead Fungal Biomass. PLoS ONE 10(6): e0129799. (2015).
- Priyabrata M., Ahmad, A. Mandal, D., Senapati, S., Sainkar, S. Khan, M., Parisheha, R., Ajaykumar, P., Alam, M., Kumar, R. and Sastry, M. NANO LETTERS Vol. 1, No. 10, 515–519 (2001).
- Rodrigues, A., Ping, L. Y., Marcato, P., Alves, O., Silva, M., Ruiz, R., Melo, I., Tasic, L. and De Souza, A. Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. Appl Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s00253-012-4209-7 (2012).
- Hidalgo, N., Mamani, A., Mestre, A., Fernández, P., Bustos, D. Biosorción de plomo por biomasa de origen fúngico aislada a partir de desechos mineros de la Mina Hualilán, Argentina. Serie Correlación Geológica, 36 (1-2): 39 – 52 (2020).

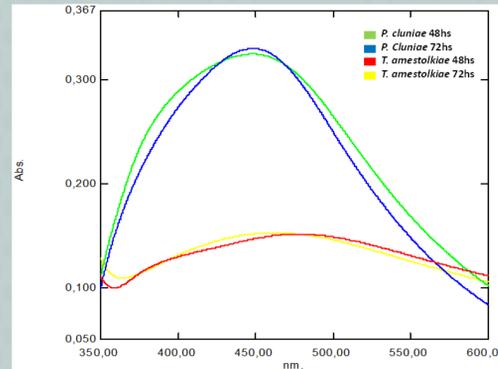


Figura 2. Análisis por espectrometría UV-visible.

Para las muestras analizadas de las dos biomasas, se pudo observar un plasmón con una amplitud entre los 420-470 nm (figura 2), lo que confirma la obtención de las nanopartículas de plata y el poder reductor de la biomasa fúngica inerte de ambos hongos. Se observó una banda de plasmón con una menor absorbancia para el hongo *Talaromyces amestolkiae*, con un pico máximo de 0,1526 a 460nm a las 72hs. De los resultados de microscopía electrónica, presentados luego en esta sección, la biomasa de este hongo es más porosa, por lo que las NPs podrían quedar retenidas dentro de la misma y disminuir la concentración en el sobrenadante.

Para el caso del hongo *Penicillium cluniae*, se observó una banda de plasmón con un máximo de absorbancia de 0,3248 a 450 nm luego de 72 horas. Similares resultados fueron obtenidos por Priyabrata A., et al. 2001.

Las imágenes de electrones retrodispersados presentadas en la figura 3, permiten distinguir las AgNPs por su alto peso atómico frente a la materia orgánica de la masa fúngica. En ambos casos, las imágenes de BSE se encuentran acompañadas por los espectros de rayos X resultantes de los análisis puntuales (indicados con un número de referencia en color verde en la figura 3) de EDS en las potenciales partículas. Si bien el haz de electrones forma una gota en su interacción con la materia, de un ancho del orden de los μm , la ausencia de otros metales en la muestra en combinación con su tamaño $< 1 \mu\text{m}$, permite identificar inequívocamente la presencia de AgNPs. Las nanopartículas se encontraron tanto en la superficie como en el interior de la masa fúngica.

La figura 3a corresponde a las células fúngicas tras su exposición a una solución acuosa de AgNO_3 0,1 M durante 72 hs (a la izquierda biomasa del hongo *Penicillium cluniae* y a la derecha biomasa del hongo *Talaromyces amestolkiae*). En la figura 3b se aprecia claramente la naturaleza altamente filamentosa del micelio del hongo *Talaromyces amestolkiae* y en la figura 3d el micelio compacto del hongo *Penicillium cluniae*. Se observa la presencia de nanopartículas de plata distribuidas en la superficie y en el interior de la biomasa fúngica, lo que indica que las nanopartículas formadas por la reducción de iones Ag^+ están unidas a la superficie de las células.

Las nanopartículas de plata que se observan fuera de los micelios podrían ser el resultado de una unión débil en combinación con un desprendimiento sufrido durante el montaje de la muestra para su estudio mediante SEM.

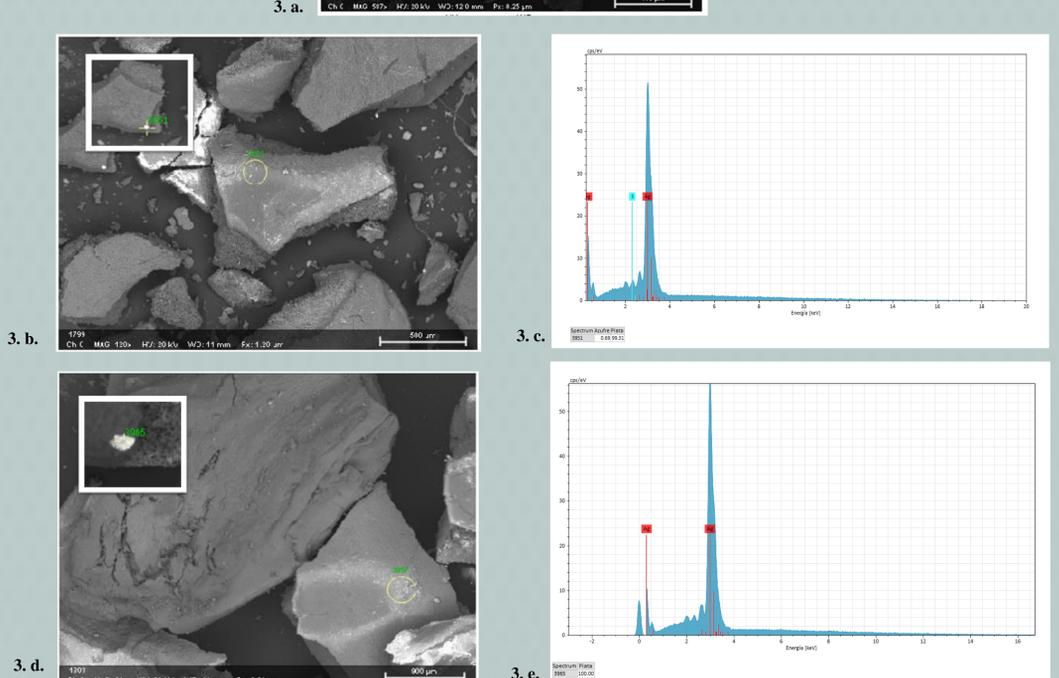


Figura 3. Imágenes de BSE sobre las potenciales AgNPs, las que se distinguen por su mayor intensidad, y análisis EDS efectuados, los cuales son señalados con una referencia numérica en color verde. a. A la izquierda biomasa del hongo *Penicillium cluniae* y a la derecha biomasa del hongo *Talaromyces amestolkiae*. b. Detalle de la figura a (mayor magnificación), donde se distingue con mayor facilidad la presencia de una AgNP. c. Análisis EDS de la AgNP señalada en a y b. d. AgNP sobre la superficie de la biomasa de *Penicillium cluniae*. e. Análisis EDS de la AgNP señalada en d.

En el desarrollo de la metodología propuesta para ampliar el alcance de los microorganismos en la síntesis de nanomateriales, se puede apreciar que los hongos *Talaromyces amestolkiae* y *Penicillium cluniae*, cuando se exponen a una solución acuosa de AgNO_3 , provocan la reducción de los iones metálicos y la formación de nanopartículas. Las nanopartículas de plata se forman sobre la superficie de las células fúngicas del hongo *Penicillium cluniae* y en la superficie y dentro de la biomasa en el hongo *Talaromyces amestolkiae*.

CONCLUSIONES

En conclusión, se ha demostrado en el siguiente trabajo la biorreducción de iones Ag^+ acuosos por los hongos *Talaromyces amestolkiae* y *Penicillium cluniae*. La reducción de los iones metálicos se produce en la superficie y dentro del micelio, lo que conduce a la formación de nanopartículas de plata de dimensiones bastante bien definidas. Este enfoque de Química Verde mediada por biomasa inerte de hongos aislados de desechos mineros para la biosíntesis de nanopartículas de plata tiene muchas ventajas como ser un proceso ecoamigable, facilidad con la que se puede ampliar la escala del proceso, la viabilidad económica, como así también la posibilidad de cubrir fácilmente grandes superficies mediante el crecimiento del micelio.