

Universidad de Concepción
Campus Los Ángeles
Departamento de Ciencias y Tecnología Vegetal



Biosíntesis y optimización de nanopartículas de plata a partir del hongo endófito *Penicillium melinii* y su potencial biológico

PROYECTO DE TÍTULO PARA OPTAR AL
TÍTULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGÍA VEGETAL.

Christopher Alejandro Medina Muñoz

Los Ángeles-Chile

2026

“Biosíntesis y optimización de nanopartículas de plata a partir del hongo endófito *Penicillium melinii* y su potencial biológico”.

Alumno

Christopher Alejandro Medina Muñoz
Ingeniería en Biotecnología Vegetal

Profesor Guía

Dr. Daniel Eduardo Chávez Matamala
Profesor Asociado
Ingeniero Forestal

Jefe de Carrera

Pedro Quiroz Hernández
Profesor instructor
Ingeniero (E) Forestal

Director de Departamento

Dr. Mauricio J. Rondanelli Reyes
Profesor Asociado
Biólogo.

Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecer a mi mamá Marlen Muñoz Bascuñán, por estar siempre presente, en los días buenos y malos, gracias por su perseverancia y apoyo incondicional no sería capaz de haber llegado a este punto de mi vida, por enseñarme que las cosas tienen solución y que todo es a su tiempo, y si las cosas no resultan, tan solo se deben ver desde otra perspectiva. A mi hermana Loreto, a mis dos primas Camila y Natalia que son como mis hermanas, a mis abuelos Inés e Idolio, les agradezco por su cariño, por estar ahí animándome desde lejos y confiar en mí, en que podía lograrlo pese a las dificultades.

A mi profesor guía Dr. Daniel Chávez, por fomentar mi interés en el área de los hongos, por todas sus enseñanzas, paciencia, apoyo y oportunidades que me ha brindado para mi desarrollo como persona y como profesional, y gracias por recibirme en LIMAB.

Agradezco al Ingeniero Christian Deramond por su infinita paciencia en enseñarme y explicarme una y otra vez, y ser un apoyo durante este proceso, además de convertirse en un gran amigo.

Agradezco a Fernanda por creer en mí, por estar presente durante este trayecto y por hacer más alegres mis días. Agradecer a mis amigos, que se cruzaron en este camino, Ana Sol, Carolina y Sebastián por hacer más ameno los días y hacer la Universidad una experiencia agradable, con sus chistes y darme un sitio donde pertenecer, aceptarme y escucharme, por los días en que almorzábamos, junto a un buen café y ver a Carlos Pinto.

Por último, he aprendido que todo se vuelve una enseñanza, aunque no sea agradable, el fracaso es tan solo la otra cara del aprendizaje, cuando ya no somos capaces de cambiar una situación, tenemos el desafío de cambiarnos a nosotros mismos y confiar en la decisión que se tomó ante esa circunstancia, sin olvidar de dónde venimos.

Índice

1	Introducción	1
2	Marco teórico	3
2.1	Nanopartículas:.....	3
2.2	Métodos de síntesis de nanopartículas de plata	4
2.3	Mecanismos de síntesis de nanopartículas de plata	5
2.4	Hongos endófitos	6
2.5	<i>Penicillium melinii</i>	7
2.6	Optimización de nanopartículas	8
2.7	Actividad antifúngica	10
3	Hipótesis.....	12
4	Objetivos.....	12
4.1	Objetivo general.....	12
4.2	Objetivos específicos	12
5	Materiales y métodos.....	13
5.1	Cepa fúngica	13
5.2	Preparación del extracto fúngico.....	13
5.3	Síntesis de NPAg.....	13
5.4	Optimización de la síntesis de NPAg basada en diseño Box-Behnken	14
5.5	Caracterización de las NPAg	16
5.5.1	Espectrofotometría de absorbancia UV-Visible	16
5.5.2	Microscopia electrónica de transmitancia (MET).....	16
5.5.3	Dispersión dinámica de luz (DDL) y potencial Z.....	16
5.6	Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).....	16
5.7	Ensayo antifúngico	17
6	Resultados.....	18
6.1	Biosíntesis y caracterización de NPAg.....	18
6.2	Análisis estadístico y validación del modelo de regresión	21
6.3	Gráficos de respuesta 3D	27
6.4	Análisis HR-MET	30
6.5	DLS y potencial Z	31

6.6	Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	31
6.7	Ensayo antifúngico	33
7	Discusión	35
8	Conclusión	42

Índice de figuras

Fig. 1.	Representación tridimensional del DBB con distribución de los valores de absorbancia en función de las tres variables para identificar las regiones del espacio experimental con las mayores respuestas.	14
Fig. 2.	(a) Espectrofotometría UV/Vis de NPAg sintetizadas a partir del caldo de fermentación de <i>P. melinii</i> , con absorción máxima a 420nm, (b) Histograma de distribución de tamaño, (c) Análisis MET. Barra: 50nm.....	19
Fig. 3.	Observación visual de los caldos de fermentación de <i>P.melinii</i> utilizados en la síntesis de NPAg. (A) Estado inicial a 0 h tras la adición de una solución de AgNO ₃ . (B) Cambio de color tras 3 h de reacción; la aparición de diferentes tonalidades evidencia la reducción de los iones de plata y la formación de nanopartículas. Las variaciones en la intensidad y el matiz se atribuyen a la RPS, lo que sugiere diferencias en la concentración, el tamaño y el estado de dispersión de las NPAg sintetizadas bajo las condiciones del extracto.	20
Fig. 4.	Espectrofotometría UV/Vis de NPAg sintetizadas a partir del caldo de fermentación de <i>P. melinii</i> , con absorción máxima a 425nm, para cada uno de los tratamientos.....	21
Fig. 5.	Graficas de superficie de respuesta 3D que muestran los efectos de temperatura, concentración de AgNO ₃ y pH mediante absorbancia. Se optimizaron tres pares de parámetros, manteniendo el otro parámetro constante en un punto central: (a) concentración de AgNO ₃ y pH, temperatura en el punto central; (b) concentración y temperatura, pH en el punto central; y (c) pH y temperatura, concentración en el punto central.....	29
Fig. 6.	Imágenes HR-TEM de NPAg sintetizadas bajo condiciones optimizadas a partir de los caldos de fermentación de <i>P. melinii</i>	30

Fig. 7. Histograma de distribución de tamaño de NPAg utilizando caldo de fermentación de <i>P. melinii</i> producido bajo condiciones optimizadas.	31
Fig. 8. Análisis FTIR de NPAg sintetizadas a partir del caldo de fermentación de <i>P. melinii</i>	32
Fig. 9. Evaluación del crecimiento micelial de <i>P. cinnamomi</i> en medio PDA suplementado con NPAg a concentraciones de 50 y 100 µg/mL.	33
Fig. 10. Evaluación del crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> en medio PDA suplementado con NPAg a concentraciones de 50 y 100 µg/mL.	34
Fig. 11. Efecto de diferentes concentraciones de NPAg sobre la biomasa micelial (peso seco) de <i>P. cinnamomi</i> y <i>B. cinerea</i> . Los valores corresponden al promedio de tres réplicas independientes ± la desviación estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas según el Test de Tukey (p<0,05).	35

Índice de tablas

Tabla 1: Rangos y niveles de los factores utilizados en el diseño Box-Behnken	15
Tabla 2: DBB de tres niveles para tres variables (pH, temperatura y concentración de nitrato de plata) con respuesta de absorbancia (unidades de absorbancia) a 425nm en triplicado.	22
Tabla 3: Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático de superficie de respuesta del DBB para la optimización de síntesis de NPAg.	23
Tabla 4: Resultados del ANOVA de regresión para el modelo cuadrático, incluyendo R ² , R ² ajustado, R ² predicho y precisión adecuada	24
Tabla 5: Coeficientes estimados del modelo de regresión cuadrático para la absorbancia	25
Tabla 6: Comparación entre valores experimentales y predichos de la absorbancia obtenidos a partir del modelo cuadrático ajustado.	27

Lista de abreviaturas

Abs: absorbancia.

AgNO₃: Nitrato de plata.

DBB: Diseño Box Behnken.

DDL: Dispersión dinámica de la luz.

FTIR: Espectroscopia de infrarrojos por transformadora de Fourier.

HE: Hongo endófitos.

HR-MET: Microscopía electrónica de transmitancia de alta definición.

Ln: Logaritmo natural.

MET: Microscopía electrónica de transmitancia.

mg: miligramos.

mL: mililitros.

mM: Milimolar.

MSR: Metodología de superficie de respuesta.

Nm: Nanómetro.

NP: Nanopartículas.

NPAg: Nanopartículas de plata.

PD: Papa dextrosa

PDA: Agar papa dextrosa

RPS: Resonancia plasmón superficial.

u.a: Unidades de absorbancia.

UV: Ultravioleta.

mV: Milivoltios.

Resumen

La nanotecnología ofrece aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, electrónica y agrícola, destacando la síntesis biológica de nanopartículas de plata como alternativa sustentable frente métodos físicos y químicos, donde el uso de extractos de plantas y microorganismos ha sido estudiado exitosamente. En este estudio se evaluó la capacidad del hongo endófito *Penicillium melinii*, aislado previamente de raíces de *Araucaria araucana*, para sintetizar nanopartículas de plata utilizando el caldo de fermentación libre de células como agente reductor tras 3 h de reacción. La formación de nanopartículas se confirmó mediante espectrofotometría UV/Vis, con un pico característico entre 410 y 450 nm. La optimización del proceso de síntesis, realizada mediante metodología de superficie de respuesta con diseño Box-Behnken orientado a maximizar la absorbancia como indicador de la concentración relativa de nanopartículas, indicó que el pH 11, concentración 5mM de AgNO_3 y temperatura de 45°C maximizan la absorbancia, con un modelo estadísticamente significativo ($p=0,0001$) y un coeficiente de determinación $R^2= 0,9713$ y se destaca el pH como el factor más influyente. El análisis por Microscopía Electrónica de Transmitancia (MET) reveló nanopartículas esféricas de aproximadamente 9 nm, mientras que el análisis por Espectroscopia de Infrarrojos con Transformadora de Fourier (FTIR) sugirió la participación de fenoles, terpenos y flavonoides en la reducción y estabilización de las nanopartículas. Los resultados del método de Dispersión Dinámica de la Luz (DDL) y Potencial Z mostraron que tienen un tamaño hidrodinámico promedio de 142,1 nm y una carga eléctrica de -9,46 mV. Asimismo, los ensayos antifúngicos evidenciaron una reducción en la biomasa de hongos fitopatógenos de hasta el 30,2% para *Phytophthora cinnamomi* y de hasta un 41,5% para *Botrytis cinerea*. Estos hallazgos demuestran el alto potencial de *P. melinii* para la síntesis biogénica de nanopartículas de plata (NPAg), evidenciando la eficacia del diseño estadístico en la optimización de parámetros críticos y destacando su aplicabilidad biotecnológica en el control de microorganismos fitopatógenos.

Abstract

Nanotechnology offers applications in the pharmaceutical, cosmetic, electronic, and agricultural industries, with biological synthesis of silver nanoparticles standing out as a sustainable alternative to traditional physical and chemical methods, where the use of plant extracts and microorganisms has been successfully studied. This study evaluated the ability of the endophytic fungus *Penicillium melinii*, previously isolated from the roots of *Araucaria araucana*, to synthesize silver nanoparticles using cell-free fermentation broth as a reducing agent after 3h of reaction. Nanoparticle formation was confirmed by UV/Vis spectrophotometry, showing a characteristic peak between 410-450 nm. Optimization of the synthesis process, performed through response Surface methodology with a Box-Behnken design aimed at maximizing absorbance as an indicator of relative nanoparticle concentration, revealed that pH 11, 5 mM AgNO₃, and a determination coefficient R² 0,9713, highlighting pH as the most influential factor. The Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis revealed spherical nanoparticles of approximately 9 nm, while Fourier Transform Infrared (FTIR) analysis suggested the involvement of such as phenols, terpenes, and flavonoids in reduction and stabilization. The Dynamic Light Scattering (DLS) and Zeta potential analysis revealed an average hydrodynamic size of 142,1 nm and an electrical charge of -9,46 mV. Likewise, antifungal assays evidenced a reduction in the biomass of phytopathogenic fungi of up 30,2% for *Phytophthora cinnamomic* and up to 41,5% for *Botrytis cinerea*. These findings demonstrate the high potential of *P. melinii* for the biogenic synthesis of AgNP, evidencing the efficacy of the statistical design in the optimization of critical parameters and highlighting its biotechnological applicability in the control of phytopathogenic microorganism.

1 Introducción

La nanotecnología es un campo multidisciplinario que combina ciencia y tecnología, con numerosas aplicaciones en las industrias química, mecánica, alimentaria, cosmética y farmacéutica (Andrade et al. 2024; Gunasekaran et al. 2025). Esta disciplina permite la creación de materiales a escala nanométrica, empleadas en dispositivos ópticos, catalizadores, agentes antimicrobianos, en tecnología eléctrica y sensores, así como marcadores biológicos, terapias oncológicas, tratamientos de agua, fertilizantes y pesticidas (Asif et al. 2022; Malik et al. 2024; Abd et al. 2025).

Existen diferentes métodos para sintetizar nanopartículas (NP), como físicos, químicos y biológicos, sin embargo, la síntesis biológica ha llamado el interés este último tiempo al presentar ventajas sobre los otros métodos al ser su naturaleza más rápida, sencilla, económica y ecológica (Malik et al. 2022; Oliveira et al. 2025). La síntesis biológica de NP emplea especies vegetales y microorganismos como hongos, bacterias y algas como agentes reductores y estabilizantes (Plokhovska et al. 2025), donde las nanopartículas metálicas suelen ser objeto de estudio por sus propiedades químicas y electromagnéticas (Hosny et al. 2025). Entre los diferentes tipos de NP, las nanopartículas de plata (NPAg) son preferidas por sus aplicaciones en los campos de la tecnología y la electrónica, pero especialmente en la industria de la medicina y farmacéutica (Khan et al. 2023).

En la última década, los microorganismos como bacterias, hongos, virus y parásitos han desarrollado la capacidad de sobrevivir y proliferar en presencia de antibióticos y fungicidas, habiendo sido en un principio efectivos contra ellos (Tang et al. 2023). Esta resistencia creciente se ha convertido en un problema en gran parte por el uso indiscriminado de agentes antimicrobianos (Chinemerem Nwobodo et al. 2022; Gimranov et al. 2025). Los hongos fitopatógenos representan una de las principales amenazas para la producción de cultivos, ya que son responsables del 83% de las enfermedades y reducen anualmente el rendimiento entre el 10 y 15%, sumado a la disminución de la calidad del cultivo (Peng et al. 2021; Sadvakasova et al. 2025), por lo que la aparición de cepas resistentes a fungicidas ha impulsado la búsqueda

de nuevas soluciones ante esta problemática. En particular, las NP metálicas, como las de plata (NPAg), han sido ampliamente estudiadas por su fuerte actividad antibacteriana y antifúngica, emergiendo como alternativa para el control de estos microorganismos (Naganthran et al. 2022; Murugaiyan et al. 2022; Pradhan et al. 2025). Sin embargo, uno de los principales desafíos en estos procesos radica en la variabilidad de las condiciones experimentales y su impacto directo sobre las propiedades fisicoquímicas de las NP obtenidas. Factores como el pH del medio, la temperatura de reacción, concentración de precursores, tiempo de reacción, entre otros, influyen de manera significativa en parámetros críticos que determinan la eficacia final de las NP sintetizadas (Abu-Elghait et al. 2025).

De esta manera, surge la necesidad de implementar estrategias de optimización que permitan estandarizar y controlar estos procesos de manera sistemática. Optimizar la síntesis no solo permite maximizar el rendimiento, sino también obtener NP más homogéneas, estables y funcionalmente más efectivas (Dikshit et al. 2021; Sedighi et al. 2025).

Frente a esta problemática, el uso de herramientas estadísticas como la metodología de superficie de respuesta (MSR) resulta particularmente útil, ya que permite modelar la relación entre uno o más factores independientes y la predicción de una variable de respuesta (Cardoso et al. 2025). Entre los diseños utilizados en la MSR, el diseño Box-Behnken (DBB) destaca por su eficiencia al requerir un número reducido de experimentos para construir modelos predictivos, facilitando la identificación de condiciones óptimas del proceso. Esto lo convierte en una herramienta valiosa, especialmente en la síntesis de NP donde permite optimizar parámetros de manera rentable, rápida y con menor consumo de recursos (Salari 2022; Wirwis & Sadowski 2023; Hoseini-Nilaki et al. 2025).

Por lo anteriormente expuesto, el presente estudio busca sintetizar y optimizar NPAg obtenidas a partir de *P. melinii* mediante la metodología de superficie de respuesta con diseño Box Behnken con el fin de determinar su rendimiento y evaluar su actividad antifúngica.

2 Marco teórico

2.1 Nanopartículas:

Las nanopartículas (NP) son estructuras con dimensiones entre 1 a 100 nm, exhiben diversas características fisicoquímicas y estructurales, tales como tamaño, forma, carga superficial, estabilidad y una alta relación superficie /volumen, atribuido a su escala nanométrica (Selim et al. 2025).

Las NP pueden clasificarse en metálicas y no metálicas. Las metálicas suelen fabricarse a partir de metales como oro, plata, cobre, materiales magnéticos y semiconductores, mientras que las no metálicas se sintetizan principalmente a partir de compuestos basados en carbono (Alharbi et al. 2022; Plokhovska et al. 2025).

Entre las NP metálicas, las de plata (NPAg) reciben especial atención por sus propiedades optoelectrónicas impulsadas por el fenómeno de resonancia de plasmón superficial (RPS), estabilidad y versatilidad en el tamaño y forma (Hoseini-Nilaki et al. 2025). Estas NP son empleadas en el área de la salud, en la agricultura y en procesos industriales y, en biorremediación, dado que exhiben propiedades antibacterianas, antifúngicas, anticancerígenas, anticoagulantes, antioxidantes, antiinflamatorias, actividades catalíticas, fotocatalíticas, purificadoras del agua y de estabilidad química (Seetharaman et al. 2021; Saeed Al-Zahrani & Mohammed Al-Garni 2023; El deeb et al. 2025; Hosny et al. 2025). También son utilizadas en aplicaciones como marcaje fluorescente, detección de ADN/ARN mediante sondas específicas y biosensores usados en dispositivos de diagnóstico biomédico y poseen aplicación en la agricultura como nanofertilizantes y nanopesticidas (Dadayya et al. 2025). Todo esto, sumado a su bajo costo frente a otros metales nobles como el oro y el platino, y a la facilidad con que pueden sintetizarse, las convierte en NP de gran interés.

2.2 Métodos de síntesis de nanopartículas de plata

Existen diferentes técnicas para sintetizar NP, pudiendo ser clasificadas en dos categorías generales, el método *top-down* y *bottom-up*. Los métodos *top-down* son técnicas donde los materiales a granel son reducidos en unidades más pequeñas hasta obtener nanoestructuras, ya sea mediante fuerzas mecánicas como trituración, molienda; fuerzas eléctricas como descarga de arco eléctrico o ablación láser; y fuerzas térmicas como evaporación- condensación (Hosny et al. 2025). Por otro lado, los métodos *bottom-up* son métodos químicos o biológicos que construyen NP a partir de la unión de átomos o moléculas por autoensamblaje (Shahzadi et al. 2025). En el método de reducción química, diversos agentes orgánicos e inorgánicos han sido empleados para la reducción de iones plata, entre los más utilizados se encuentran el polietilenglicol, citrato de sodio, N,N-dimetilformamida, ascorbato y el borohidruro de sodio, hidrógeno elemental, poliol e hidrato de hidrazina. Como estabilizadores se han utilizado el alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona y carboximetilcelulosa (Mustapha et al. 2022; Malik et al. 2022; Gouda et al. 2025; de Oliveira et al. 2025). Por otra parte, en el método de síntesis biológica, se utiliza un agente biológico reductor como extractos de plantas, bacterias, levaduras, algas y hongos (Jana et al. 2025). Con frecuencia, los diversos componentes celulares actúan como estabilizadores y agentes de recubrimiento externo, eliminando la necesidad de agentes externos con el mismo propósito.

Pese a que existen diferentes métodos para sintetizar NP_{Ag}, la síntesis biológica de NP_{Ag} se presenta como una alternativa prometedora frente a los métodos físicos y químicos tradicionales, que, aunque tienen ciertas ventajas, también presentan limitaciones. Los métodos físicos ofrecen una ventaja de producción rápida sin necesidad de reactivos nocivos, pero presentan inconvenientes como la contaminación por disolventes, una distribución no uniforme de las NP, un bajo rendimiento y un alto consumo energético (Mustapha et al. 2022). Por otro lado, los métodos químicos, aunque permiten una producción de NP en grandes cantidades y en corto periodo de tiempo, son tóxicos y generan subproductos no ecológicos, además, requiere pasos adicionales para evitar su agregación y garantizar una distribución uniforme (Ragavi et al. 2025). Así mismo, en ciertos casos, algunas

sustancias pueden adherirse a las NP obtenidas, lo que las hace poco adecuadas para aplicaciones biológicas (Dheyab et al. 2025; Nosrati et al. 2025).

En contraste, la síntesis biológica es sostenible y minimiza el impacto ambiental asociado a los métodos físicos y químicos, es rentable dado que no necesita de condiciones extremas de temperatura o presión, ni utiliza sustancias peligrosas dado que aprovecha la capacidad de los organismos para actuar como agentes reductores y estabilizantes de NP (Oliveira et al. 2025). Los metabolitos producidos por estos organismos contienen grupos funcionales como éter, tiol, carbonilo, hidroxilo, amina y poliamina, así como proteínas y péptidos que actúan como agentes reductores y/o estabilizadores durante la formación de las NP (Ribeiro et al. 2023; Mutlag et al. 2025). De esta manera, el mecanismo de acción se relaciona con la donación de electrones por estos grupos que conducen a la nucleación y al crecimiento de las NPAg (Hosny et al. 2025). Así, los metabolitos secundarios secretados por hongos endófitos, por ejemplo, pueden reducir los iones plata para generar nanopartículas (Nongthombam et al. 2024; Selim et al. 2025; Dadayya et al. 2025; Sun et al. 2025).

2.3 Mecanismos de síntesis de nanopartículas de plata

El uso de hongos en la síntesis biológica de NP metálicas ofrece ventajas significativas, tanto por su capacidad de bioacumulación y tolerancia a metales como por su viabilidad económica (Hodhod et al. 2024), derivada de la alta producción de biomasa y la facilidad de escalamiento (Abd Elghaffar et al. 2024; Răut et al. 2024; Jangid & Kumar 2025). Además, la secreción de enzimas extracelulares permite la formación de recubrimientos, generalmente proteicos que estabilizan las NP e igualmente pueden contribuir a mejorar su actividad biológica (Ribeiro et al. 2023; Sun et al. 2025).

La formación de NP mediante hongos puede desarrollarse a través de rutas extracelulares o intracelulares (El deeb et al. 2025). En el mecanismo extracelular, los iones metálicos interactúan con metabolitos y enzimas secretados al medio, así como proteínas asociadas a la pared celular. Estas proteínas cargadas negativamente por presencia de grupos carboxílicos y grupos amina, actúan en

conjunto como agentes reductores y estabilizantes (Santos et al. 2021; Kong et al. 2025). En este proceso participan metabolitos secundarios (como griseofulvina, mevastatina, lovastatina y ciclosporina) junto con enzimas tales como reductasas dependientes de NADH y NADPH, ACCasas y peroxidasas, además de coenzimas, naftoquinonas y antraquinonas. Todos ellos contribuyen a la transferencia de electrones necesaria para la reducción de Ag^+ a Ag^0 (Mikhailova 2020; Qamar & Ahmad 2021; Gupta et al. 2024; Andrade et al. 2024; Selim et al. 2025; Selvam et al. 2025). Sin embargo, la composición específica de las moléculas involucradas y la ruta metabólica predominante varían entre especies fúngicas, ya que cada microorganismo posee un conjunto propio de enzimas y metabolitos capaces de interactuar de forma diferencial con los iones metálicos (Santos et al. 2021).

Por otro lado, en el mecanismo intracelular los precursores metálicos se incorporan al medio de cultivo y los iones metálicos penetran en la biomasa fúngica mediante transportes iónicos específicos (Dheyab et al. 2025). Una vez en la superficie celular, los iones con carga positiva se unen a grupos funcionales cargados negativamente en la pared celular, donde son transformados en NP y posteriormente difundidas a través de la misma (Al-khattaf 2021). En ambos mecanismos, el factor determinante es la acción de las enzimas fúngicas, que no solo catalizan la reducción de los iones metálicos, sino que también favorecen la estabilización de las NP mediante interacciones electrostáticas (Selim et al. 2025).

2.4 Hongos endófitos

Los hongos endófitos (HE) son microorganismos que colonizan los tejidos internos de las plantas como tallos, flores, frutos y raíces de manera intracelular o extracelular, sin provocar un daño aparente (Gao et al. 2025). Estos microorganismos desempeñan múltiples funciones, entre las que destacan la mitigación del estrés biótico y abiótico, la biorremediación, la actividad antimicrobiana y la producción de pigmentos y enzimas. Asimismo, participan en el control biológico de fitopatógenos y en el ciclo de nutrientes (Díaz-Valenzuela et al. 2024; Elfadil et al. 2025; Li et al. 2025).

Los HE constituyen, además, una fuente diversa de metabolitos bioactivos (alcaloides, flavonoides, fenoles, esteroides, entre otros) con propiedades distintivas que pueden aprovecharse para mejorar procesos de síntesis en diversas aplicaciones (Kumar et al. 2024), entre ellas la síntesis de NP (Faiq et al. 2025). Estos microorganismos poseen un potencial biotecnológico, no solo por la producción y secreción de metabolitos secundarios, y la obtención de extractos fúngicos, sino también por la capacidad de su biomasa de acumular metales y tolerar condiciones adversas. Estas características los hacen muy adecuados para la síntesis verde de NPAg (Kathija et al. 2024; et al. 2025). En comparación con otros organismos, los HE ofrecen múltiples ventajas para la síntesis de diferentes tipos de NP, ya que presentan una alta adaptabilidad a distintas condiciones de cultivo, rápido crecimiento y una elevada secreción de metabolitos y enzimas extracelulares capaces de reducir enzimáticamente iones metálicos y acumularlos tanto intracelular como extracelularmente en su micelio (Meena et al. 2021; Khan et al. 2025; Radhakrishnan et al. 2025).

Las NP sintetizadas por HE han demostrado una amplia gama de aplicaciones, que incluyen actividades con potencial oncológico y médico, su incorporación en textiles hospitalarios y dispositivos biomédicos, así como su contribución al desarrollo de prácticas agrícolas más sostenible (de Oliveira et al. 2025). Así, se ha reportado la síntesis exitosa de NPAg a partir de diversos HE, tales como *Chaetomium globosum* (Sun et al. 2025); *Corynespora smithii* (Chandra et al. 2025), *Calonectria eucalypti* (Lv et al. 2025); *Talaromyces pinophilus*, *Aspergillus fructus*, *Stemphylium gracilariae*, *Purpureocillium lilacicum*, *Microascus croci*, *Penicillium toxicarium*, *Exophiala mesophila* y *Emericellopsis marítima* (Oliveira et al. 2025), entre otros.

2.5 *Penicillium melinii*

Penicillium es un género compuesto por más de 200 especies de hongos, conocido principalmente por ser fuente de antibióticos (Toghueo & Boyom 2020; Salvatore et al. 2024). Las especies de este género han despertado un gran interés, ya que se ha registrado la producción de alcaloides, policétidos, terpenoides, lactonas y esteroides (Lindsay et al. 2023; Lv & Zeng 2024). En particular, las especies

endófitas de *Penicillium* han sido caracterizadas como promotoras del crecimiento vegetal, biorremediadores y productores de enzimas. Además, destacan por la producción de numerosos compuestos con actividades antimicrobianas, anticancerígenas, antifúngicas, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias, antiparasitarias, inmunodepresoras, antidiabéticas, neuroprotectoras, insecticidas y de biocontrol (Zhang et al. 2022; Hu & Qin 2025). Esto le confiere gran relevancia en la industria agrícola, biotecnológica y farmacéutica.

Así mismo, diversos autores han reportado la capacidad de especies del género, como *P. oxalicum* (Gupta et al. 2022); *P. solitum* (Shah et al. 2023); *P. citrinum* (Gharieb et al. 2023); *P. brasilianum* (Rudrappa et al. 2023) o *P. camemberti* (Kaur et al. 2024) para sintetizar NP metálicas con fines antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes, antiinflamatorios y oncológicos.

Penicillium melinii es un hongo endófito que ha demostrado múltiples actividades biológicas, incluyendo efectos antimaláricos, antileucémicos y antimicrobianos al ser aislado de *Vinca rosea* (Metwaly et al. 2019). También se ha reportado su fuerte actividad antifúngica y antioxidante al ser aislado de *Zingiber officinale* (Borrego et al. 2025). Por otro lado, la cepa yuan-25 de *P. melinii* se aisló la ginsenocina, un metabolito con actividad antitumoral (Ran & Li 2021). Además, el aislado usado en el presente estudio, al ser aislado desde la raíz de *Araucaria araucana* mostró la capacidad de producir ácido indolacético (AIA) y solubilizar fosfato (Díaz-Valenzuela et al. 2024). De manera complementaria, *P. melinii* puede incrementar la producción de biomasa en *Aeluropus littoralis* mediante la producción de auxinas, metabolitos nitrogenados y brasinoesteroides, actuando como bioestimulantes (Mohammadi & Stanghellini 2024), lo que refuerza la importancia de esta especie como fuente de compuestos bioactivos.

2.6 Optimización de nanopartículas

La síntesis de NP puede verse influenciada por diversos factores fisicoquímicos que determinan sus propiedades finales, como el tamaño, forma, estabilidad y la actividad biológica (Abu-Elghait et al. 2025). Entre las variables más relevantes se encuentran la temperatura, el pH, la concentración de sales metálicas, la proporción

del filtrado utilizado como agente reductor, así como el tiempo de reacción y la exposición a la luz (Andrade et al. 2024; Salem et al. 2024; Rasheed et al. 2025; Hosny et al. 2025).

En los procesos de optimización, el enfoque de un factor a la vez (OFAT, por sus siglas en inglés: One Factor At Time) se ha empleado para ajustar las condiciones de síntesis de NP. Este método consiste en variar un solo parámetro experimental mientras se mantienen las demás constantes, buscando optimizar cada variable de forma aislada. Sin embargo, este diseño presenta limitaciones, ya que requiere un mayor número de ensayos, lo que lleva a un incremento del tiempo, el costo económico y el esfuerzo experimental. En contraste, los métodos estadísticos de diseño de experimentos permiten evaluar simultáneamente los efectos principales y las interacciones entre múltiples variables independientes (Tedjani et al. 2024). Esto no solo reduce el número de ensayos, sino que también proporciona el entendimiento del comportamiento del sistema, facilitando la optimización de los factores más influyentes (Tavares Luiz et al. 2021; Zhou et al. 2025).

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es una herramienta estadística ampliamente utilizada para modelar y optimizar procesos donde varias variables independientes afectan una o más respuestas, donde se ajustan modelos usualmente polinómicos de segundo orden a partir de datos experimentales, permitiendo predecir el comportamiento del sistema dentro del rango estudiado y determinar las condiciones óptimas (Cao et al. 2021; Alam et al. 2025). En la síntesis de NP, la MSR se ha empleado para optimizar parámetros como el rendimiento o el tamaño. La calidad del modelo se evalúa a través de análisis de varianzas (ANOVA), que proporciona métricas como el valor-p, la falta de ajuste y el coeficiente de determinación (R^2), asegurando que el modelo sea estadísticamente significativo y predictivo (Mohammadpour et al. 2023; Tedjani et al. 2024; Salem et al. 2024; Abu-Elghait et al. 2025).

Entre los diseños experimentales utilizados en MSR destaca el diseño Box-Behnken (DBB), propuesto por Box y Behnken en 1960. Este diseño es especialmente eficiente para explorar modelos cuadráticos, dado que requiere un

número reducido de ejecuciones experimentales en comparación a los diseños de compuesto central (Tavares Luiz et al. 2021; Jamil et al. 2025).

El DBB solo requiere tres niveles para cada factor (-1, 0 y +1), lo que simplifica la planificación experimental y reducción de costos. Además, los puntos del diseño se distribuyen de manera esférica y rotatoria alrededor del centro, ubicándose en los centros de las aristas del cubo factorial, evitando así las combinaciones extremas de factores que podrían ser no viables (Delzo-Salomé et al. 2021; Saddik et al. 2026; Abdollahi et al. 2026). De este modo, el empleo del DBB no solo permite identificar las condiciones óptimas para maximizar o minimizar las respuestas de interés, sino que también facilita la comprensión de las relaciones entre los factores involucrados en el proceso (Chin et al. 2025). Este modelo se ha utilizado exitosamente para optimizar procesos de síntesis de NP metálicas y óxidos, donde la interacción de los factores determina las propiedades deseadas (Subha et al. 2024; Jyolsna et al. 2025; Aguiar de Oliveira et al. 2025; Tamta et al. 2026; Xie et al. 2026).

2.7 Actividad antifúngica

Diversos estudios han demostrado que las NPAg biosintetizadas exhiben una actividad antifúngica significativa frente a fitopatógenos relevantes (Ribeiro et al. 2023; Sun et al. 2025; Abd-Elhamed et al. 2025; Shan et al. 2025). Aunque el mecanismo de acción no ha sido completamente esclarecido, se ha asociado a la inhibición del crecimiento micelial, la disrupción de paredes y membranas celulares, la desnaturalización de proteínas y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), además de la interferencia en el metabolismo energético, la transducción de señales y el procesamiento de la información genética (Kong et al. 2025; Jana et al. 2025).

Según Frippiat et al. (2025), la pared celular fúngica, compuesta principalmente de quitina, glucanos y proteínas, constituye un sitio vulnerable, ya que las NPAg pueden interactuar con polisacáridos y proteínas, comprometiendo su integridad

estructural. El daño oxidativo, aunque no uniforme en todas las especies, desempeña una función esencial al inducir peroxidación lipídica, desnaturalización proteica y fragmentación del ADN, afectando funciones celulares vitales. Adicionalmente, los cationes de plata ejercen efectos directos sobre los organelos y componentes celulares como mitocondrias, cromatina y ribosoma, inhibiendo procesos metabólicos. Finalmente, las NPAg interfieren con la actividad de enzimas para la síntesis de la pared celular, la producción de proteínas y la generación de energía, consolidando su acción antifúngica.

3 Hipótesis

1. A partir del caldo de fermentación del hongo endófito *P. melinii* es posible sintetizar nanopartículas de plata (NPAg) mediante un proceso biogénico y que pueden optimizarse a través de la metodología de superficie de respuesta (MSR).
2. Las NPAg sintetizadas y caracterizadas exhibirán actividad antifúngica frente a los agentes fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi*.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Sintetizar y optimizar NPAg obtenidas a partir de los caldos de fermentación de *P. melinii* mediante la metodología de superficie de respuesta (MSR) con diseño Box-Behnken (DBB) con el fin de determinar su rendimiento y propiedades y evaluar su actividad antifúngica contra fitopatógenos.

4.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar NPAg a partir del extracto del caldo de fermentación del hongo endófito *P. melinii*, mediante técnicas espectrofotométricas, de dispersión de luz y microscopia electrónica.
2. Optimizar los parámetros del proceso de síntesis de NPAg mediante MSR con DBB, evaluando la influencia de factores como concentración de nitrato de plata, pH y temperatura.
3. Evaluar la actividad antifúngica de las NPAg contra *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi* bajo condiciones *in vitro* por medio del ensayo de inhibición de crecimiento micelial en medio sólido.

5 Materiales y métodos

5.1 Cepa fúngica

Para la síntesis de NPAg se utilizó la cepa fúngica *P. melinii* (E-13), proveniente de la colección de cultivos de hongos del Laboratorio de Investigación de Micorrizas y Aplicaciones Biotecnológicas de Hongos (LIMAB), Universidad de Concepción, Campus Los Ángeles. *P. melinii* fue previamente aislado e identificado a partir de raíces de *Araucaria araucana* por (Chávez et al. 2023).

5.2 Preparación del extracto fúngico

La cepa se reactivó en medio agar papa dextrosa 1% m/v (PDA) a 24°C durante 7 días. La masificación del hongo se realizó empleando cuatro discos de agar/micelio (0,5 cm) en matraces Erlenmeyer de 1000 mL que contenían 500 mL de caldo de papa dextrosa 1% m/v (PD) y se incubó durante 9 días a 28°C en agitación a 150 rpm. La biomasa fúngica se separó del caldo de cultivo mediante filtración al vacío utilizando papel filtro Whatman n°1. Posteriormente, para asegurar la eliminación completa de células residuales, el filtrado se sometió a una segunda filtración con membranas de 0,45 µm al vacío, obteniéndose así un caldo de fermentación libre de células, destinado a los ensayos de síntesis de NP.

5.3 Síntesis de NPAg

El ensayo inicial de síntesis de NPAg se llevó a cabo mezclando 25 mL de una solución stock de nitrato de plata (AgNO_3) 1 mM grado analítico (Merck/Sigma-Aldrich, Macedonia) con 25 mL de caldo de fermentación libre de células (relación 1:1), de acuerdo con Barabadi et al. (2022). La mezcla se incubó en condiciones de oscuridad, con agitación a 120 rpm durante 3 h para favorecer la formación de NP. Como control negativo, se mantuvo un volumen igual de caldo de fermentación y agua desionizada (18 Ω) sin adición de AgNO_3 bajo las mismas condiciones y en triplicado. Las NP obtenidas se centrifugaron a 15.000 rpm y se lavaron tres veces con agua desionizada estéril bajo las mismas condiciones y se secaron durante 24 h a 45 °C, luego se almacenaron a 4 °C para posteriores análisis de caracterización fisicoquímicas.

5.4 Optimización de la síntesis de NPAg basada en diseño Box-Behnken

La optimización de los parámetros involucrados en la síntesis de NPAg se llevó a cabo mediante la MSR basado en un DBB, utilizando la versión de prueba del software Stat-Ease 360. Se analizó el efecto combinado de tres factores independientes: pH (X_1), temperatura de reacción (X_2) y concentración de AgNO_3 (X_3), con el objetivo de maximizar la absorbancia como cuantificación relativa asociada a la concentración de NPAg. La variable respuesta se midió a 425 nm y se expresó en unidades de absorbancia. Cada variable se consideró en tres niveles codificados (-1, 0 y +1), como se indica en la Tabla 1, que presenta los rangos y niveles empleados para cada factor, además de su representación tridimensional mostrada en la Fig. 1.

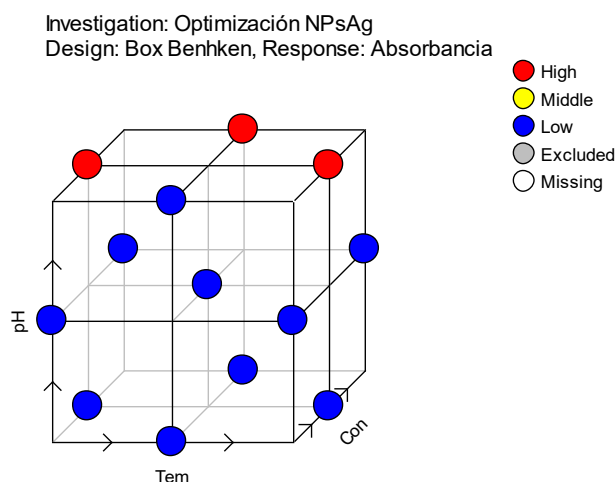


Fig. 1. Representación tridimensional del DBB con distribución de los valores de absorbancia en función de las tres variables para identificar las regiones del espacio experimental con las mayores respuestas.

El diseño experimental incluyó 15 corridas correspondientes al DBB para tres factores además de un control, y en triplicado. Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden, lo que permitió estimar los efectos lineales, cuadráticos e interactivos de las variables independientes, según la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3$$

Donde Y corresponde a la variable dependiente (absorbancia), X_1 , X_2 y X_3 son las variables independientes, β_0 es el coeficiente de regresión en el punto central, $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ son los coeficientes lineales, β_{12}, β_{13} y β_{23} son los coeficientes de interacción, y $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ los coeficientes cuadráticos.

Finalmente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la significancia estadística del modelo y de sus efectos, considerando factores como el valor p del modelo, asociado a cada termino.

Tabla 1: Rangos y niveles de los factores utilizados en el diseño Box-Behnken

Factores	Unidad de medida	Factores	Rangos y niveles		
			Bajo	Medio	Alto
			(-1)	(0)	(+1)
pH	pH	X_1	7	9	11
Temperatura	°C	X_2	30	45	60
Nitrato de plata	mM	X_3	1	3	5

5.5 Caracterización de las NPAg

5.5.1 Espectrofotometría de absorbancia UV-Visible

La confirmación de la síntesis de NPAg se realizó mediante un barrido espectral UV/Visible. Se realizó un barrido espectral en el espectrofotómetro Rayleigh UV-1601, en el rango de 350- 700 nm, con el objetivo de identificar la banda de resonancia de plasmón superficial (RPS) característico de las NPAg. El máximo de absorción obtenido se utilizó como indicador de la formación NP e indicador relativo de la concentración. Durante las mediciones, se empleó el filtrado fúngico sin adición de AgNO_3 como blanco.

5.5.2 Microscopia electrónica de transmitancia (MET)

La morfología y distribución del tamaño de las NPAg se determinaron mediante microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HR-MET), utilizando un equipo JEOL/JEM 2011 de 200 Kv (Laboratorio de microscopia electrónica, UdeC). El tamaño promedio de las NP y el histograma de distribución se obtuvieron a partir del análisis de las micrografías obtenidas mediante el software ImageJ, empleado para la medición de diámetros, y OriginPro 2025b (Learning Edition), utilizado para la elaboración de las gráficas correspondientes.

5.5.3 Dispersión dinámica de luz (DDL) y potencial Z

El diámetro hidrodinámico y la carga eléctrica superficial (potencial zeta) de las NPAg se evaluaron utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido) en el Laboratorio de Nanobiotecnología Ambiental de la Universidad de La Frontera (Temuco).

5.6 Análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)

Los grupos funcionales de las NPAg fueron identificados a través de FTIR utilizando muestras liofilizadas (Operon freeze dryer -55 °C) con un instrumento Cary 630 FTIR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) en el Laboratorio de Nanobiotecnología Ambiental de la Universidad de La Frontera (Temuco).

5.7 Ensayo antifúngico

La actividad antifúngica de las NPAg sintetizadas y optimizadas se evaluó siguiendo la metodología descrita por Jana et al. (2025), con modificaciones correspondientes. Para ello se utilizaron las cepas de hongos fitopatógenos: *Botrytis cinerea* y *Phytophthora cinnamomi* en triplicado.

El inóculo se obtuvo a partir de cultivos miceliales activos previamente incubados durante 7 días en medio PDA (2% m/v). Los ensayos se realizaron en placas Petri conteniendo el mismo medio al 1% m/v, suplementado con concentraciones de 50 µg/mL y 100 µg/mL de NPAg preparadas a partir de una solución stock de 1 mg/mL mediante diluciones. Como inóculo se colocó un fragmento micelial de 0,5 cm de diámetro en el centro de la placa. Las placas control contenían únicamente el hongo sin adición de NPAg.

Las placas inoculadas se incubaron a 22°C y el crecimiento radial del micelio se midió al séptimo día de iniciado el ensayo. La inhibición del crecimiento micelial (ICM%) se calculó en función del área de la colonia fúngica mediante la ecuación:

$$ICM(\%) = \frac{AC - AT}{AC} \times 100$$

Donde AC corresponde al área de la colonia en el control negativo y AT al área de la colonia tratada con las diferentes concentraciones de NPAg; los datos fueron obtenidos mediante ImageJ.

Además, se evaluó la biomasa micelial en peso seco, para ello el contenido de las placas se sometió a filtración al vacío utilizando papel filtro Whatman N°1 de peso conocido. El micelio retenido se lavó con agua destilada estéril caliente para eliminar restos del medio de cultivo. Posteriormente, las muestras se secaron en estufa a 60°C durante 48 h, hasta alcanzar peso constante. Se calculó el porcentaje de inhibición del peso micelial seco (IPM (%)) empleando la siguiente fórmula:

$$IPM(\%) = \frac{MN - MT}{MN} \times 100$$

Donde MN es el peso micelial seco del control negativo y MT al peso micelial seco obtenido en presencia de las diferentes concentraciones evaluadas.

Para el análisis de datos, se evaluó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante Test de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente, utilizando un nivel de significancia de $\alpha=0,05$. Una vez verificado los supuestos, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar la existencia de diferencias significativas entre tratamientos. Además, se realizó el Test de Tukey ($p<0,05$) para determinar la significancia entre las medias de los tratamientos y el control, permitiendo la agrupación de los resultados por letras de significancia. Los análisis estadísticos y generación de gráficos se realizaron utilizando el software OriginPro 2025b (Learning Edition).

6 Resultados

6.1 Biosíntesis y caracterización de NPAg

Previamente, se llevó a cabo la síntesis de NPAg para establecer las condiciones base para el posterior proceso de optimización. Estas NP se obtuvieron a una temperatura de 55°C, tras un tiempo de incubación de 3 h, se confirmó la síntesis con un pico de absorbancia a 420 nm (Fig. 2a), el análisis MET mostró que presentaban una morfología predominantemente esférica y de distribución monodispersa (Fig. 2b) y un tamaño promedio de 7,49 nm (Fig. 2c). Estas características indicaron una síntesis eficiente y estable de NP, sirviendo como punto de iniciación para el diseño experimental orientado a la optimización de los factores influyentes del proceso y maximizar la respuesta de absorbancia asociada a la producción de NPAg.

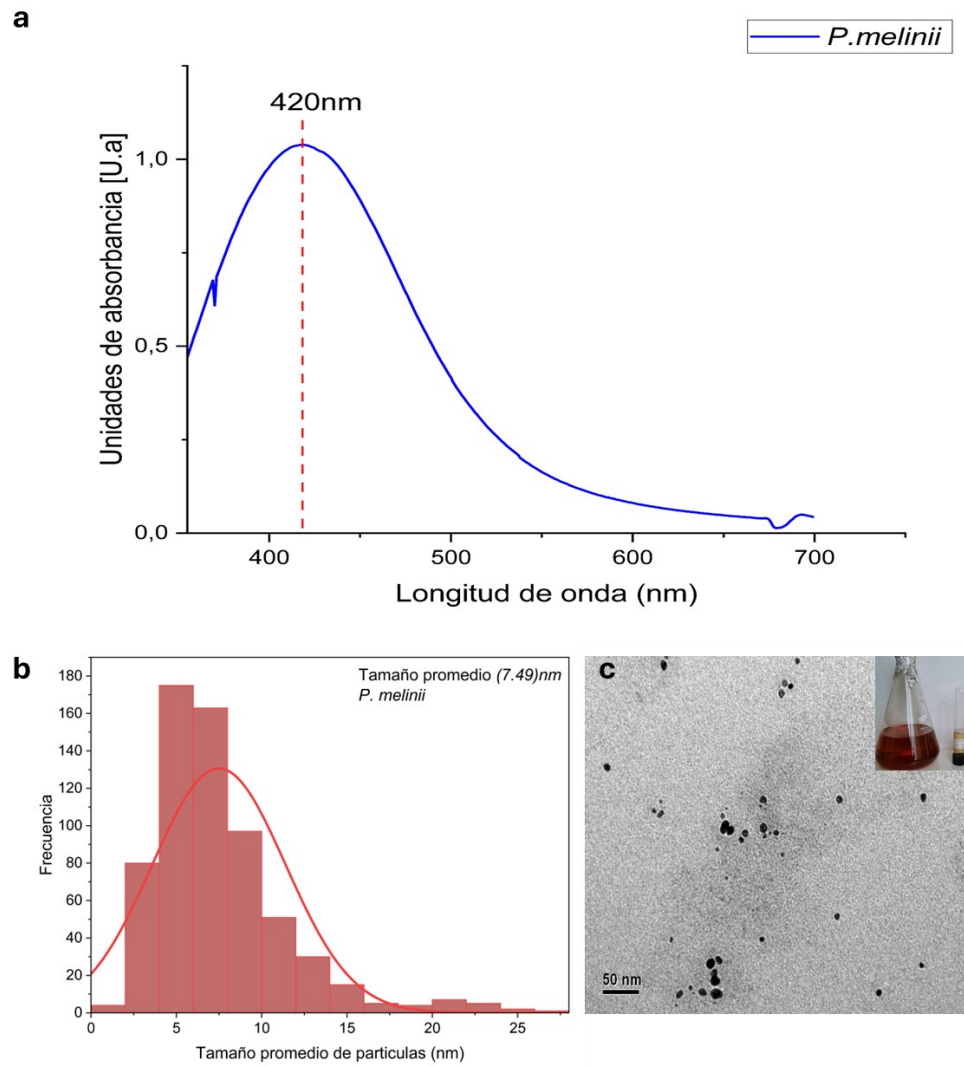


Fig. 2. (a) Espectrofotometría UV/Vis de NPAg sintetizadas a partir del caldo de fermentación de *P. melinii*, con absorción máxima a 420nm, (b) Histograma de distribución de tamaño, (c) Análisis MET. Barra: 50nm.

Luego para el ensayo de optimización, la formación de NPAg a partir del caldo de fermentación de *P. melinii* con adición de AgNO_3 se evidenció visualmente por el cambio de color de la solución, desde un amarillo a marrón rojizo al cabo de 3h de reacción, mientras que en el control no se observó alguna alteración para cada tratamiento (Fig. 3). Tras el tiempo de reacción, el análisis mediante espectrofotometría UV-Vis, confirmó la formación de NPAg, evidenciado por un pico de absorbancia UV/max a 425 nm, asociado a la RPS para cada uno de los ensayos (Fig. 4).

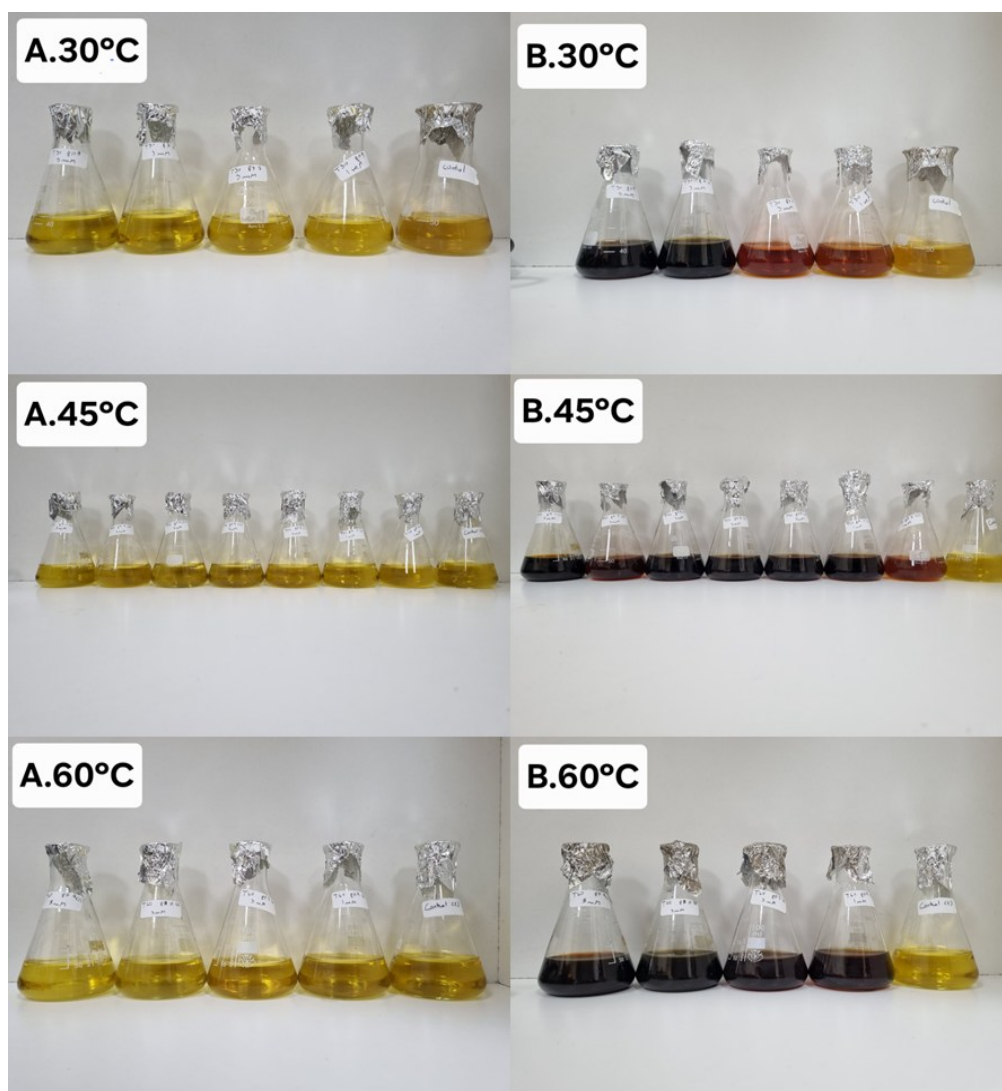


Fig. 3. Observación visual de los caldos de fermentación de *P.melinii* utilizados en la síntesis de NPAg. (A) Estado inicial a 0 h tras la adición de una solución de

AgNO₃. (B) Cambio de color tras 3 h de reacción; la aparición de diferentes tonalidades evidencia la reducción de los iones de plata y la formación de nanopartículas. Las variaciones en la intensidad y el matiz se atribuyen a la RPS, lo que sugiere diferencias en la concentración, el tamaño y el estado de dispersión de las NPAg sintetizadas bajo las condiciones del extracto.

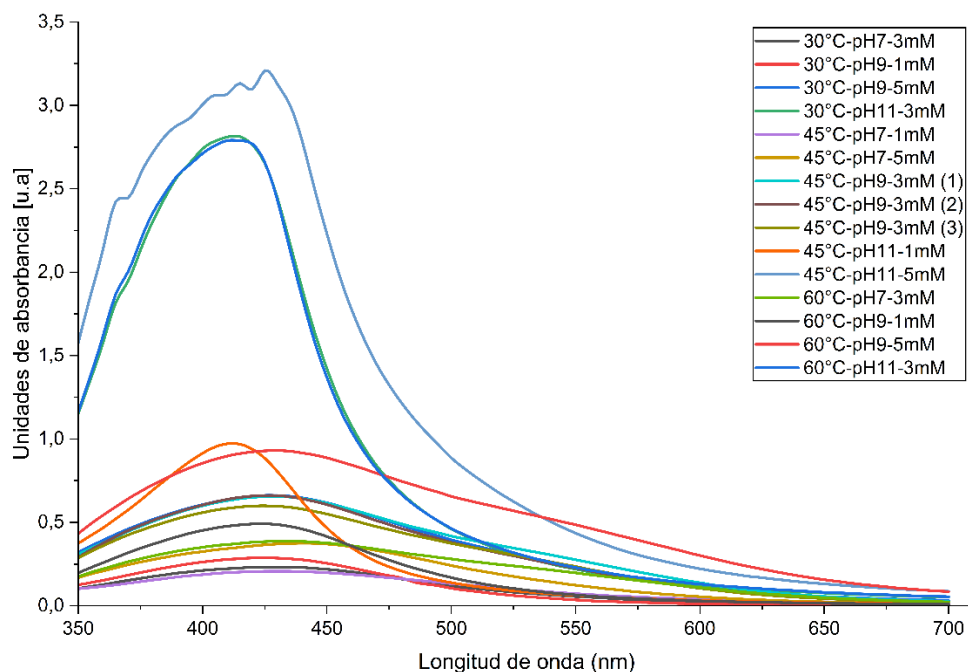


Fig. 4. Espectrofotometría UV/Vis de NPAg sintetizadas a partir del caldo de fermentación de *P. melinii*, con absorción máxima a 425nm, para cada uno de los tratamientos.

6.2 Análisis estadístico y validación del modelo de regresión

Se empleó MSR con DBB para evaluar el efecto combinado de tres factores: pH (7-11), temperatura (30-60 °C) y concentración de AgNO₃ (1-5 mM) sobre la máxima absorbancia de las NPAg. La matriz experimental generada por el modelo constó de 15 ensayos, cada uno de los cuales se realizó en triplicado. Además, se incluyó un control compuesto por caldo de fermentación y agua desionizada. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: DBB de tres niveles para tres factores (pH, temperatura y concentración de AgNO_3) con respuesta de absorbancia (unidades de absorbancia) a 425nm en triplicado.

Ensayo	pH	Temperatura (°C)	Nitrato de plata (mM)	Absorbancia 425nm (u.a)		
				I	II	III
1	7	30	3	0,269	0,257	0,170
2	9	30	1	0,369	0,272	0,221
3	9	30	5	0,770	0,584	0,631
4	11	30	3	2,720	2,651	2,587
5	7	45	1	0,193	0,199	0,228
6	7	45	5	0,487	0,339	0,270
7	9	45	3	0,810	0,646	0,684
8	9	45	3	0,535	0,741	0,56
9	9	45	3	0,622	0,599	0,555
10	11	45	1	0,924	0,838	0,890
11	11	45	5	3,154	3,110	3,365
12	7	60	3	0,410	0,378	0,366
13	9	60	1	0,531	0,494	0,45
14	9	60	5	0,836	1,021	0,931
15	11	60	3	2.702	2,665	2,606

La Tabla 3 presenta el ANOVA del modelo cuadrático de superficie de respuesta. El modelo resultó altamente significativo ($p < 0,0001$), confirmando una relación estadísticamente confiable entre las variables independientes y de respuesta. Todos los factores principales (pH, temperatura y concentración de nitrato de plata), así como la mayoría de las interacciones y términos cuadráticos, mostraron efectos significativos sobre la síntesis de NPAg. De manera complementaria, el valor elevado del estadístico de Fisher ($F=169,09$) evidenció la significancia estadística del modelo y demostró que la mayor parte de la variabilidad observada en la respuesta puede ser explicada mediante la ecuación de regresión propuesta.

Tabla 3: Análisis de varianza (ANOVA) para el modelo cuadrático de superficie de respuesta del DBB para la optimización de síntesis de NPAg.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	Valor-F	Valor-P	
Modelo	31,31	7	4,47	169,09	<0,0001	Significativo
X ₁ -pH	24,29	1	24,29	918,26	<0,0001	
X ₂ - Temperatura	0,7639	1	0,7639	28,88	<0,0001	
X ₃ - Nitrato de plata	4,13	1	4,13	156,02	<0,0001	
X ₁ X ₂	0,2049	1	0,2049	7,75	0,0086	
X ₁ X ₃	0,4188	1	0,4188	15,83	0,0003	
X ₂ X ₃	0,0343	1	0,0343	1,32	0,2588	
X ₁ ²	0,8510	1	0,8510	32,17	<0,0001	
X ₂ ²	0,0331	1	0,0331	1,27	0,2673	
X ₃ ²	0,5488	1	0,5488	20,75	<0,0001	
Residual	0,9258	35	0,0265			
Lack of fit	0,7865	29	0,0271	1,17	0,4620	No significativo
Error puro	0,1393	6	0,0232			
Total, corregido	32,38	44				

Por otra parte, se realizó un análisis de varianza ANOVA para evaluar la significancia estadística del modelo de regresión, cuyos resultados se presentan en la Tabla 4. El coeficiente de determinación ($R^2=0,9713$), indica que aproximadamente el 97,13% de la variabilidad observada en la respuesta puede explicarse por los factores experimentales y sus interacciones, y que solo un 2,87% no puede ser explicada, lo que evidencia un excelente nivel de ajuste del modelo a los datos experimentales. El valor de R^2 ajustado (0,9655), muestra que el 96,55% de la variabilidad de la absorbancia es explicada por el modelo, considerando el número de términos incluidos, lo que sugiere que el modelo describe adecuadamente el comportamiento del sistema. Por su parte, el R^2 predicho (0,9510) confirma la capacidad del modelo para realizar predicciones confiables. La diferencia inferior a 0,2 entre los valores de R^2 ajustado y el R^2 predicho confirma la consistencia del modelo.

Asimismo, el valor de precisión adecuada (38,85) supera ampliamente el umbral mínimo aceptable de 4. Este indicador, junto al valor F reportado en el ANOVA (Tabla 3), demuestra una relación señal/ruido favorable y respalda la confiabilidad de las predicciones obtenidas. En conjunto, estos resultados confirman la validez estadística del modelo cuadrático propuesto para describir la síntesis de NPAg.

Tabla 4: Resultados del ANOVA de regresión para el modelo cuadrático, incluyendo R^2 , R^2 ajustado, R^2 predicho y precisión adecuada

Desv. Est.	0,1626	R^2	0,9713
Media	-0,3938	R^2 ajustado	0,9655
C.V%	41,30	R^2 predicho	0,9510
		Precisión adecuada	38,8528

En el análisis inicial, dos interacciones experimentales no presentaron significancia estadística y fueron eliminadas con el propósito de obtener un modelo final con mayor ajuste y capacidad predictiva, equivalentes a la interacción X_2X_3 (temperatura*concentración) y el cuadrático X_2^2 (temperatura²). Solo las variables

que mostraron efectos significativos se consideraron para el desarrollo de la ecuación polinómica del modelo final.

Luego de confirmar la validez estadística del modelo cuadrático, se procedió a ajustar la ecuación mediante regresión múltiple en el software Stat-Ease 360. Este análisis permitió estimar los coeficientes que describen el efecto de cada variable sobre la respuesta. La Tabla 5 presenta los coeficientes obtenidos para la absorbancia a 425 nm, los cuales comprenden los términos lineales, de interacción y cuadráticos del modelo.

Tabla 5: Coeficientes estimados del modelo de regresión cuadrático para la absorbancia

Variable (Absorbancia)	Coeficientes
Constante	-0,4229
pH (X_1)	1,010
Temperatura (X_2)	0,1784
Concentración (X_3)	0,4147
X_1X_2	-0,1307
X_1X_3	0,1868
X_1^2	0,2764
X_3^2	-0,2219

Por lo tanto, el modelo final que representa la relación entre la absorbancia y las tres variables independientes se expresa mediante la siguiente ecuación.

$$\begin{aligned} Ln(abs) = & -0,4229 + 1,010x_1 + 0,1764x_2 + 0,4147x_3 + 0,2764x_1^2 + (-0,2219)x_3^2 \\ & + (-0,1307)x_1x_2 + 0,1868x_1x_3 \end{aligned}$$

El modelo de predicción obtenido describe la variación de Ln (abs) de las NPAg en función de las variables pH, temperatura y concentración de nitrato de plata. Dado que la ecuación generada predice el valor de Ln (abs), la absorbancia real se obtiene aplicando la transformación exponencial a los valores estimados por el modelo. Esta relación permite interpretar de manera directa el efecto de las condiciones experimentales sobre la respuesta de las NPAg.

$$\text{Absorbancia} = e^{\text{Ln}(\text{abs})}$$

El signo de cada coeficiente permite interpretar el efecto de las variables independientes sobre la respuesta analizada. Un coeficiente con signo positivo indica que un incremento de esta variable produce un aumento en la absorbancia, mientras que un coeficiente negativo refleja una relación inversa, un aumento de esta variable conlleva a una disminución de la absorbancia. En base de la ecuación obtenida, se determina que el pH es la variable con mayor influencia sobre la absorbancia. En consecuencia, el modelo ajustado se considera adecuado para predecir el comportamiento de la absorbancia dentro del rango experimental evaluado, evidenciando un buen nivel de ajuste respecto a los datos experimentales. Los valores reales y predichos de los tres factores analizados, junto con sus respuestas correspondientes, se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6: Comparación entre valores experimentales y predichos de la absorbancia obtenidos a partir del modelo cuadrático ajustado.

Ensayo	pH	Temperatura (°C)	Nitrato de plata (mM)	Absorbancia promedio (u.a)	Absorbancia predicha (u.a)
1	7	30	3	0,232	0,231
2	9	30	1	0,287	0,291
3	9	30	5	0,662	0,666
4	11	30	3	2,653	2,266
5	7	45	1	0,207	0,201
6	7	45	5	0,365	0,316
7	9	45	3	0,713	0,655
8	9	45	3	0,612	0,655
9	9	45	3	0,592	0,655
10	11	45	1	0,884	1,041
11	11	45	5	3,210	3,466
12	7	60	3	0,385	0,428
13	9	60	1	0,492	0,413
14	9	60	5	0,929	0,948
15	11	60	3	2,658	2,482

6.3 Gráficos de respuesta 3D

La ecuación de regresión se representa como gráficos de superficie de respuesta 3D (Fig. 5), los cuales permiten visualizar el efecto combinado de las variables sobre la absorbancia a 425 nm. Se observa que el pH ejerce una influencia determinante sobre la respuesta, mostrando un incremento progresivo de la absorbancia a medida que el pH aumenta hacia valores alcalinos. En la interacción pH-concentración de AgNO_3 (Fig. 5a), manteniendo la temperatura constante en su nivel central, se evidencia que el máximo valor de absorbancia se alcanza en condiciones de pH 11 y concentraciones de AgNO_3 cercanas a 5mM. Por su parte,

la Fig. 5b, que muestra la interacción entre la concentración y la temperatura, manteniendo el pH fijo, revela que el incremento de la concentración de AgNO_3 tiene un efecto positivo moderado sobre la absorbancia, mientras que la temperatura no presenta una variación significativa dentro del rango estudiado. Finalmente, en la interacción pH-temperatura (Fig. 5c), se evidencia una vez más la influencia del pH, mientras que la temperatura actúa como un factor secundario. Estos resultados corroboran que el pH es la variable más influyente en el proceso de síntesis de NPAg, en concordancia con los coeficientes estimados en el modelo cuadrático, lo que valida la capacidad predictiva del modelo.

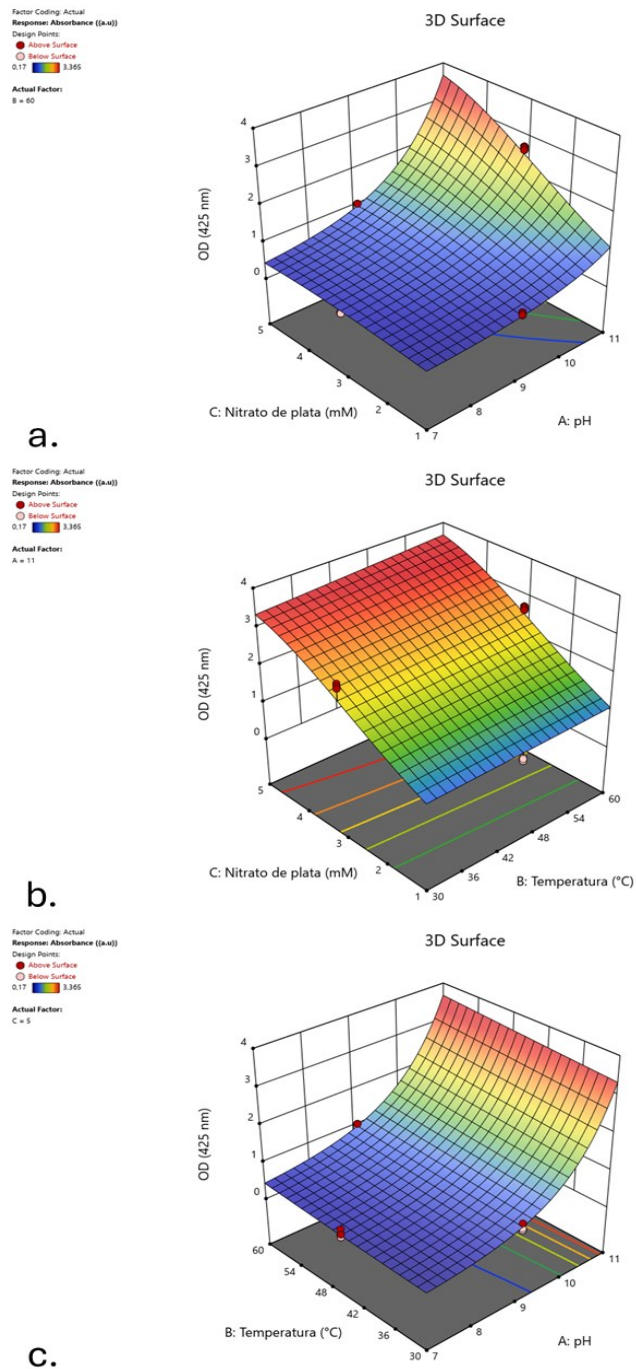


Fig. 5. Graficas de superficie de respuesta 3D que muestran los efectos de temperatura, concentración de AgNO_3 y pH mediante absorbancia. Se optimizaron tres pares de parámetros, manteniendo el otro parámetro constante en un punto central: (a) concentración de AgNO_3 y pH, temperatura en el punto central; (b) concentración y temperatura, pH en el punto central; y (c) pH y temperatura, concentración en el punto central.

6.4 Análisis HR-MET

Se determinó la distribución de tamaño y morfología de las NPAg sintetizadas a partir del caldo de fermentación de *P. melinii* mediante HR- MET. La Fig. 6 muestra las micrografías correspondientes a la síntesis realizada con 5mM de AgNO_3 , 45 °C y pH 11 (condición optimizada) tras 3 h de reacción, donde se observa la formación de NP principalmente esféricas y casi esféricas de tamaño reducido. En las zonas de mayor aumento se distinguen diámetros que abarcan aproximadamente entre los 10 y 40nm, junto con partículas de mayor tamaño. Asimismo, se aprecia la presencia de pequeños agregados y de franjas internas definidas en ciertas partículas, correspondientes a regiones cristalinas características de estas NP. Estos resultados se complementan con el análisis cuantitativo de la distribución de tamaño presentados en la Fig. 7, analizados con Image J. El histograma de distribución de tamaño mostró un rango entre 2 y 40 nm, y en promedio 9,28nm.

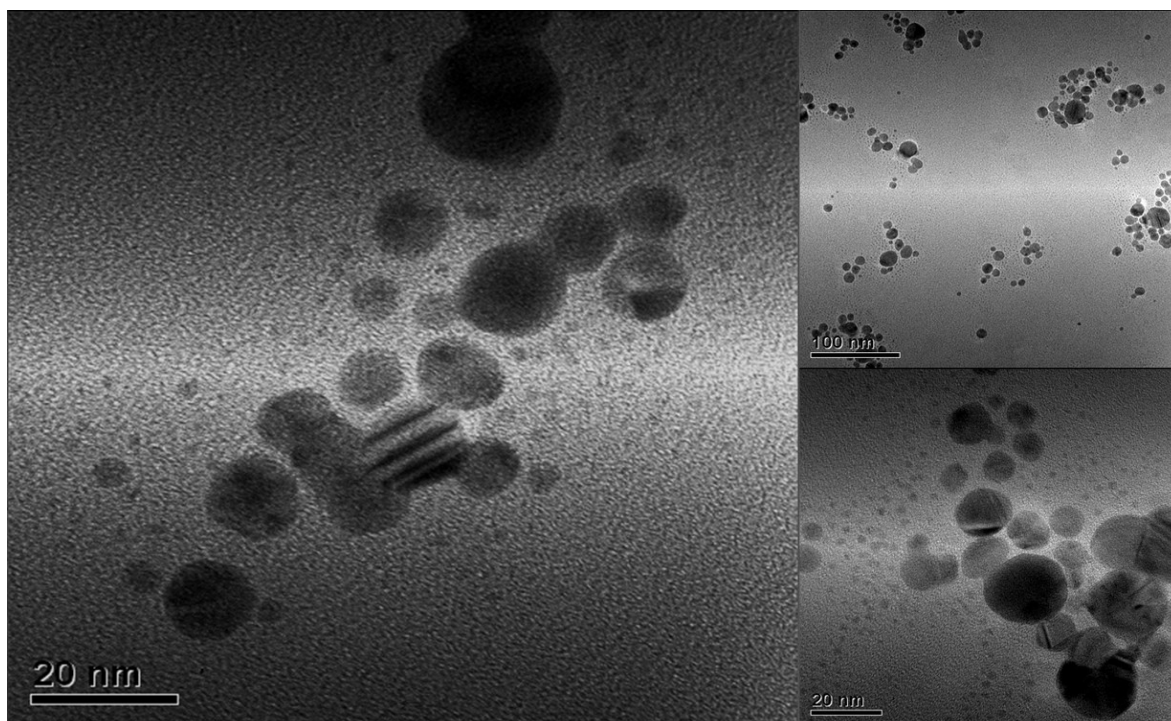


Fig. 6. Imágenes HR-TEM de NPAg sintetizadas bajo condiciones optimizadas a partir de los caldos de fermentación de *P. melinii*.

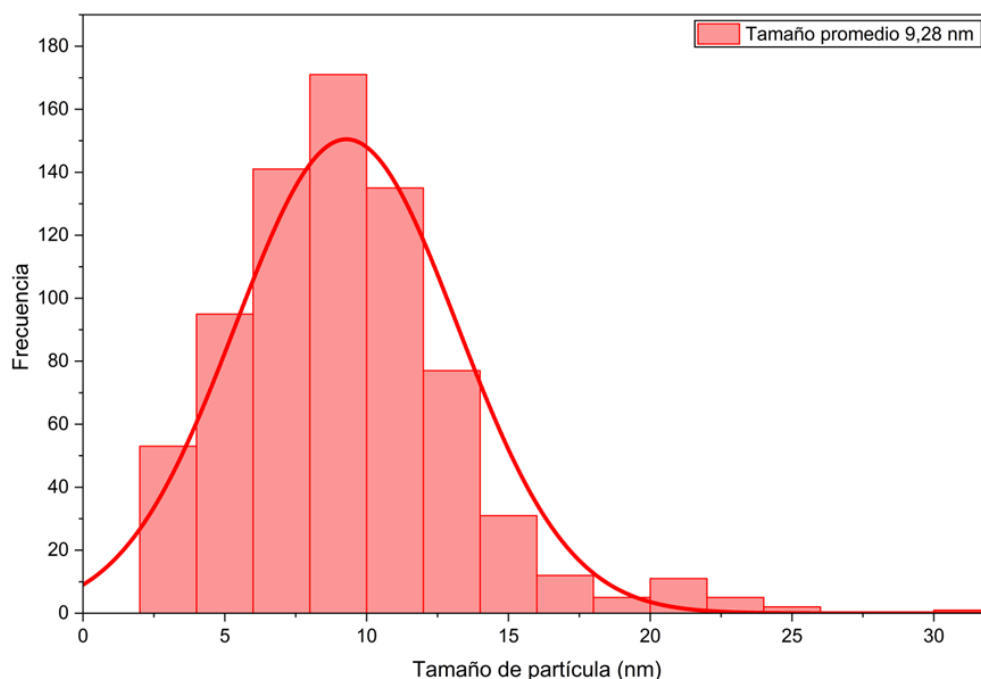


Fig. 7. Histograma de distribución de tamaño de NPAg utilizando caldo de fermentación de *P. melinii* producido bajo condiciones optimizadas.

6.5 DLS y potencial Z

Los resultados del DLS mostraron un tamaño hidrodinámico de 142,1 nm y un índice de polidispersidad (IPD) de 0,600. Además, la carga eléctrica determinada por el potencial Z fue de -9,46 mV, lo que indica una carga superficial negativa.

6.6 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

El análisis FTIR de las NPAg sintetizadas a partir del caldo de fermentación de *P. melinii* (Fig.8) mostró bandas características asociadas a grupos funcionales presentes en metabolitos fúngicos. Se observó una banda en 3204 cm^{-1} atribuida al estiramiento O-H de alcoholes y fenoles, así como señales en 2919 cm^{-1} correspondientes a estiramientos C-H de cadenas alifáticas. La presencia de bandas a 1724 cm^{-1} (C=O) y a 1629 cm^{-1} (C=C olefínicos) sugiere la participación de carbonilos y alquenos / aromáticos en la síntesis. Además, se detectaron bandas en la región a $1226\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$ y a 1034 cm^{-1} , características de enlaces C-O y C-N, indicando la posible intervención de proteínas y polisacáridos en la estabilización

de NP. En conjunto, estos hallazgos evidencian que compuestos fenólicos, proteínas y otros metabolitos del filtrado del caldo fúngico actuaron como agentes reductores y estabilizantes en la formación de NPAg.

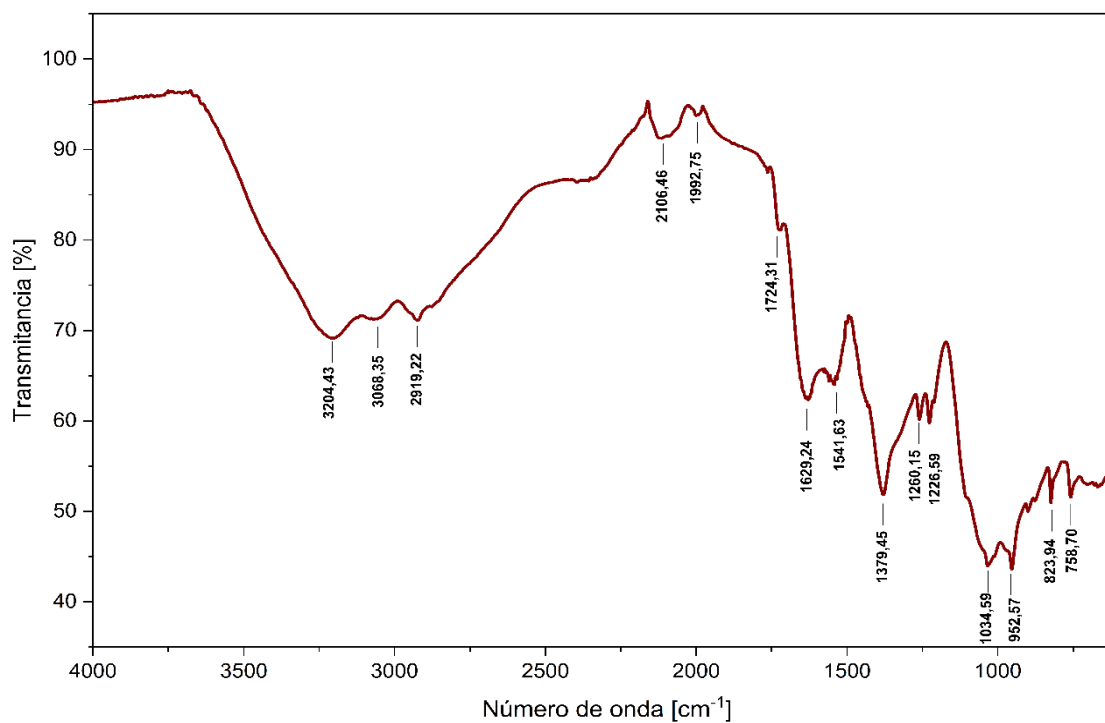


Fig. 8. Análisis FTIR de NPAg sintetizadas a partir del caldo de fermentación de *P. melinii*.

6.7 Ensayo antifúngico

La actividad antifúngica de las NPAg se determinó frente a *B. cinerea* y *P. cinnamomi* en placas de PDA suplementadas con concentraciones de 50 y 100 µg/mL, evaluando el crecimiento micelial al séptimo día. Los resultados mostraron que ninguno de los tratamientos produjo inhibición significativa respecto al control en ambos fitopatógenos (Fig. 9 y Fig. 10). En consecuencia, el cálculo de la inhibición del crecimiento micelial (ICM%) no arrojó valores distintos de cero. No obstante, en el caso de *B. cinerea* se evidenció una disminución progresiva en la densidad micelial a medida que aumentó la concentración de NPAg.

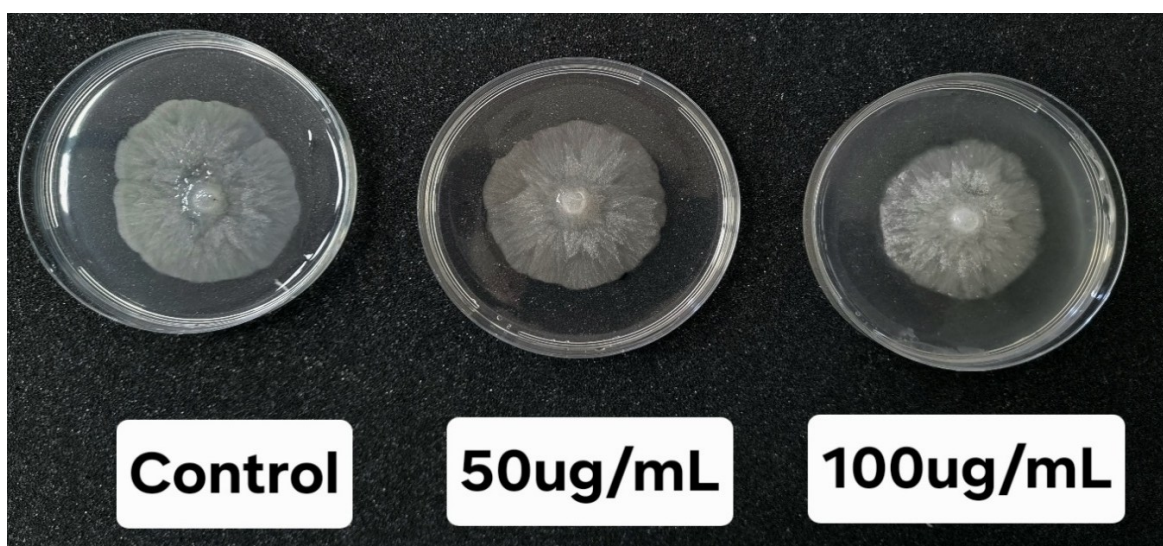


Fig. 9. Evaluación del crecimiento micelial de *P. cinnamomi* en medio PDA suplementado con NPAg a concentraciones de 50 y 100 µg/mL.

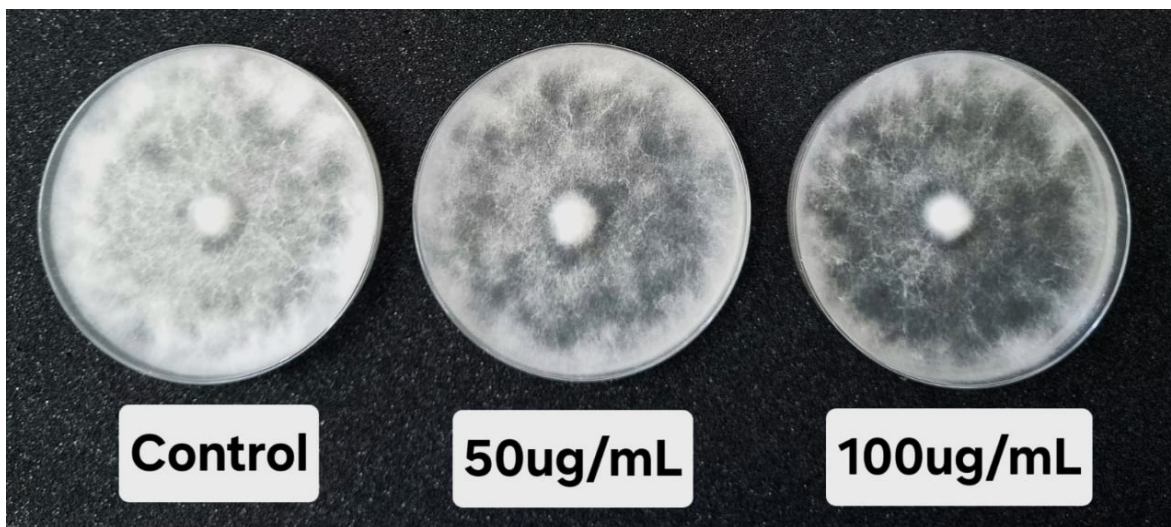


Fig. 10. Evaluación del crecimiento micelial de *B. cinerea* en medio PDA suplementado con NPAg a concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$.

Para respaldar las observaciones morfológicas, se realizó una evaluación cuantitativa de biomasa en peso seco (Fig. 11). Para *P. cinnamomi*, el peso micelial seco fue de 23,3 mg y 18,3 mg para las concentraciones de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, comparado con los 26,3 mg del control, mostrando una reducción de la biomasa en un 11,1% y 30,2% respectivamente. El Test de Tukey, categorizó el control en el grupo a y la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ en el grupo b. La concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ compartió ambas categorías (ab), no mostrando diferencias estadísticas significativas frente al control ni frente a la concentración máxima evaluada.

En *B. cinerea*, los tratamientos de 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ resultaron en pesos de 51,60 mg y 33,80 mg, lo que representó una disminución del 11,5% y un 41,5% respecto al control (57,9 mg). De acuerdo con el Test de Tukey, se presentaron diferencias significativas entre todos los niveles evaluados, presentando el menor valor de biomasa a los 100 $\mu\text{g/mL}$ de NPAg.

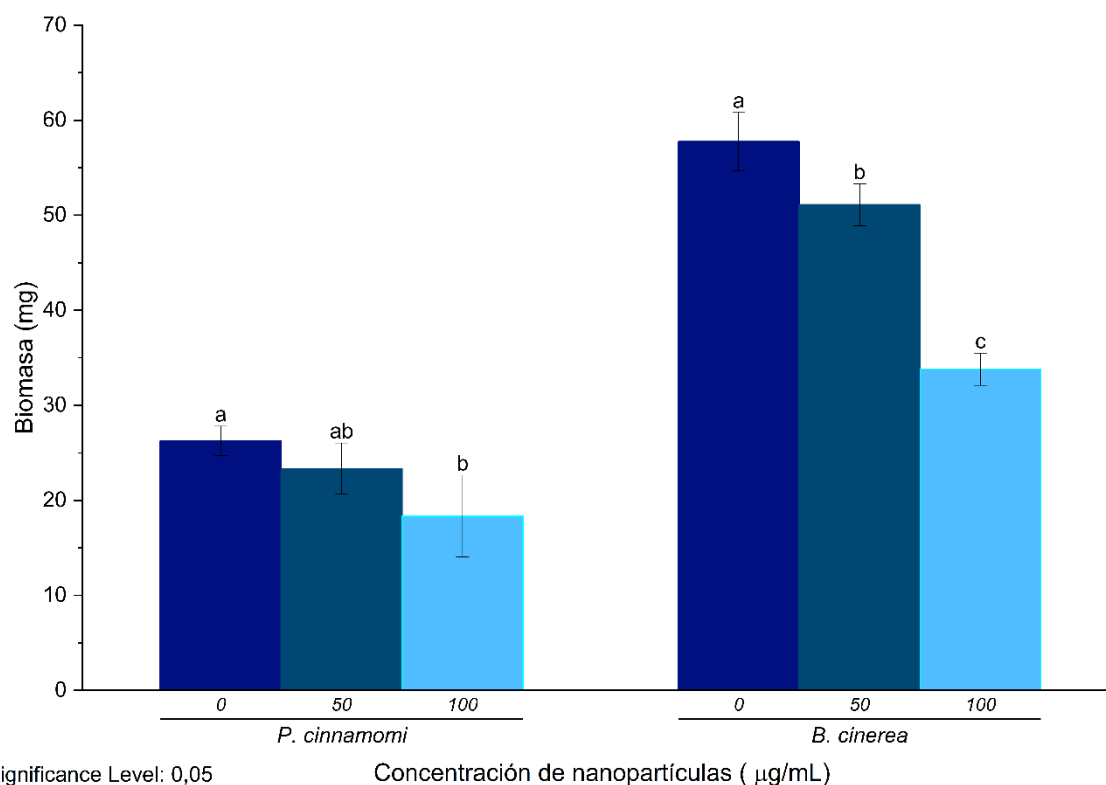


Fig. 11. Efecto de diferentes concentraciones de NPAg sobre la biomasa micelial (peso seco) de *P. cinnamomi* y *B. cinerea*. Los valores corresponden al promedio de tres réplicas independientes $\pm$ la desviación estándar. Letras distintas sobre las barras indican diferencias estadísticas significativas según el Test de Tukey ($p < 0,05$).

7 Discusión

En el presente estudio, se sintetizaron NPAg a partir del caldo de fermentación de *P. melinii*, especie endófito aislada de *Araucaria araucana*. La formación inicial de NPAg se evidenció inicialmente por el cambio de color de la solución tras la adición de AgNO_3 , pasando de un tono amarillento a un color marrón luego de 3 h de reacción. Este cambio visual se atribuye al fenómeno de RPS, el cual provoca una modificación en la coloración. Parámetros como la forma, el tamaño, la uniformidad y el recubrimiento superficial de las NP influyen directamente en la RPS y, en consecuencia, en la intensidad del color observado (Barabadi et al. 2022).

La confirmación de la síntesis se obtuvo mediante el espectro UV-Visible, donde NPAg sintetizadas presentaron una banda de absorbancia entre los 410 y 450 nm, característico de la RPS de NPAg. Este fenómeno ocurre cuando los electrones libres presentes en la superficie metálica de las NP oscilan colectivamente en respuesta a la onda de luz entrante, generando una alta absorbancia en torno a los 430 nm (Chandra et al. 2025). Este comportamiento óptico se relaciona directamente con la naturaleza metálica de las NP, por lo que no se observa en el control sin AgNO₃ (Shan et al. 2025). Esto confirma que el pico registrado a los 425nm corresponde a la formación de NPAg. Resultados similares han sido reportados por otros autores, quienes han descrito bandas de absorbancia a 425 y 450nm respectivamente para NPAg sintetizadas por *Rhizoctonia solani* y *Cladosporium cladosporioides* (Malik et al. 2024), *Talaromyces funiculosus* a 430nm (Mohanta et al. 2022); *Aspergillus brunneoviolaceus* a 411nm (Mistry et al. 2021); *Penicillium verrucosum* 420 nm (Yassin et al. 2021), entre otros.

Así mismo, desplazamiento del pico de absorbancia puede atribuirse a variaciones en el tamaño de las NP, en la constante dieléctrica del medio y en la distancia entre partículas (Nosrati et al. 2025). De acuerdo con Mohanta et al. (2022), un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores se relaciona con NP de mayor diámetro, mientras que las de menor tamaño presentan picos más definidos en longitudes de onda menores. En conjunto, estas variaciones en la posición de la RPS reflejan diferencias en la reducción y estabilización de los iones Ag⁺.

El análisis FTIR permitió identificar grupos funcionales relacionados con la síntesis y estabilización de las NPAg. Las bandas observadas se ubican en el rango de 4000 – 600 cm^{-1} . *P. melinii* exhibió bandas a 1226,59 cm^{-1} , a 1629,24 cm^{-1} , a 1724,31 cm^{-1} y a 3204 cm^{-1} , atribuibles respectivamente a enlaces C-O en fenoles, en alquenos, en anillos aromáticos y en carbonilos. Estas señales sugieren la presencia de metabolitos secundarios como polifenoles, que no solo pueden reducir iones de plata de Ag^+ a Ag^0 , sino que también estabilizar las NP mediante enlaces o interacciones electrostáticas (Sun et al. 2025). La presencia de estos grupos respalda la participación de compuestos fenólicos y flavonoides en la reducción y estabilización de las NPAg, mientras que algunos terpenos oxigenados podrían contribuir principalmente como estabilizantes (Hoseini-Nilaki et al. 2025).

El análisis DLS reveló un tamaño hidrodinámico de 142,1 nm, valor significativamente superior a los diámetros observados mediante MET. Esta diferencia es consistente con la literatura (Lasmi et al. 2025) y se atribuye a que el DLS mide no solo el núcleo metálico, sino que también a los agentes de recubrimiento biológico como proteínas, polisacáridos u otros metabolitos que rodean la superficie de las NPAg. Por otro lado, la distribución del tamaño fue evaluada mediante el IPD, el cual arrojó un valor de 0,600. Aunque este índice varía entre 0 y 1, donde valores cercanos a 0 representan una mayor homogeneidad, el resultado obtenido sugiere una naturaleza polidispersa (Ribeiro et al. 2023).

La estabilidad se determinó mediante el potencial Z, este es una medida del potencial electrostático, cuando este presenta valores de 20-30 mV en valor absoluto, indica una alta repulsión electrostática entre las NP de cargas iguales, lo que ayuda a prevenir la agregación y aumenta la estabilidad coloidal, asegurando el tamaño y forma a lo largo del tiempo, en contraparte, debido a la atracción de van der Waals, las dispersiones con un potencial Zeta más bajo pueden conducir a la agregación de NPAg (Alharbi et al. 2022; Vera et al. 2023). En este estudio, los valores obtenidos fueron de -9,46 mV, lo que sugiere una estabilidad moderada a baja, implicando cierta propensión a la agregación, sin embargo, pese a que no esté

en el óptimo, la carga negativa le otorga estabilidad debido a la repulsión electrostática entre las NP (Rana et al. 2023).

En el proceso de optimización los datos experimentales obtenidos fueron transformados mediante logaritmo natural con el fin de mejorar el ajuste del modelo y cumplir los supuestos estadísticos del análisis de varianza (ANOVA), relacionados con la normalidad y homogeneidad de la varianza de los residuos. Esta transformación se aplicó debido a que los gráficos de diagnóstico del software indicaron cierta dependencia de los errores respecto de la magnitud de la respuesta. Según el diagrama de Box-Cox, la transformación logarítmica correspondió a la opción más adecuada dentro del grupo de funciones de potencia, permitiendo estabilizar la varianza y mejorar la distribución de residuos.

Las condiciones óptimas para la síntesis de NPAg se determinaron a través de 15 experimentos diseñados según el DBB con diferentes combinaciones de pH, temperatura y concentración de AgNO_3 , orientados a maximizar la Abs como indicador de la concentración relativa de NPAg (Oliveira et al. 2025). El modelo, que ya presentaba un valor p altamente significativo, fue validado adicionalmente mediante indicadores estadísticos como el coeficiente de determinación R^2 , R^2 ajustado y R^2 predicho. De acuerdo con (Wabo et al. 2025) un modelo solo se considera apropiado cuando el R^2 alcanza valores superiores al 80%. En este estudio, el R^2 explico el 97,13% de la variabilidad en la máxima abs, mientras que el R^2 ajustado (96,55%) y el R^2 predicho (95,10%) confirmaron tanto el buen ajuste de los datos como la capacidad predictiva del modelo. Estos indicadores son consistentes con lo reportado por Hoseini- Nilaki et al. (2025) para la síntesis de NPAg mediada por *Alternaria alternata*, donde se obtuvieron valores de R^2 similares (98,22%) y una estrecha concordancia entre los coeficientes ajustados y predicho (96,15% y 89,97%). Asimismo, se estableció que las condiciones más favorables correspondieron a pH 11, temperatura de 45 °C y concentración de AgNO_3 de 5 mM, las cuales se correlacionaron con una mayor intensidad de la absorción observada en la espectroscopia UV-Vis alcanzando una abs de 3,210 a 425nm, lo que indica una síntesis exitosa y una mayor producción de NP.

Entre los factores evaluados, el pH resultó ser el factor más influyente. Resultados similares fueron reportados por Alves & Murray (2022), quienes observaron que en condiciones de pH alcalino (9 y 12), combinadas con temperaturas elevadas (45 °C y 90 °C), condujeron a tiempos de reacciones más cortos y un aumento de la abs. En su estudio, se sintetizaron exitosamente NPAg de *Cladophialophora batiana*, *Penicillium antarticum*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma martiale* y *Umbelopsis isabelina* en medio alcalino, sin embargo, solo dos cepas *P. antarcticum* y *T. versicolor* bajo condiciones de pH ácido. En efecto, un pH alcalino contribuye a la disminución de protones (H^+), evitando la posterior oxidación de los grupos fenólicos presentes en el extracto, lo que también incrementa su capacidad reductora.

Reportes similares fueron obtenidos por Shweqa et al. (2024), quienes sintetizaron NPAg a partir de *Aspergillus flavus*. En su estudio, se determinó que el pH ejerce un efecto altamente significativo, observándose un incremento en la abs. Respecto a los precursores, tanto Shweqa et al. (2024) como Oliveira et al. (2025) coincidieron en que un aumento de la concentración de $AgNO_3$ eleva los valores de abs.

Además, en nuestro estudio, el incremento de la concentración de $AgNO_3$ hasta 5 mM se correlacionó con un aumento en la abs. Este resultado coincide con lo reportado por Nosrati et al. (2025) quienes observaron que la intensidad de abs de las NPAg aumenta progresivamente hasta alcanzar 5 mM. Sin embargo, a concentraciones superiores, como 10 mM, describieron una disminución atribuida al crecimiento excesivo de las NP y al fenómeno de agregación. En consecuencia, dichos autores señalaron que la concentración optima se encuentra en el rango de 1 a 5 mM, ya que en este intervalo se favorece la síntesis de NP y se alcanza la máxima abs, aunque también se promueve un incremento en el tamaño de las NP.

En cuanto a la temperatura, Shweqa et al. (2024) señalaron que este factor es significativo, pero la relación entre temperatura y concentración no lo es, lo que concuerda con los hallazgos del presente estudio. No obstante, la temperatura por sí misma influye en la cinética de reacción y en la estabilidad de las especies reactivas del medio. En este sentido (Wabo et al. 2025) explican que el incremento de la temperatura afecta el tamaño de las NPAg, modificando así la longitud de onda

máxima. Además, la interacción cuadrática de la temperatura (temperatura²) no resultó significativa coincidiendo con nuestros resultados, dado que temperaturas más altas no aumentan el valor máximo alcanzado. Por lo tanto, se recomienda trabajar con temperaturas moderadas para incrementar la intensidad de la abs.

En este estudio, se emplearon 50 y 100 µg/mL de NPAg. Sin embargo, no se observó inhibición significativa del crecimiento micelial. Este hallazgo sugiere que, bajo las condiciones evaluadas, las NPAg no alcanzaron la concentración mínima inhibitoria para las cepas analizadas.

La literatura respalda que la actividad antifúngica de las NPAg depende de factores como el tamaño, forma, carga superficial, concentración de NP, pH y la especie fúngica (Kaman et al. 2025; Lasmi et al. 2025). Ishfaq et al. (2025) señala que NPAg más pequeñas exhiben mayor actividad antifúngica debido a una penetración intracelular más eficiente, además de una respuesta dependiente de la concentración que altera la integridad de la pared celular, la membrana y las estructuras internas; e incluso la concentración mínima inhibitoria puede variar según la cepa fúngica. De este modo, Dadayya et al. (2025) reportaron inhibición de crecimiento contra *Aspergillus brassiliensis*, *Aspergillus flavus* y *Candida albicans* con concentraciones de 5 y 10 mg/mL.

Esta variabilidad en la susceptibilidad también fue reportada por Vera-reyes et al. (2022), quienes observaron una inhibición del crecimiento con concentraciones de 60, 90 y 120 ppm frente a *Alternaria solani*, *Macrophomina sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Colletrichum gloesporoides*, *Pestalotia sp.*, *Beuveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Trichoderma viridae*, *Trichoderma fasciculatum*, *B. cinerea* y *P. cinnamomi*. En dicho estudio, al igual que en la presente investigación, se determinó que *B. cinerea* presenta una mayor sensibilidad en comparación a *P.cinnamomi*.

No obstante, un aporte distintivo de este trabajo es el análisis de la biomasa. Pese a que no se detectara una inhibición total del crecimiento micelial, se observó una reducción significativa en el peso seco, particularmente en *B. cinerea*. Esto indica que las NPAg ejercieron un efecto metabólico y estructural que, aunque insuficiente para detener la expansión del micelio, comprometió la capacidad del hongo para

generar biomasa. Al evaluar el peso seco, se observó que 100 µg/mL de NPAg redujeron la biomasa de *B. cinerea* en un 41,5% respecto al control, mostrando diferencias estadísticas significativas, sugiriendo una afectación directa en la densidad y vigor del micelio.

Respecto a *P. cinnamomi*, los resultados confirmaron una menor sensibilidad frente a *B. cinerea*, requiriendo 100 µg/mL para lograr una reducción significativa del 30,2% en el peso seco. Esta tolerancia superior puede atribuirse a la composición estructural de los oomicetos, donde la pared celular está constituida principalmente por celulosa y β-1,3 glucanos ofreciendo una barrera diferente a la quitina presente en hongos verdaderos. Asimismo, la capacidad de *P. cinnamomi* para desarrollar estructuras de resistencias como clamidosporas, o la activación de mecanismos enzimáticos de detoxificación similares a los descritos por su resistencia a fungicidas como el mefenoxam (de Andrade Lourenço et al. 2022), que podrían estar mediando la tolerancia observada frente al estrés oxidativo inducido por las NPAg.

8 Conclusión

En el presente estudio se empleó el caldo de fermentación de *P. melinii* para la biosíntesis de NPAg. Los análisis de caracterización confirmaron que este hongo endófito es capaz de sintetizar NP esféricas de tamaño uniforme, entre 2 y 20 nm y un tamaño hidrodinámico de 142,1 nm y una carga superficial negativa de -9,46 mV.

La optimización de parámetros mediante MSR con DBB permitió incrementar la absorbancia, indicador indirecto de la concentración relativa de NPAg, siendo el pH el factor con mayor impacto en el proceso, y la validación del modelo confirmó la confiabilidad de las predicciones, así como la comparación de valores reales y predichos. Las condiciones óptimas determinadas fueron pH 11, temperatura de 45°C y concentración de AgNO₃ de 5mM.

En cuanto a la actividad antifúngica, las NPAg no mostraron inhibición significativa del crecimiento radial del micelio frente a los fitopatógenos evaluados; sin embargo, se observó una reducción estadística significativa en la generación de biomasa, lo que sugiere que podrían ser necesarias concentraciones más elevadas para alcanzar la concentración mínima inhibitoria. Este hallazgo indica que, aunque el DBB optimizó las variables claves de síntesis la efectividad biológica depende de otros factores aun por ajustar.

El análisis FTIR reveló grupos funcionales asociados al extracto fúngico, confirmando su papel como agente reductor y estabilizador en el proceso de biosíntesis. La caracterización corroboró la formación de NP pequeñas, esféricas y homogéneas. No obstante, un mayor rendimiento en la síntesis no implica necesariamente una mejora en la eficacia antifúngica.

Futuras optimizaciones podrían considerar parámetros adicionales, como la proporción del filtrado libre de células y el tiempo, para explorar nuevas estrategias que potencien tanto la producción como la actividad biológica de las NPAg.

Referencias

- Abd El Aty AA (2026). Hafr Al Batin *Phoenix dactylifera* L. leaves extract as efficient catalyst for green synthesis of new silver nanoparticles with broad spectrum antimicrobial activity: characterization and evaluation compared to fungi. Arab J Sci Eng 51:1163–1178. <https://doi.org/10.1007/S13369-025-10084-2>
- Abd Elghaffar RY, Emam AM, Taher ES, Baz MM, Nayel H, Abdeen A, El-Nablaway M, Alwutayd KM, Mihaela O, Ioan BD, Khattab AA, Al-Serwi RH, Sehim AE (2024). The potential biological activities of *Aspergillus luchuensis*-aided green synthesis of silver nanoparticles. Front Microbiol 15:1381302. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2024.1381302>
- Abd-Elhamed W, Mohamed AA, Saad ZH, Hassanien SESI, Salem MZM, El-Hefny M (2025). Green synthesis of silver nanoparticles mediated by *Solanum nigrum* leaf extract and their antifungal activity against pine pathogens. Sci Rep 15:35025. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-21291-0>
- Abdollahi SA, Aali S, Shojaei S (2026). Optimization of process parameters by Box–Behnken design for the removal of drugs from aqueous solution by magnetic nanocomposite. Results in Engineering 29:108703. <https://doi.org/10.1016/J.RINENG.2025.108703>
- Abu-Elghait M, Soliman MKY, Azab MS, Salem SS (2025). Response surface methodology: Optimization of myco-synthesized gold and silver nanoparticles by *Trichoderma saturnisporum*. Biomass Convers Biorefin 15:4211–4224. <https://doi.org/10.1007/S13399-023-05188-4>
- Aguiar de Oliveira LV, Checca Huaman NR, Monteiro SN, Costa UO, Vitorazi L (2025). Characterization and optimization of cerium oxide nanoparticle-doped cellulose acetate films using the Box-Behnken Design. Journal of Materials Research and Technology 35:2736–2754. <https://doi.org/10.1016/J.JMRT.2025.01.224>
- Alam MS, Nayon MMP, Islam T, Hossain MS, Rahman MM (2025). Modeling and optimization of thermal conductivity ratio of Al₂O₃–water nanofluid using artificial neural network and Box-Behnken design-based response surface methodology with canonical analysis. International Journal of Thermofluids 30:101426. <https://doi.org/10.1016/J.IJFT.2025.101426>

- Alharbi NS, Alsubhi NS, Felimban AI (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: characterization and application. *J Radiat Res Appl Sci* 15:109–124. <https://doi.org/10.1016/J.JRRAS.2022.06.012>
- Al-khattaf FS (2021). Gold and silver nanoparticles: green synthesis, microbes, mechanisms, factors, plant disease management and environmental risks. *Saudi J Biol Sci* 28:3624–3631. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.03.078>
- Alves MF, Murray PG (2022). Biological synthesis of monodisperse uniform-size silver nanoparticles (AgNPs) by fungal cell-free extracts at elevated temperatures and pH. *J Fungi* 8:439. <https://doi.org/10.3390/JOF8050439>
- Andrade F, Jenipher C, Gurav N, Nadaf S, Khan MS, Mahajan N, Bhagwat D, Kalaskar M, Chikhale R, Bhole R, Lalsare S, Baheti A, Ayyanar M, Gurav S (2024). Endophytic fungi-assisted biomass synthesis of eco-friendly formulated silver nanoparticles for enhanced antibacterial, antioxidant, and antidiabetic activities. *J Drug Deliv Sci Technol* 97:105749. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2024.105749>
- Asif M, Yasmin R, Asif R, Ambreen A, Mustafa M, Umbreen S (2022). Green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs), structural characterization, and their antibacterial potential. *Dose-Response* 20:1–10. <https://doi.org/10.1177/15593258221088709>
- Barabadi H, Mohammadzadeh A, Vahidi H, Rashedi M, Saravanan M, Talank N, Alizadeh A (2022) *Penicillium chrysogenum*-derived silver nanoparticles: exploration of their antibacterial and biofilm inhibitory activity against the standard and pathogenic *Acinetobacter baumannii* compared to tetracycline. *J Clust Sci* 33:1929–1942. <https://doi.org/10.1007/S10876-021-02121-5>
- Borrego R, Bódalo A, Izquierdo-Bueno I, Moraga J, Carbú M, Bolivar-Anillo HJ, Vela-Delgado MD, Cantoral JM, Garrido C, González-Rodríguez VE (2025). Multifunctional endophytic fungi from ginger (*Zingiber officinale*) with antimicrobial, enzymatic, and antioxidant potential. *Agronomy* 15:2711. <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY15122711>
- Cao Y, Khan A, Abdi A, Ghadiri M (2021). Combination of RSM and NSGA-II algorithm for optimization and prediction of thermal conductivity and viscosity of bioglycol/water mixture containing SiO₂ nanoparticles. *Arab J Chem* 14:103204. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2021.103204>

- Cardoso CED, Almeida JC, Rocha J, Pereira E (2025). Application of Box-Behnken design to optimize the phosphorus removal from industrial wastewaters using magnetic nanoparticles. *Environmental Science and Pollution Research* 32:11 32:6804–6816. <https://doi.org/10.1007/S11356-025-36152-6>
- Chandra H, Vishwakarma S, Makwana N, Kharat AS, Chaudhry V, Chand S, Prasad R, Prakash S, Katara A, Yadav A, Nigam M, Mishra AP (2025). Eco-friendly silver nanoparticles synthesis method using medicinal plant fungal endophytes—biological activities and molecular docking analyses. *Biology (Basel)* 14:950. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY14080950>
- Chávez D, Rivas G, Machuca Á, Santos C, Deramond C, Aroca R, Cornejo P (2023). Contribution of arbuscular mycorrhizal and endophytic fungi to drought tolerance in *Araucaria araucana* seedlings. *Plants* 12:2116. <https://doi.org/10.3390/PLANTS12112116>
- Chin SW, Yong ML, Law SLT, Hassanien O, Ooi JH, Low LE, Khaw KY, How CW, Ong YS (2025). Impact of multi-factorial composition on the size of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) using Box-Behnken statistical design. *Nano-Struct Nano-Obj* 43:101504. <https://doi.org/10.1016/J.NANOSO.2025.101504>
- Chinemerem Nwobodo D, Ugwu MC, Oliseloke Anie C, Al-Ouqaili MTS, Chinedu Ikem J, Victor Chigozie U, Saki M (2022). Antibiotic resistance: the challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *J Clin Lab Anal* 36:e24655. <https://doi.org/10.1002/JCLA.24655>
- Dadayya M, Thippeswamy MG, Shivaiah N, Siddaraju TR, Jayaramaiah P, Veeranna SH, Basaiah T, Mathad SN, Hemagiri Gowda R, Naik S, Kheraif AAA, Vellappally S (2025). Pharmacological properties of biomimetic synthesized silver nanoparticles from endophytic fungus *Coniothyrium chaingmaense*: KUMBMDBT-25. *Sci Rep* 15:606. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-76475-x>
- de Andrade Lourenço D, Branco I, Choupina A (2022). A systematic review about biological control of phytopathogenic *Phytophthora cinnamomi*. *Mol Biol Rep* 49:9947–9962. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07547-2>
- de Oliveira RJV, Sousa FLN, Freitas D V., Silva FAC, de Almeida TS, Aguilera P, Machado G, Araújo BGP (2025). Synthesis of silver nanoparticles co-stabilized by carboxymethylcellulose using sugarcane endophytic *Aspergillus brasiliensis*. *The Microbe* 6:100223. <https://doi.org/10.1016/J.MICROB.2024.100223>

- Delzo-Salomé A, Huari-Vila O, Salazar-Mercado J, Delzo-Salomé A, Huari-Vila O, Salazar-Mercado J (2021). Diseño Box - Behnken para optimizar el rendimiento de un pico sistema solar fotovoltaico. *Tecnia* 31:97–101. <https://doi.org/10.21754/TECNIA.V21I2.1018>
- Dheyab MA, Aziz AA, Nowfal SH, Braim FS, Abdullah W, Kasasbeh WH, Jameel MS, Alanezi ST, Alrosan M, Oladzadabbasabadi N (2025). Sustainable green synthesis of silver nanoparticles for safer biomedical applications. *J Environ Chem Eng* 13:115998. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2025.115998>
- Díaz-Valenzuela C, Deramond-Galvez C, Machuca Á, Chávez D (2024). Actividad promotora del crecimiento vegetal de cuatro hongos endófitos aislados desde *Araucaria araucana*. *Siembra* 11:e6802–e6802. <https://doi.org/10.29166/SIEMBRA.V11I2.6802>
- Dikshit PK, Kumar J, Das AK, Sadhu S, Sharma S, Singh S, Gupta PK, Kim BS (2021). Green synthesis of metallic nanoparticles: applications and limitations. *Catalysts* 11:902. <https://doi.org/10.3390/CATAL11080902>
- El deeb BA, Faheem GG, Bakhit MS (2025). Biosynthesis of silver nanoparticles by *Talaromyces funiculosus* for therapeutic applications and safety evaluation. *Scientific Reports* 2025 15:1 15:13750-. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95899-7>
- Elfadil D, Hashem AH, Attia MS, El-Sayyad GS, Elfadil D, Hashem AH, Attia MS, El-Sayyad GS (2025). Biosynthesis of copper nanoparticles from endophytic fungi and their role in plant disease management. *Fungal Endophytes Volume II* 323–356. https://doi.org/10.1007/978-981-97-8804-0_11
- Faiq M, Ali A, Shafique S, Shafique S, Yaseen AR, Fatima R, Altaf MT, Baloch FS (2025). Endophytic fungi as biocontrol agents: a metabolite-driven approach to crop protection and sustainable agriculture. *Physiol Mol Plant Pathol* 140:102857. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2025.102857>
- Frippiat T, Art T, Delguste C (2025). Silver nanoparticles as antimicrobial agents in veterinary medicine: current applications and future perspectives. *Nanomaterials* 15:202. <https://doi.org/10.3390/NANO15030202>
- Gao Y, Xu Y, Dong Z, Guo Y, Luo J, Wang F, Yan L, Zou X (2025). Endophytic fungal diversity and its interaction mechanism with medicinal plants. *Molecules* 30:1028. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES30051028>

- Gharieb MM, Soliman AM, Omara MS (2023). Biosynthesis of selenium nanoparticles by potential endophytic fungi *Penicillium citrinum* and *Rhizopus arrhizus*: characterization and maximization. Biomass Convers Bioref 15:2319–2328. <https://doi.org/10.1007/S13399-023-05084-X>
- Gimranov E, Santos J, Regalado L, Teixeira C, Gomes P, Santos C, Pereira-Dias L (2025). Synthetic peptides bioactive against phytopathogens have a lower impact on some beneficial bacteria: an assessment of peptides biosafety in agriculture. J Environ Manage 374:123942. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2024.123942>
- Gouda SA, Hassanein NM, Salah M (2025). Antifungal activity of boron/selenium nanoparticles irradiated via gamma rays against *Alternaria alternata* and *Fusarium equiseti*. Curr Microbiol 82:129. <https://doi.org/10.1007/S00284-025-04089-1>
- Gunasekaran VV, Ranjani S, Hemalatha S (2025). Sustainable and eco-friendly silver nanoparticles synthesized from *Arachis hypogaea* nutshell extract to control phytopathogens. Environmental Sciences Europe 2025 37:1 37:142-. <https://doi.org/10.1186/S12302-025-01171-0>
- Gupta GK, Koli D, Kapoor RK (2024). Statistical optimization for greener synthesis of multi-efficient silver nanoparticles from the *Hypocrea lixii* GGRK4 culture filtrate and their ecofriendly applications. Frontiers in Nanotechnology 6:1384465. <https://doi.org/10.3389/FNANO.2024.1384465>
- Gupta P, Rai N, Verma A, Saikia D, Singh SP, Kumar R, Singh SK, Kumar D, Gautam V (2022). Green-based approach to synthesize silver nanoparticles using the fungal endophyte *Penicillium oxalicum* and their antimicrobial, antioxidant, and *in vitro* anticancer potential. ACS Omega 7:46653–46673. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.2C05605>
- Hodhod MS, Gaafar ARZ, AlMunqedhi BM, Elzein A, Abdelmalik AM (2024). Exploitation of mangliculous marine fungi, *Amarenographium solium*, for the green synthesis of silver nanoparticles and their activity against multiple drug-resistant bacteria. Open Chem 22. <https://doi.org/10.1515/CHEM-2023-0184>
- Hoseini-Nilaki SF, Ashengroph M, Zorab MM (2025). Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Alternaria sp.* OP242500: optimization through Box-Behnken design. Results Chem 15:102265. <https://doi.org/10.1016/J.RECHEM.2025.102265>

- Hosny S, Gaber GA, Ragab MS, Ragheb MA, Anter M, Mohamed LZ (2025). A comprehensive review of silver nanoparticles (AgNPs): synthesis strategies, toxicity concerns, biomedical applications, AI-driven advancements, challenges, and future perspectives. Arab J Sci Eng 82:1–48. <https://doi.org/10.1007/S13369-025-10612-0>
- Hu J, Qin D (2025). Diversity and biological activity of secondary metabolites produced by the endophytic fungus *Penicillium ochrochlorae*. Fermentation 11:394. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION11070394>
- Ishfaq S, Liang X, Ding Y, Zhang J, Zhang F, Anjum A, Guo W (2025). Integrated transcriptomic and metabolomic analysis reveals the antifungal effects of myco-silver nanoparticles against toxigenic *Fusarium verticillioides*. J Environ Manage 390:126360. <https://doi.org/10.1016/J.JENVMAN.2025.126360>
- Jamil MA, Iqbal FM, Sarwar AR, Iqbal MO, Arif A, Hadi AO, Gul MT, Ahmad A, Munawar N (2025). Synthesis and optimization of gemcitabine-loaded nanoparticles by using Box-Behnken design for treating prostate cancer: *In vitro* characterization and in vivo pharmacokinetic study. Green Processing and Synthesis 14. <https://doi.org/10.1515/GPS-2024-0188>
- Jana S, Das D, Bhattacharyya S, Raha S (2025). Mycogenic synthesis of silver nanoparticles using endophytic fungi and their characterization, biological activities, including *in-silico* studies with special reference to *Fusarium* wilt of tomato. Fungal Biol 129:101610. <https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2025.101610>
- Jangid H, Kumar G (2025). Ecotoxicity of fungal-synthesized silver nanoparticles: mechanisms, impacts, and sustainable mitigation strategies. 3 Biotech 15:101. <https://doi.org/10.1007/S13205-025-04266-W>
- Jyolsna P, Gowthami V, Hajeera Aseen A (2025). Bio-synthesised nanoparticles employment for eliminating metals from wastewater via implementation of a three level Box-Behnken technique. Appl Water Sci 15:37. <https://doi.org/10.1007/S13201-025-02364-X>
- Kaman PK, Shiva Sai Swaroop V, Savani AK (2025). Silver nanoparticles for managing fungal diseases of cocoa crops. In: Jabborova D, Sarkar D, Datta R, Singh S (eds) Nanomaterials in agroforestry systems. Smart Nanomaterials Technology. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-96-1337-3_12

- Kathija N, Ranjani S, Hemalatha S (2024). Endophytic fungi *Lasiodiplodia theobromae*–mediated EFAgNPs as potent antibacterial agent against MDR *Klebsiella pneumoniae*. Bionanoscience 14:276–286. <https://doi.org/10.1007/S12668-023-01252-5>
- Kaur M, Singh K, Kumar V (2024). Green synthesis of silver nanoparticles using *Penicillium camemberti* and its biological applications. Bionanoscience 14:5179–5193. <https://doi.org/10.1007/S12668-024-01507-9>
- Khan MR, Urmi MA, Kamaraj C, Malafaia G, Ragavendran C, Rahman MM (2023). Green synthesis of silver nanoparticles with its bioactivity, toxicity and environmental applications: a comprehensive literature review. Environ Nanotechnol Monit Manag 20:100872. <https://doi.org/10.1016/J.ENMM.2023.100872>
- Khan S, Mathur A, Khan F (2025). Endophytic fungi-bioinspired nanoparticles potential to control infectious disease. Crit Rev Microbiol. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2025.2497795>
- Kong W, Li J, Chen Z, Zhang Y, Xie S, Lv T, Li X, Chen J, Xia X, Li J, Zeng X, Deng Z (2025). Biosynthesis of silver nanoparticles using endophytic *Clonostachys rosea* ZMS27 from medicinal plant *Anemarrhena asphodeloides* and its antagonistic activity against superficial pathogenic fungi. Mol Biotechnol 1–12. <https://doi.org/10.1007/S12033-025-01452-2>
- Kumar S, Pant M, Prashar C, Pandey KC, Roy S, Pande V, Dandapat A (2024). Myco-synthesis of multi-twinned silver nanoparticles as potential antibacterial and antimalarial agents. RSC Adv 14:1114–1122. <https://doi.org/10.1039/D3RA07752G>
- Lasmi F, Hamitouche H, Laribi-Habchi H, Benguerba Y, Chafai N (2025). Silver nanoparticles (AgNPs), methods of synthesis, characterization, and their application: a review. Plasmonics 20:9455–9488. <https://doi.org/10.1007/S11468-025-02894-9>
- Li Q xi, Lin F cheng, Su Z zhu (2025). Endophytic fungi—big player in plant-microbe symbiosis. Curr Plant Biol 42:100481. <https://doi.org/10.1016/J.CPB.2025.100481>
- Lindsay CA, Kinghorn AD, Rakotondraibe HL (2023). Bioactive and unusual steroids from *Penicillium* fungi. Phytochemistry 209:113638. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2023.113638>

- Lv F, Zeng Y (2024) Novel bioactive natural products from marine-derived *Penicillium* fungi: a review (2021–2023). *Mar Drugs* 22:191. <https://doi.org/10.3390/MD22050191>
- Lv T, Chen M, Li X, Long Y, Liang Y, Jiang T, Chen J, Huang Y, Guo K, Cheng Y, Deng Z, Wang Z (2025). Silver nanoparticles synthesised using endophytic fungus *Calonectria eucalypti* from medicinal plant *Axifraga stolonifera* and their bioactivity. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 23:100627. <https://doi.org/10.1016/J.JGEB.2025.100627>
- Malik M, Aamir Iqbal M, Iqbal Y, Malik M, Bakhsh S, Irfan S, Ahmad R, Pham P V. (2022). Biosynthesis of silver nanoparticles for biomedical applications: a mini review. *Inorg Chem Commun* 145:109980. <https://doi.org/10.1016/J.INOCHE.2022.109980>
- Malik MA, Wani AH, Bhat MY, Siddiqui S, Alamri SAM, Alrumman SA (2024). Fungal-mediated synthesis of silver nanoparticles: a novel strategy for plant disease management. *Front Microbiol* 15:1399331. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2024.1399331>
- Meena M, Zehra A, Swapnil P, Harish, Marwal A, Yadav G, Sonigra P (2021). Endophytic nanotechnology: an approach to study scope and potential applications. *Front Chem* 9:613343. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2021.613343>
- Metwaly AM, Ashour MA, Khan S, Ma G, Kadry HA, El-Hela AA, Mohammad A-El, Cutler SJ, Ross SA (2019). Comparative biological evaluation of six endophytic fungi isolated from *Vinca rosea* leaves. *Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences* 59:137–151. <https://doi.org/10.21608/AJPS.2019.64113>
- Mikhailova EO (2020). Silver nanoparticles: mechanism of action and probable bio-application. *J Funct Biomater* 11:84. <https://doi.org/10.3390/JFB11040084>
- Mistry H, Thakor R, Patil C, Trivedi J, Bariya H (2021). Biogenically proficient synthesis and characterization of silver nanoparticles employing marine procured fungi *Aspergillus brunneoviolaceus* along with their antibacterial and antioxidative potency. *Biotechnol Lett* 43:307–316. <https://doi.org/10.1007/S10529-020-03008-7>
- Mohammadi M, Stanghellini ME (2024). Two novel heat-tolerant, culturable rhizosphere-inhabiting, plant growth-promoting ascomycete fungi associated

with native plants in desert habitats of southwestern USA. Ecol Genet Genom 32:100265. <https://doi.org/10.1016/J.EGG.2024.100265>

Mohammadpour A, Karami N, Zabihi R, Fazeliyan E, Abbasi A, Karimi S, Barbosa de Farias M, Adeodato Vieira MG, Shahsavani E, Mousavi Khaneghah A (2023). Green synthesis, characterization, and application of Fe₃O₄ nanoparticles for methylene blue removal: RSM optimization, kinetic, isothermal studies, and molecular simulation. Environ Res 225:115507. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2023.115507>

Mohanta YK, Nayak D, Mishra AK, Chakrabartty I, Ray MK, Mohanta TK, Tayung K, Rajaganesh R, Vasanthakumaran M, Muthupandian S, Murugan K, Sharma G, Dahms HU, Hwang JS (2022). Green synthesis of endolichenic fungi functionalized silver nanoparticles: the role in antimicrobial, anti-cancer, and mosquitocidal activities. Int J Mol Sci 23:10626. <https://doi.org/10.3390/IJMS231810626>

Murugaiyan J, Anand Kumar P, Rao GS, Iskandar K, Hawser S, Hays JP, Mohsen Y, Adukkadukkam S, Awuah WA, Jose RAM, Sylvia N, Nansubuga EP, Tilocca B, Roncada P, Roson-Calero N, Moreno-Morales J, Amin R, Krishna Kumar B, Kumar A, Toufik AR, Zaw TN, Akinwotu OO, Satyaseela MP, van Dongen MBM (2022). Progress in alternative strategies to combat antimicrobial resistance: focus on antibiotics. Antibiotics 11:200. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS11020200>

Mustapha T, Misni N, Ithnin NR, Daskum AM, Unyah NZ (2022). A review on plants and microorganisms mediated synthesis of silver nanoparticles, role of plant metabolites and applications. Int J Environ Res Public Health 19:674. <https://doi.org/10.3390/IJERPH19020674>

Mutlag F, Elaibi H, Halvaci E, Sen F (2025). Green synthesis of silver nanoparticles from *Passiflora edulis*: comparison with conventional methods and biomedical applications. Int J Environ Sci Technol 23:145. <https://doi.org/10.1007/S13762-025-06956-7>

Naganthran A, Verasoundarapandian G, Khalid FE, Masarudin MJ, Zulkharnain A, Nawawi NM, Karim M, Abdullah CAC, Ahmad SA (2022). Synthesis, characterization and biomedical application of silver nanoparticles. Materials Vol 15, Page 427 15:427. <https://doi.org/10.3390/MA15020427>

Nongthombam KS, Kannaiah S, Raju P, Govindan L, Mutum SS, Pandey RR (2024). Biogenic production of silver nanoparticles using *Neocosmospora solani*

- endophytic fungal extract: their *in vitro* antibacterial and anticancer properties. *J Inorg Organomet Polym Mater* 35:1603–1614. <https://doi.org/10.1007/S10904-024-03226-W>
- Nosrati F, Fakheri B, Ghaznavi H, Mahdinezhad N, Sheervalilou R, Fazeli-Nasab B (2025). Green synthesis of silver nanoparticles from plant *Astragalus fasciculifolius* Bioss and evaluating cytotoxic effects on MCF7 human breast cancer cells. *Sci Rep* 15:25474. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-05224-5>
- Oliveira MAM, Calado ML, Guerreiro SFC, Dias JR, Campos MJ, Murray PG, Novais SC (2025). Improved biosynthesis and characteristics of silver nanoparticles using marine endophytic fungi exposed to hypo-osmotic stress. *Sci Rep* 15:16327. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-98978-x>
- Peng Y, Li SJ, Yan J, Tang Y, Cheng JP, Gao AJ, Yao X, Ruan JJ, Xu BL (2021). Research progress on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents. *Front Microbiol* 12:670135. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.670135>
- Plokhovska S, García-Villaraco A, Lucas JA, Gutierrez-Mañero FJ, Ramos-Solano B (2025). Silver nanoparticles coated with metabolites of *Pseudomonas sp.* N5.12 inhibit bacterial pathogens and fungal phytopathogens. *Sci Rep* 15:1522. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-84503-z>
- Pradhan U, Sahu SK, Majhi P, Toppo A, Kumar R, Ghorai TK, Shukla AK (2025). *Cordia macleodii*-mediated silver nanoparticles: a sustainable and green solution for agricultural phytopathogen management. *ACS Appl Bio Mater*. <https://doi.org/10.1021/ACSABM.5C01751>
- Qamar SUR, Ahmad JN (2021). Nanoparticles: mechanism of biosynthesis using plant extracts, bacteria, fungi, and their applications. *J Mol Liq* 334:116040. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2021.116040>
- Radhakrishnan S, Balasubramanian B, Kavibharath S, Thangaraj N, Paramasivam D, Kamyab H, Mani VM, Chelliapan S, Khalili E (2025). Synthesis and therapeutic potential of copper oxide nanoparticles from endophytic fungi: anti-cancer activities and mechanisms. *Bioorg Chem* 163:108679. <https://doi.org/10.1016/J.BIOORG.2025.108679>
- Ragavi R, Sachini Sigera P, Nirmani AAEB, Rathnayake M, Pasindu Eranga RA, Dinuhara Theekshana KK, Peiris DC (2025). Green synthesis of silver nanoparticles using *Padina commersonii*: characterization, hypoglycemic

- effects, and antimicrobial potential against human pathogenic bacteria. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 23:100493. <https://doi.org/10.1016/J.JGEB.2025.100493>
- Ran H, Li SM (2021). Fungal benzene carbaldehydes: occurrence, structural diversity, activities, and biosynthesis. *Nat Prod Rep* 38:240–263. <https://doi.org/10.1039/D0NP00026D>
- Rana A, Kumari A, Chaudhary AK, Srivastava R, Kamil D, Vashishtha P, Sharma SN (2023). An investigation of antimicrobial activity for plant pathogens by green-synthesized silver nanoparticles using *Azadirachta indica* and *Mangifera indica*. *PhysChem* 3:125–146. <https://doi.org/10.3390/PHYSCHEM3010010>
- Rasheed H, Imtiaz F, Ali A, Sajid A, Manzoor Q, Younas U, Elhouichet H, Alahmari AS, Iqbal M, Nazir A (2025). Box Behnken design-based optimized green synthesis of lanthanum oxide submicroparticles using *Quercus infectoria* galls extract and their antimicrobial activities. *Advanced Powder Technology* 36:104929. <https://doi.org/10.1016/J.APT.2025.104929>
- Răut I, Constantin M, Șuică-Bunghez R, Firincă C, Alexandrescu E, Gîfu IC, Doni M, Zamfir LG, Gurban AM, Jecu L (2024). Extracellular biosynthesis, characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized by filamentous fungi. *J Fungi* 10:798. <https://doi.org/10.3390/JOF10110798>
- Ribeiro LG, Roque GSC, Conrado R, De Souza AO (2023). Antifungal activity of mycogenic silver nanoparticles on clinical yeasts and phytopathogens. *Antibiotics* 12:91. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12010091>
- Rudrappa M, Kumar RS, Nagaraja SK, Hiremath H, Gunagambhire PV, Almansour Al, Perumal K, Nayaka S (2023). Myco-nanofabrication of silver nanoparticles by *Penicillium brasilianum* NP5 and their antimicrobial, photoprotective and anticancer effect on MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Antibiotics* 12:567. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12030567>
- Saddik MS, Saleem BAA, Khames A, Alaa-Eldin AA, El-Mokhtar MA, Eliwa HeshamA, Al-Hakkani MF, Ashour AM, Hashem H, Ismail MA, Abdel-Rheem AA (2026). Green-synthesized selenium nanoparticles overcoming methotrexate resistance in colorectal cancer. *OpenNano* 27:100269. <https://doi.org/10.1016/J.ONANO.2025.100269>
- Sadvakasova AK, Kossalbayev BD, Zaletova D, Bauenova MO, Huang Z, Zharmukhamedov SK, Shabala S, Allakhverdiev SI (2025). Combating

- phytopathogens by integration of metagenomics and phototrophic biotechnologies: toward sustainable agricultural practices. *Crit Rev Plant Sci* 44:70–87. <https://doi.org/10.1080/07352689.2025.2494872>
- Saeed Al-Zahrani S, Mohammed Al-Garni S (2023). Antifungal potentiality of mycogenic silver nanoparticles capped with chitosan produced by endophytic *Amesia atrobrunnea*. *Saudi J Biol Sci* 30:103746. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2023.103746>
- Salari M (2022). Optimization by Box–Behnken design and synthesis of magnetite nanoparticles for removal of the antibiotic from an aqueous phase. *Adsorpt Sci Technol*. <https://doi.org/10.1155/2022/1267460>
- Salem SS, Soliman MKY, Azab MS, Abu-Elghait M (2024). Optimization of growth conditions of *Fusarium pseudonygamai* for myco-synthesized gold and silver nanoparticles using response surface methodology. *Bionanoscience* 14:5420–5435. <https://doi.org/10.1007/S12668-024-01349-5>
- Salvatore MM, Nicoletti R, Fiorito F, Andolfi A (2024). Penicillides from *Penicillium* and *Talaromyces*: chemical structures, occurrence and bioactivities. *Molecules* 29:3888. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES29163888>
- Santos TS, Silva TM, Cardoso JC, de Albuquerque-Júnior RLC, Zielinska A, Souto EB, Severino P, Mendonça M da C (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles mediated by entomopathogenic fungi: antimicrobial resistance, nanopesticides, and toxicity. *Antibiotics* 10:852. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10070852>
- Sedighi R, Rajabzadeh G, Rafe A (2025). Optimization of calcium-reinforced nanophytosome of pomegranate extract using Box–Behnken design. *Food Sci Nutr* 13:e71229. <https://doi.org/10.1002/FSN3.71229>
- Seetharaman PK, Chandrasekaran R, Periakaruppan R, Gnanasekar S, Sivaperumal S, Abd-Elsalam KA, Valis M, Kuca K (2021). Functional attributes of myco-synthesized silver nanoparticles from endophytic fungi: a new implication in biomedical applications. *Biology* 10:473. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10060473>
- Selim MT, Soliman MKY, Hashem AH, Salem SS (2025) Biosynthesis of silver nanoparticles from endophytic fungi and their role in plant disease management. In: *Fungal endophytes*, Volume II, pp 357–382. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-981-97-8804-0_12

- Selvam K, Ragu Prasath A, Alanazi AK (2025). A review of recent developments in green synthesis of silver nanoparticles: antioxidant and antibacterial applications. *Microsc Res Tech* 89:134–147. <https://doi.org/10.1002/JEMT.70060>
- Shah SH, Shan X, Baig S, Zhao H, Ismail B, Shahzadi I, Majeed Z, Nawazish S, Siddique M, Baig A (2023). First identification of potato tuber rot caused by *Penicillium solitum*, its silver nanoparticles synthesis, characterization and use against harmful pathogens. *Front Plant Sci* 14:1255480. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2023.1255480>
- Shahzadi S, Fatima S, UI Ain Q, Shafiq Z, Janjua MRSA (2025). A review on green synthesis of silver nanoparticles (SNPs) using plant extracts: a multifaceted approach in photocatalysis, environmental remediation, and biomedicine. *RSC Adv* 15:3858–3903. <https://doi.org/10.1039/D4RA07519F>
- Shan S, Tuo R, Xiao Y, Yang G (2025). Preparation and antifungal activity of naringin self-assembled silver nanoparticles and their application in mandarins preservation. *Postharvest Biol Technol* 230:113842. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2025.113842>
- Shweqa NS, El-Naggar NE-A, Abdelmigid HM, Alyamani AA, Elshafey N, El-Shall H, Heikal YM, Soliman HM (2024). Green fabrication of silver nanoparticles, statistical process optimization, characterization and molecular docking analysis of their antimicrobial activities on cotton fabrics. *J Funct Biomater* 15:354. <https://doi.org/10.3390/jfb15120354>
- Subha T, Srilatha M, Naveen P, Thirumalaisamy R (2024). Green synthesis, characterization and optimization of silver nanoparticles from *Carica papaya* using Box Behnken design and its activity against dental caries causing *Streptococcus* sp. *Chemical Data Collections* 51:101139. <https://doi.org/10.1016/J.CDC.2024.101139>
- Sun D, Chen R, Lei L, Zhang F (2025). Green synthesis of silver nanoparticles from the endophytic fungus *Panax notoginseng* and their antioxidant and antimicrobial activities and effects on cherry tomato preservation. *Int J Food Microbiol* 431:111083. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2025.111083>
- Tamta MP, Joshi HK, Vishwakarma MC, Negi A, Bisht BS, Kumar R, Khati PS, Pooja, Joshi SK, Bhandari NS (2026). Green synthesis and optimisation of silver nanoparticles using *Hedychium spicatum* rhizomes: characterisation and

- Tang KWK, Millar BC, Moore JE (2023). Antimicrobial resistance (AMR). Br J Biomed Sci 80:11387. <https://doi.org/10.3389/BJBS.2023.11387>
- Tavares Luiz M, Santos Rosa Viegas J, Palma Abriata J, Viegas F, Testa Moura de Carvalho Vicentini F, Lopes Badra Bentley MV, Chorilli M, Maldonado Marchetti J, Tapia-Blácido DR (2021). Design of experiments (DoE) to develop and to optimize nanoparticles as drug delivery systems. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 165:127–148. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2021.05.011>
- Tedjani ML, Derki M, Tidjani S, Tayeb M, Khaled O, Derki N-EH, Mahboub MS, Nour-El, Derki H, Mohammed, Tedjani L, Mahboub S (2024). Controlled biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using plant extracts: a Box–Behnken design for size optimization. J Inorg Organomet Polym Mater 35:2466–2486. <https://doi.org/10.1007/S10904-024-03379-8>
- Toghueo RMK, Boyom FF (2020) Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. 3 Biotech 10:1–35. <https://doi.org/10.1007/S13205-020-2081-1>
- Vera J, Herrera W, Hermosilla E, Díaz M, Parada J, Seabra AB, Tortella G, Pesenti H, Ciudad G, Rubilar O (2023). Antioxidant activity as an indicator of the efficiency of plant extract-mediated synthesis of zinc oxide nanoparticles. Antioxidants 12:784. <https://doi.org/10.3390/antiox12040784>
- Vera-Reyes I, Altamirano-Hernández J, Reyes-de la Cruz H, Granados-Echegoyen CA, Loera-Alvarado G, López-López A, Garcia-Cerda LA, Loera-Alvarado E (2022). Inhibition of phytopathogenic and beneficial fungi applying silver nanoparticles *in vitro*. Molecules 27:8147. <https://doi.org/10.3390/molecules27238147>
- Wabo SP, Nanssou Kouteu PA, Hounda Fokou JB, Mbiada Pahane M, Mouangue RM, Jiokap Nono Y (2025). Optimisation of ultrasonic-assisted biosynthesis of silver nanoparticles mediated by *Raphia farinifera* kernel extract using neural network and Box-Behnken design for the catalytic degradation of organic dyes. Int J Environ Anal Chem. <https://doi.org/10.1080/03067319.2025.2497475>

- Wirwis A, Sadowski Z (2023). Green synthesis of silver nanoparticles: optimizing green tea leaf extraction for enhanced physicochemical properties. ACS Omega 8:30532–30549. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.3C03775>
- Xie K, Du Y, Zhang J, Gan X, Hu T, Xie N, Yang X (2026). Green synthesis of silver nanoparticles by endophytic *Burkholderia plantarii* and their protection efficacy against postharvest tomato soft rot. Postharvest Biol Technol 234:114141. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2025.114141>
- Yassin MA, Elgorban AM, El-Samawaty AERMA, Almunqedhi BMA (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Penicillium verrucosum* and analysis of their antifungal activity. Saudi J Biol Sci 28:2123–2127. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2021.01.063>
- Zhang X, Yin Q, Li X, Liu X, Lei H, Wu B (2022). Structures and bioactivities of secondary metabolites from *Penicillium* genus since 2010. Fitoterapia 163:105349. <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2022.105349>
- Zhou C, Senadeera W, Wahia H, Kabutey A, Kovačević SK, Karadžić M, Banjac K, Podunavac S, Kuzmanović K (2025) Artificial Intelligence and Experimental Design: The Flywheel of Innovating Food Processing Engineering. Processes 2025, Vol 13, Page 846 13:846. <https://doi.org/10.3390/PR13030846>

Cuestionario de auto reporte sobre contribuciones primarias y secundarias a los Objetivos de Desarrollo Sostenible, organizados por categorías.

En caso de que aplique, marque con una "X" un único Objetivo de Desarrollo Sostenible como aporte principal y otro objetivo como aporte secundario.

Bloques	Objetivos	1°	2°
Personas	1. Poner fin a la pobreza en todas sus formas y en el mundo.		
	2. Poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible		
	3. Garantizar una vida sana y promover el bienestar de todos y todas las edades.		
	4. Garantizar una educación inclusiva y equitativa de calidad y promover oportunidades de aprendizaje permanente para todos.		
	5. Lograr la igualdad de género y empoderar a todas las mujeres y las niñas.		
Planeta	6. Garantizar la disponibilidad y la gestión sostenible del agua y el saneamiento para todos.		
	12. Garantizar modalidades de consumo y producción sostenible.		X
	13. Adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos.		
	14. Conservar y utilizar sosteniblemente los océanos, los mares y los recursos marinos para el desarrollo sostenible.		
	15. Proteger, restablecer y promover el uso sostenible de los ecosistemas terrestres, gestionar sosteniblemente los bosques, luchar contra la desertificación, detener e invertir la	X	

	degradación de las tierras y detener la pérdida de biodiversidad.		
Prosperidad	7. Garantizar el acceso a una energía asequible, fiable, sostenible y moderna para todos.		
	8. Promover el crecimiento económico sostenido, inclusivo y sostenible, el empleo pleno y productivo y el trabajo decente para todos.		
	9. Construir infraestructuras resilientes, promover la industrialización inclusiva y sostenible y fomentar la innovación.		
	10. Reducir la desigualdad en los países y entre ellos.		
	11. Lograr que las ciudades y los asentamientos humanos sean inclusivos, seguros, resilientes y sostenibles.		
Paz	16. Promover sociedades pacíficas e inclusivas para el desarrollo sostenible, facilitar el acceso a la justicia para todos y construir a todos los niveles institucionales eficaces e inclusivas que rindan cuentas.		
Asociaciones	17. Fortalecer los medios de implementación y revitalizar la Alianza Mundial para el Desarrollo Sostenible		