



# “Efecto de Nanopartículas de plata sobre biofilm de *Candida spp.*”

CRISTIAN CAMILO BETANCOURT RAMIREZ  
CRISTEL ALEJANDRA RAMIREZ DORONSORO



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad De Ciencias De La Salud  
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Trabajo de Grado  
Bogotá D.C.  
2019



**METODOLOGÍA Y RESULTADOS**

1. Síntesis Nanopartículas de Plata "Universidad Central - Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GPESE)"



**MARCO TEÓRICO**

Introducción

**OBJETIVOS**

**ANTECEDENTES**

**INTRODUCCIÓN**

**BIBLIOGRAFÍA**

Bibliografía

**CONCLUSIONES**

Conclusiones

**MIRADORENTOS**

Miradores

**RESULTADOS**


# “Efecto de Nanopartículas de plata sobre biofilm de *Candida spp.*”

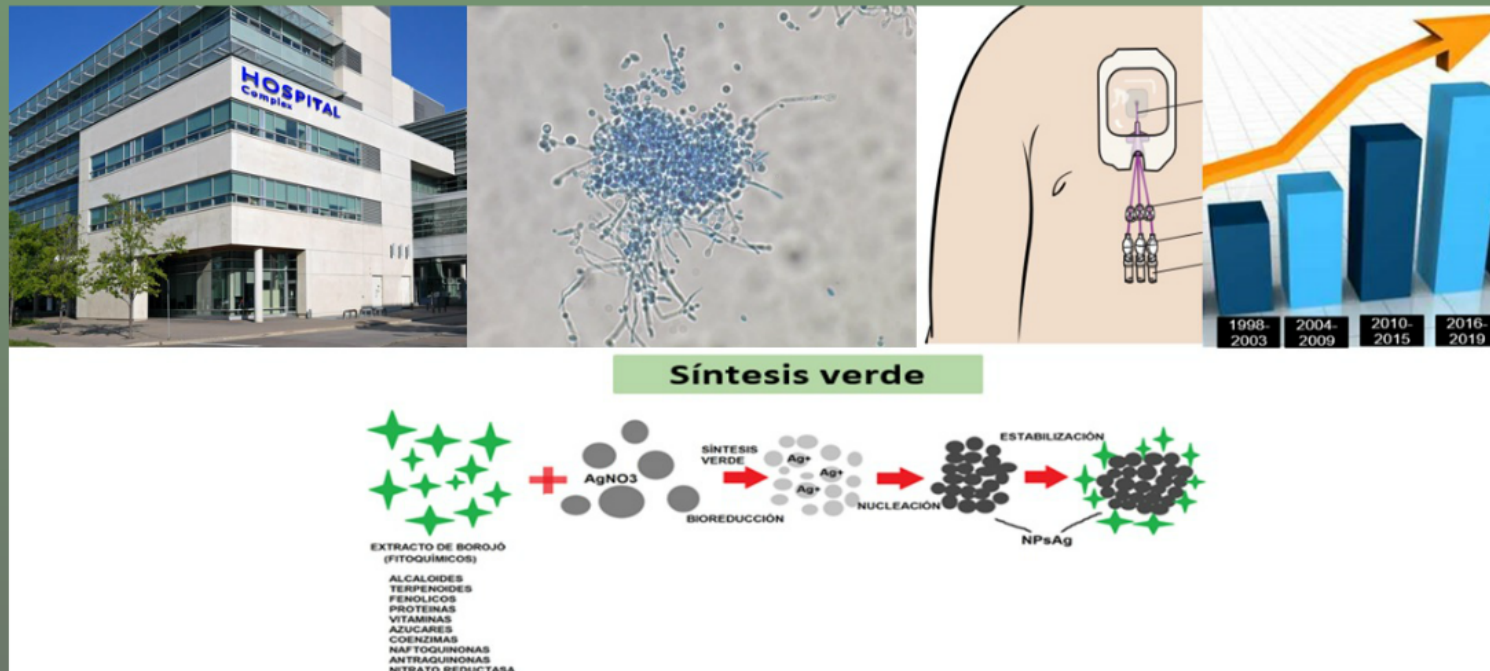
CRISTIAN CAMILO BETANCOURT RAMIREZ  
CRISTEL ALEJANDRA RAMIREZ DORONSORO



Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca  
Facultad De Ciencias De La Salud  
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico  
Trabajo de Grado  
Bogotá D.C.  
2019

# INTRODUCCIÓN

Figura 1: Candida spp en infecciones fungicas y NPsAg

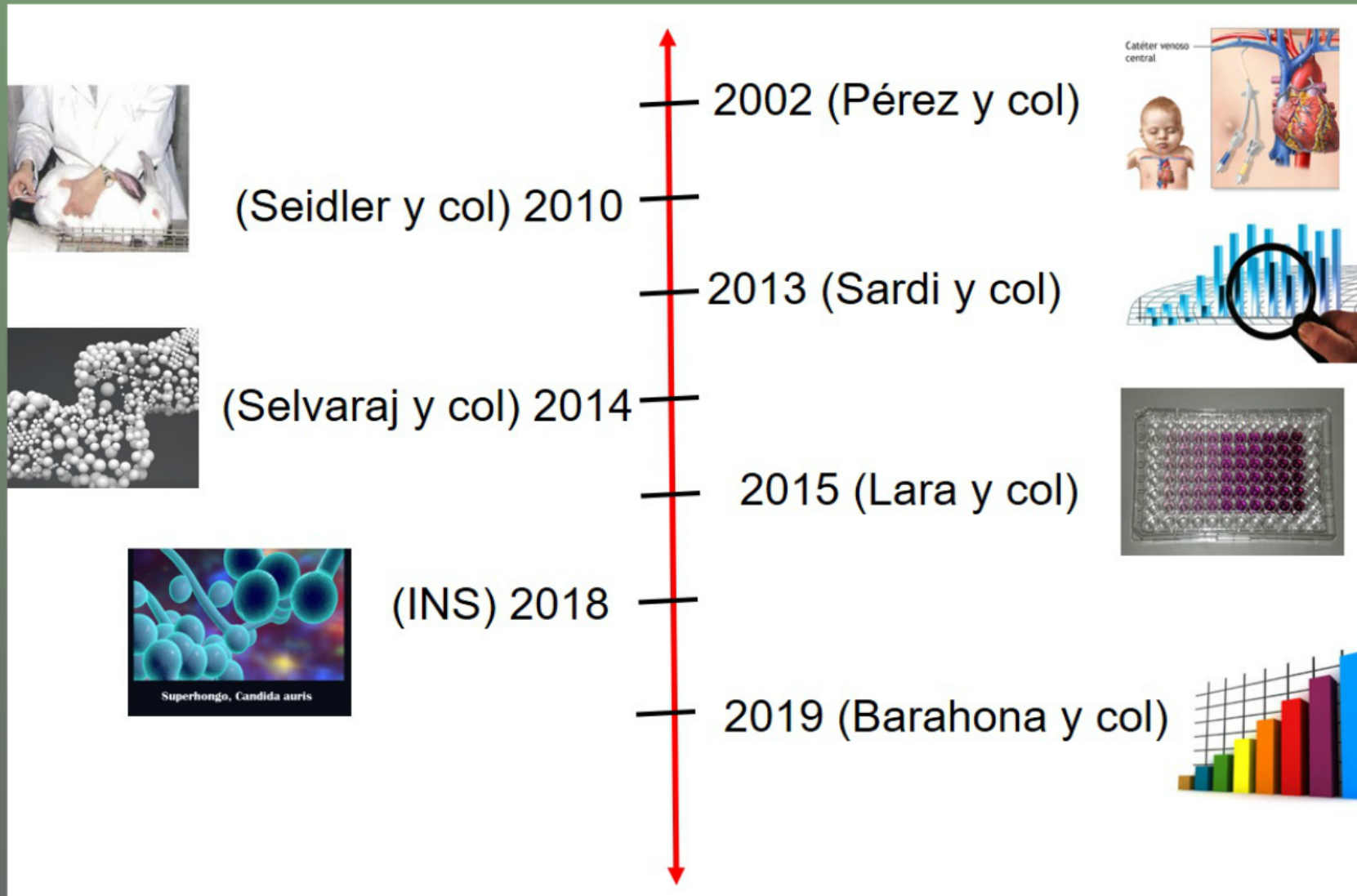


AUTORES

¿Las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde de borjój afectan la formación del biofilm producido por especies de *Candida sp* sobre placas de acrílico?

# ANTECEDENTES

Figura 2: Antecedentes



# MARCO TEÓRICO

## Biofilm *Candida spp*



<http://publish.ucc.ie/boolean/2014/00/koconstantinidou/10/en>

# OBJETIVOS

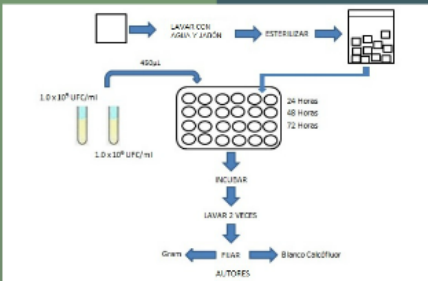
Evaluar el tratamiento con nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde de Borojó sobre biofilm de cepas de *Candida sp.*

- Generar un protocolo para creación de biofilm de *Candida sp.* sobre placas de acrílico.
- Desarrollar protocolos para evaluar la formación e inhibición de biofilm.
- Determinar el efecto inhibitorio sobre biofilm y la concentración mínima inhibitoria de las nanopartículas de plata por medio de lectura por absorbancia utilizando MTT.
- Visualizar el efecto causado por nanopartículas de plata sobre biofilm por medio de microscopia electrónica de barrido.

# METODOLOGÍA Y RESULTADOS

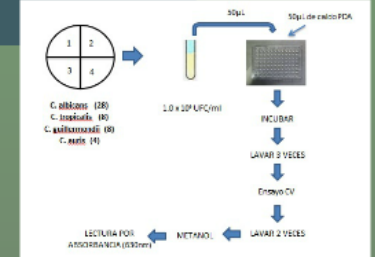
## 3. FORMACIÓN DE BIOFILM EN ACRÍLICOS

Figura 7: Protocolo Formación de Biofilm

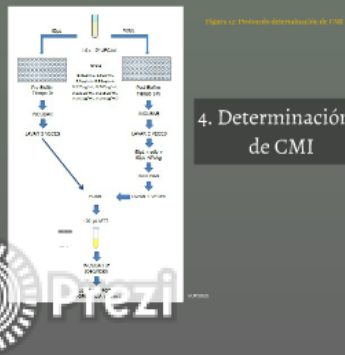


## 2. Selección de cepas.

Figura 6: Protocolo selección de cepas



# 1. Síntesis Nanopartículas de Plata “Universidad Central - Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE)



## 4. Determinación de CMI

## 5. EFECTO DE NPsAg SOBRE BIOFILM EVALUADO CON BLANCO DE CALCOFLUÓR

Figura 21: Evaluación efecto de NPsAg por BI

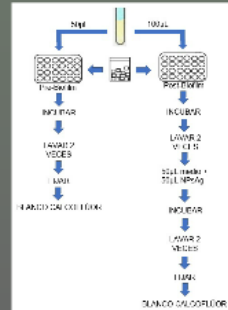
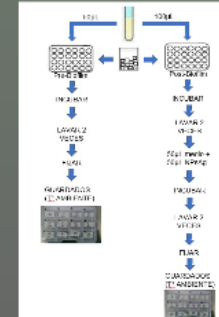


Figura 20: Evaluación del efecto NPsAg por SEM



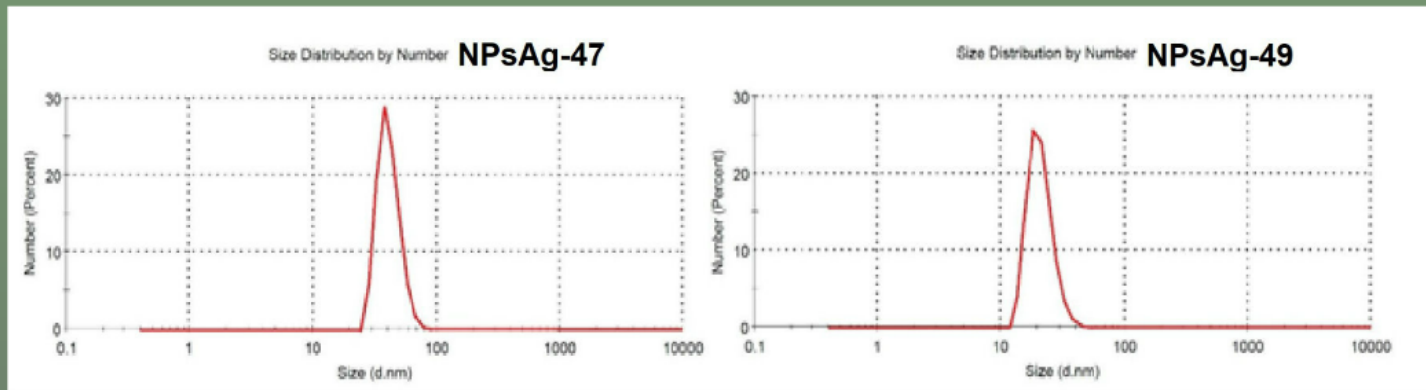
## 6. EFECTO DE NPsAg SOBRE BIOFILM EVALUADO CON MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO SEM

Universidad Nacional - Laboratorio de Geología



# SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NPsAg

Distribución del número de NPsAg de acuerdo al tamaño



Universidad Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE)

Figura 4: Distribución del número de NPsAg de acuerdo al tamaño Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE)

## Microscopia SEM de las NPsAg.

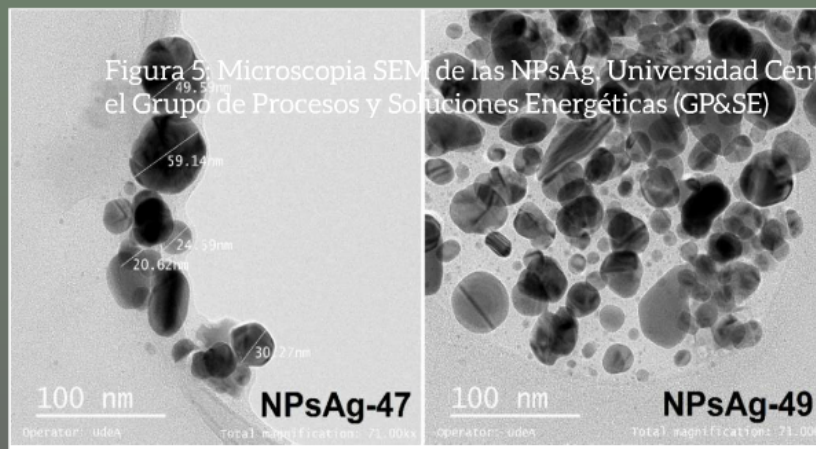


Figura 5: Microscopia SEM de las NPsAg. Universidad Central por el Grupo de Procesos y Soluciones Energéticas (GP&SE)

Vazquez y Col, tamaño ideal de 3-60 nm

Universidad Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE)

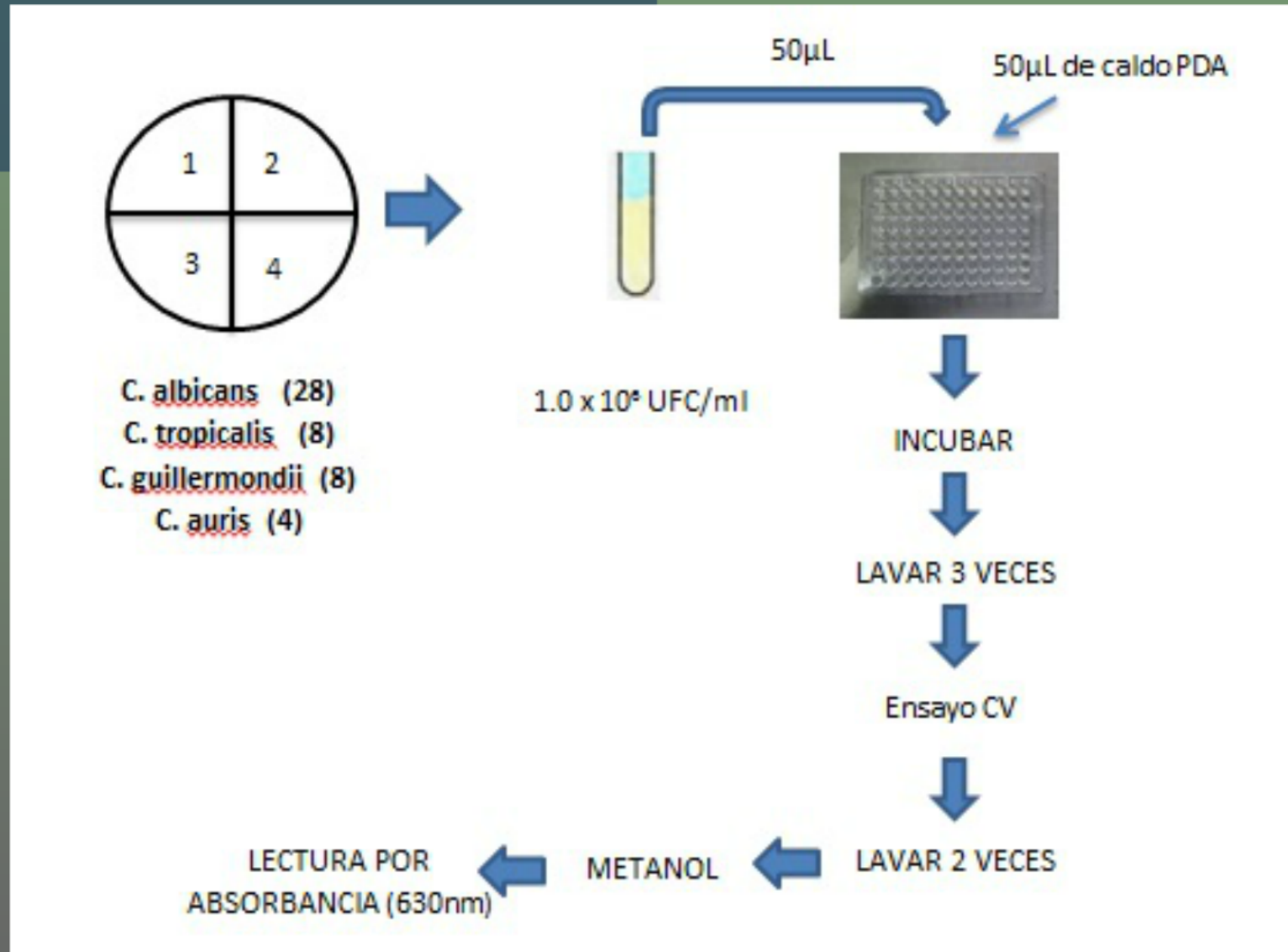
Figura 5: Microscopia SEM de las NPsAg. Universidad Central por el Grupo de Procesos y Soluciones Energéticas (GP&SE)





# 2. Selección de cepas.

Figura 6 : Protocolo selección de cepas



# SELECCIÓN DE CEPAS

Lectura 360 NM			
Levadura	Ensayo 1	Ensayo 2	Promedio
<i>C. albicans</i> 1	0.091	-0.024	
<i>C. albicans</i> 2	0.151	0.146	0.148
<i>C. albicans</i> 3	0.162	0.135	0.149
<b><i>C. albicans</i> 4</b>	<b>0.203</b>	<b>0.136</b>	<b>0.169</b>
<i>C. albicans</i> 5	0.180	0.128	0.154
<i>C. albicans</i> 6	0.174	0.141	0.157
<i>C. albicans</i> 7	0.177	0.135	0.156
<i>C. albicans</i> 8	0.096	0.135	0.115
<i>C. albicans</i> 9	0.020	-0.013	
<i>C. albicans</i> 10	-0.004	-0.019	
<i>C. albicans</i> 11	0.019	-0.009	
<i>C. albicans</i> 12	0.028	0.002	0.015
<i>C. albicans</i> 13	0.004	-0.040	
<i>C. albicans</i> 14	0.064	0.150	0.107
<i>C. albicans</i> 15	0.175	0.147	0.161
<i>C. albicans</i> 16	0.180	0.150	0.166
<i>C. albicans</i> 17	0.185	0.148	0.166
<i>C. albicans</i> 18	0.167	0.159	0.163

<i>C. albicans</i> 19	0.187	0.150	0.167
<i>C. albicans</i> 20	0.159	0.171	0.165
<i>C. albicans</i> 21	0.151	0.146	0.148
<i>C. albicans</i> 22	0.117	0.055	0.086
<i>C. albicans</i> 23	0.162	0.141	0.151
<i>C. albicans</i> 24	0.156	0.143	0.149
<i>C. albicans</i> 25	-0.038	-0.058	
<i>C. albicans</i> 26	0.125	0.124	0.124
<i>C. albicans</i> 27	0.144	0.132	0.138
<i>C. albicans</i> 28	0.158	0.144	0.151

<i>C. guillemondii</i> 31	0.164	0.153	0.158
<i>C. guillemondii</i> 32	0.158	0.144	0.151
<i>C. guillemondii</i> 33	0.176	0.140	0.157
<i>C. guillemondii</i> 34	0.164	0.137	0.150
<i>C. guillemondii</i> 35	0.136	0.147	0.141
<i>C. guillemondii</i> 36	0.158	0.149	0.153
<i>C. guillemondii</i> 37	0.080	0.134	0.107
<i>C. guillemondii</i> 38	0.149	0.163	0.156

<i>C. auris</i> 51	0.062	0.073	0.067
<i>C. auris</i> 52	0.031	0.031	0.031
<i>C. auris</i> 53	0.016	0.013	0.014
<i>C. auris</i> 54	0.030	0.036	0.033

<i>C. tropicalis</i> 41	0.155	0.149	0.152
<i>C. tropicalis</i> 42	0.149	0.154	0.151
<i>C. tropicalis</i> 43	0.153	0.152	0.152
<i>C. tropicalis</i> 44	0.140	0.155	0.147
<i>C. tropicalis</i> 45	0.158	0.149	0.153
<b><i>C. tropicalis</i> 46</b>	<b>0.214</b>	<b>0.135</b>	<b>0.174</b>
<i>C. tropicalis</i> 47	0.162	0.150	0.156
<i>C. tropicalis</i> 48	-0.072	0.161	

Tabla 1: Absorbancias obtenidas por 48 cepas

## CEPAS PRODUCTORAS DE BIOFILM SELECCIONADAS

Tabla 2: Cepas productoras de Biofilm seleccionadas.

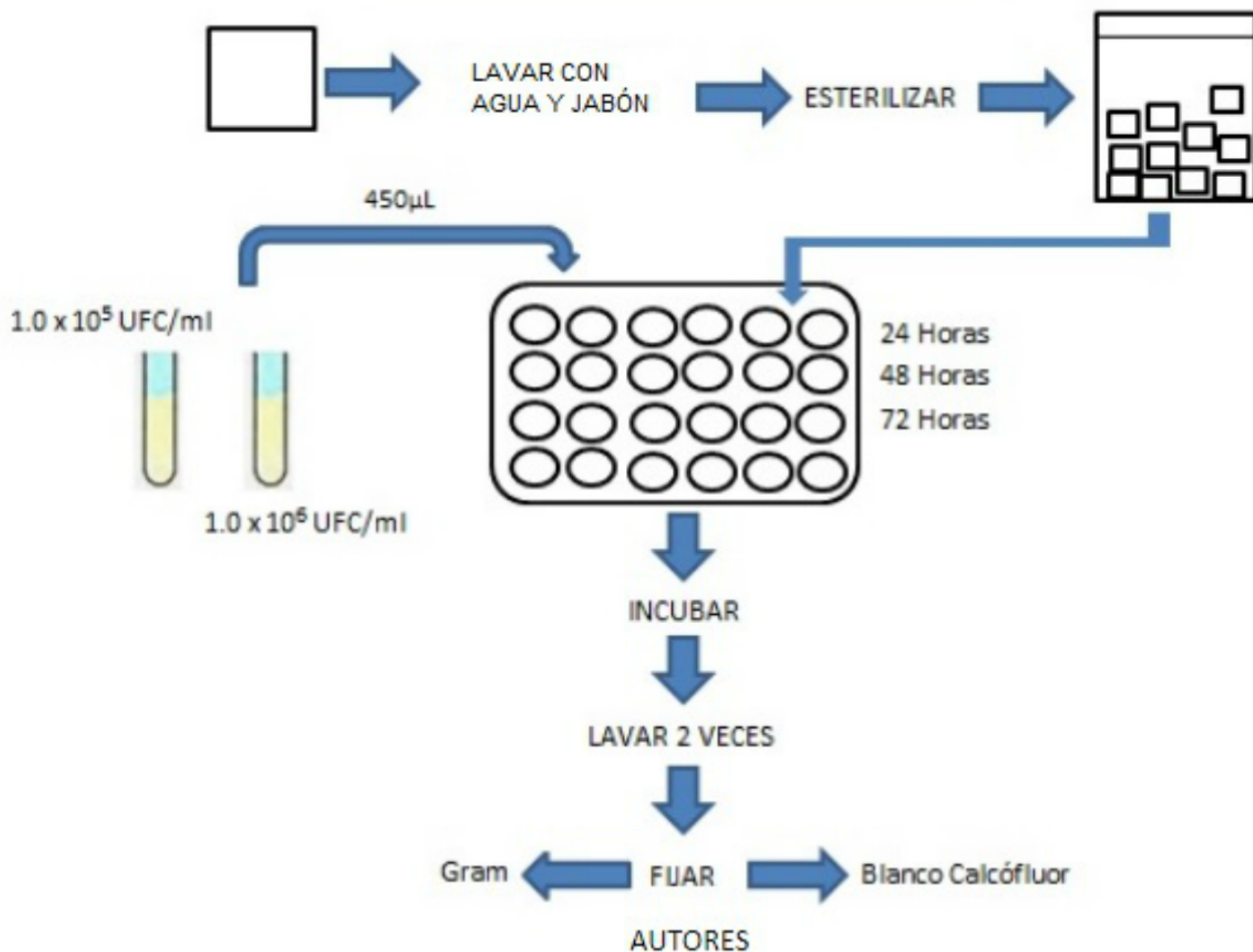
Microorganismo	Absorbancia a 360nm
<i>C. albicans</i> (4)	0.164
<i>C. guilliermondii</i> (31)	0.158
<i>C. tropicalis</i> (46)	0.174
<i>C. auris</i> (51)	0.067

Monteiro y Col. Candida son fuertes productoras de biofilm

Hassan y col. 64.7% de Candida spp productores fuertes de biofilm y 36.3% formadores débiles de biofilm.

# 3. FORMACIÓN DE BIOFILM EN ACRILICOS

Figura 7: Protocolo Formación de Biofilm



# FORMACIÓN DE BIOFILM EN ACRILICOS

Figura 8: Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de *Candida albicans*.

## *Candida albicans*

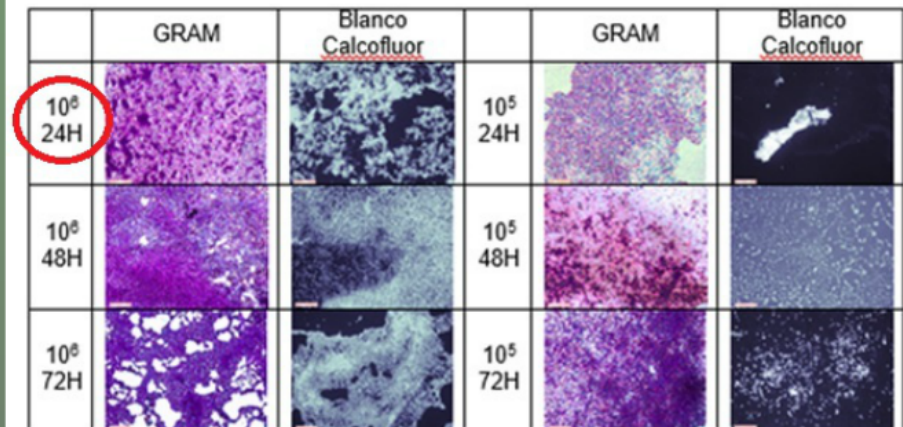
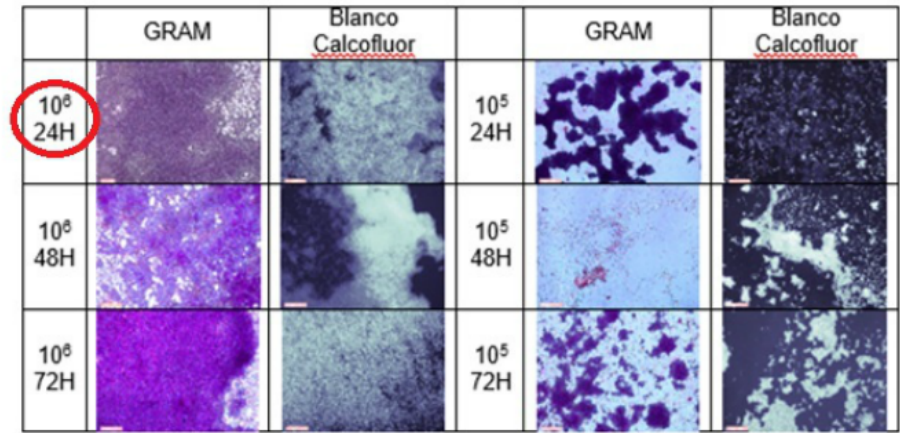


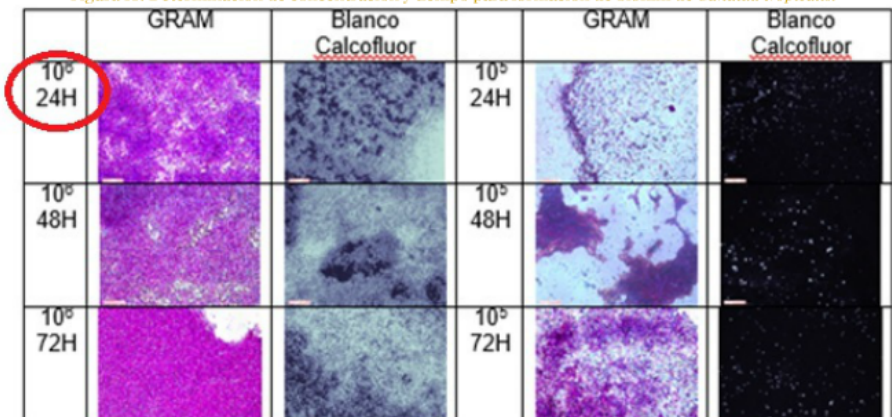
Figura 9: Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de *Candida guilliermondii*.

## *Candida guilliermondii*



## *Candida tropicalis*

Figura 10: Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de *Candida tropicalis*.



Aggarwal y Col.

## *Candida auris*

Figura 11: Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de *Candida auris*.

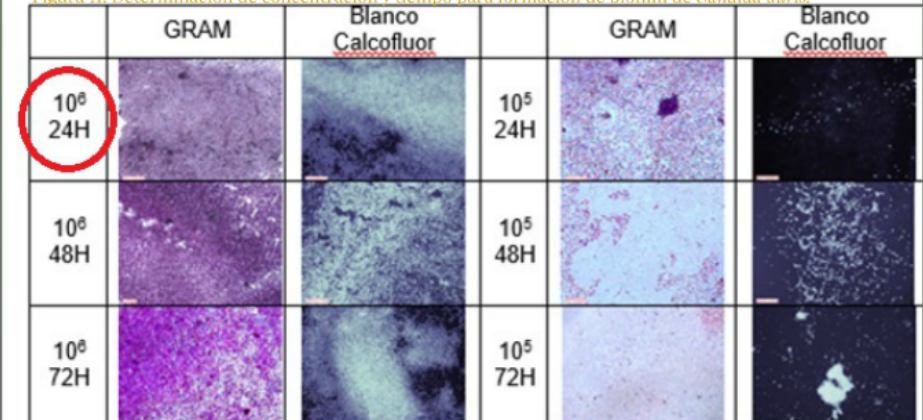


Figura 8: Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de *Candida albicans*.

# *Candida albicans*

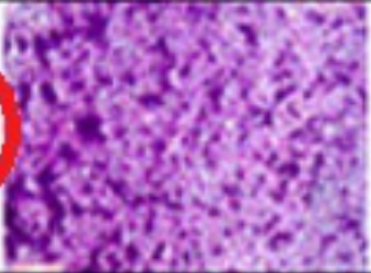

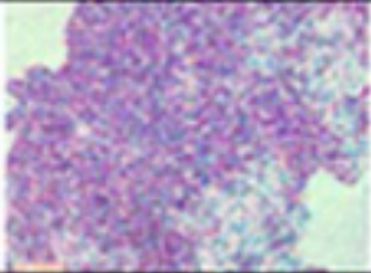

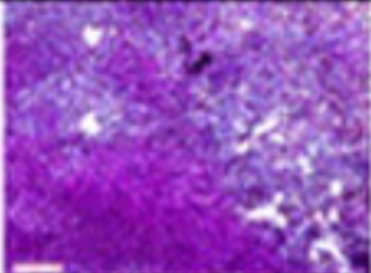
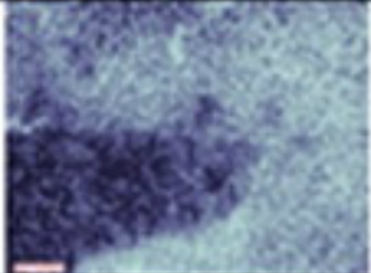
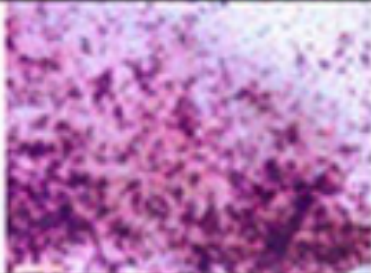
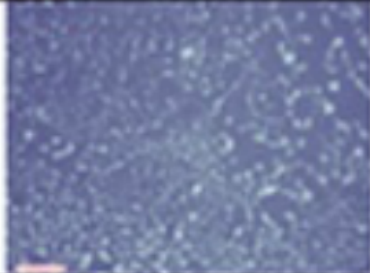
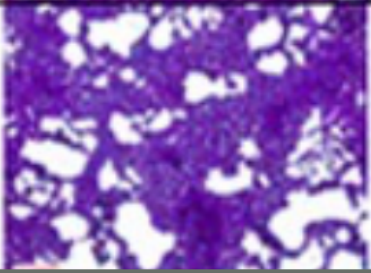
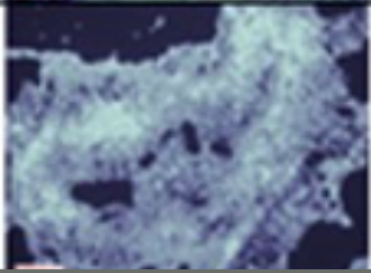
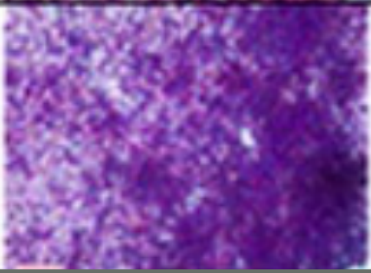

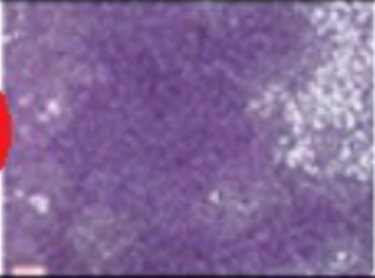
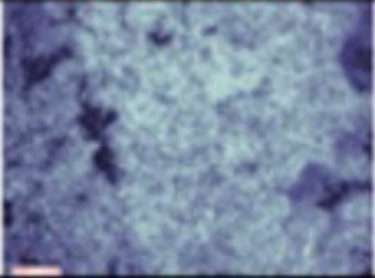
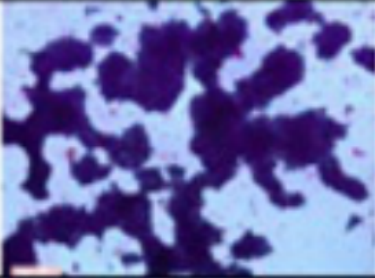
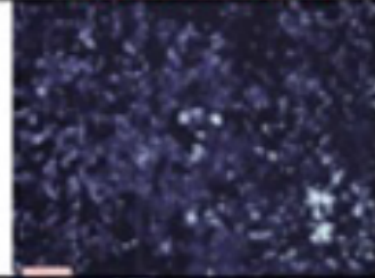
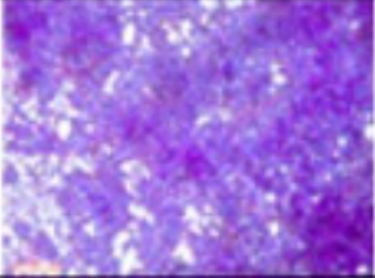

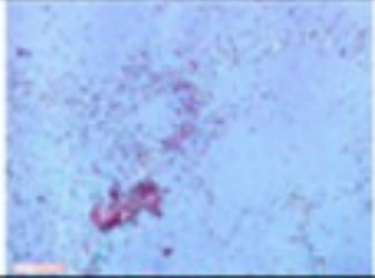
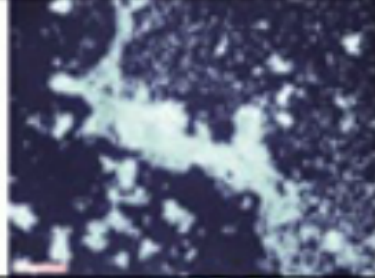
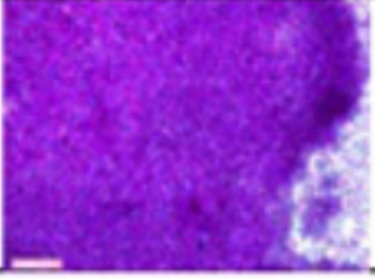

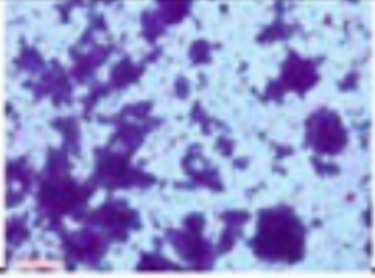
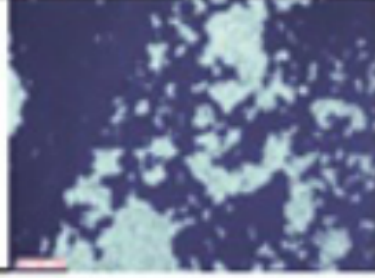
	GRAM	<u>Blanco</u> <u>Calcofluor</u>		GRAM	<u>Blanco</u> <u>Calcofluor</u>
<b>10<sup>6</sup></b> 24H			10 <sup>5</sup> 24H		
10 <sup>6</sup> 48H			10 <sup>5</sup> 48H		
10 <sup>6</sup> 72H			10 <sup>5</sup> 72H		

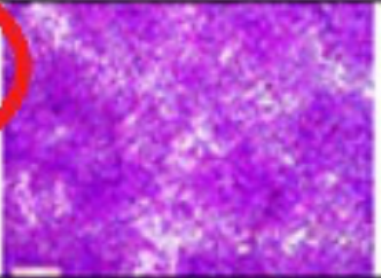
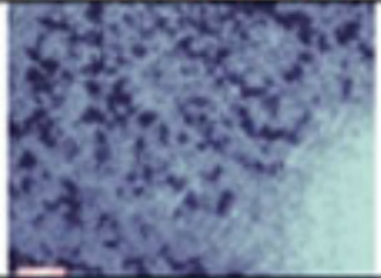
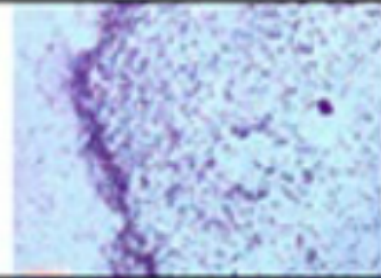

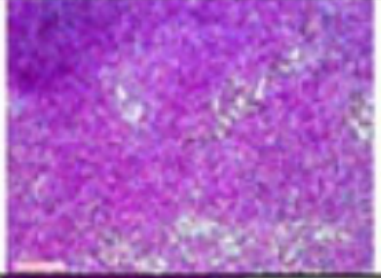
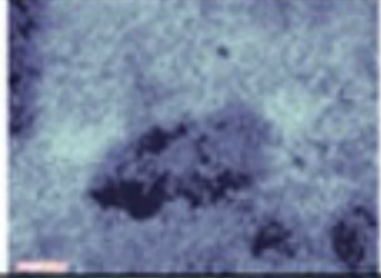
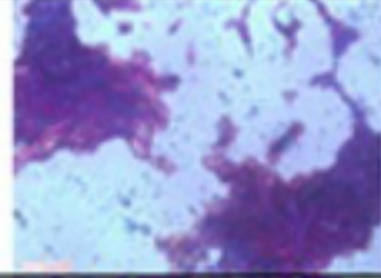


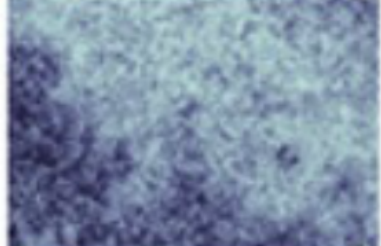
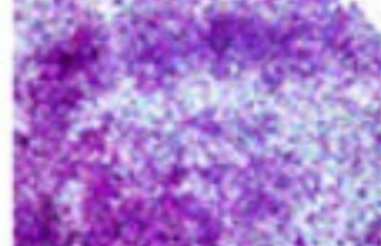

Figura 9: Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de *Candida guilliermondii*.

# *Candida guilliermondii*

	GRAM	Blanco <u>Calcofluor</u>		GRAM	Blanco <u>Calcofluor</u>
<b>10<sup>6</sup> 24H</b>			10 <sup>5</sup> 24H		
10 <sup>6</sup> 48H			10 <sup>5</sup> 48H		
10 <sup>6</sup> 72H			10 <sup>5</sup> 72H		

# *Candida tropicalis*

Figura 10: Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de *Candida tropicalis*.

	GRAM	Blanco <u>Calcofluor</u>		GRAM	Blanco <u>Calcofluor</u>
<b>10<sup>5</sup> 24H</b>			10 <sup>5</sup> 24H		
10 <sup>5</sup> 48H			10 <sup>5</sup> 48H		
10 <sup>5</sup> 72H			10 <sup>5</sup> 72H		



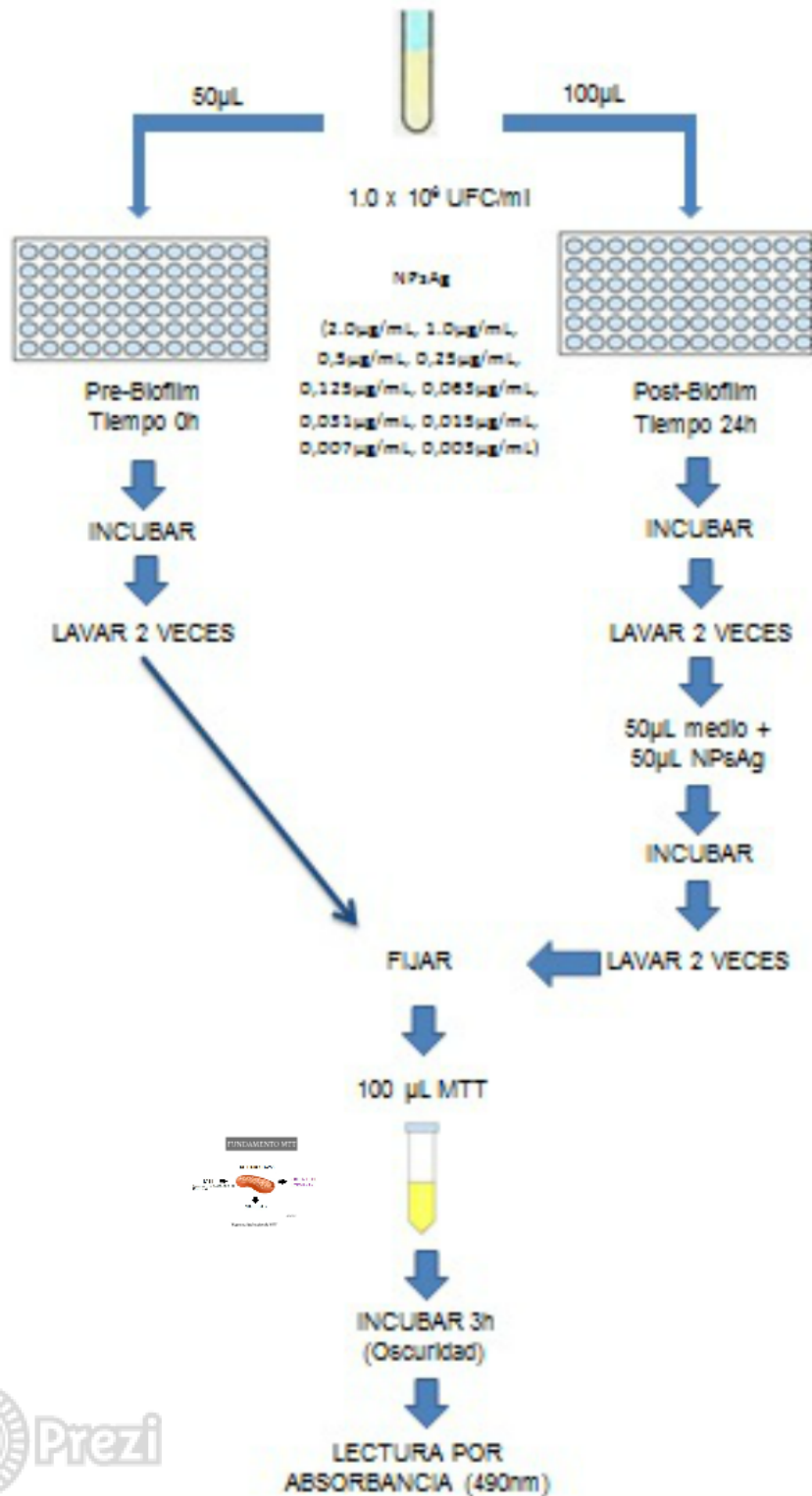
Aggarwal y Col.

# *Candida auris*

Figura 11: Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de *Candida auris*.

	GRAM	Blanco Calcofluor		GRAM	Blanco Calcofluor
<b>10<sup>6</sup> 24H</b>			10 <sup>5</sup> 24H		
10 <sup>6</sup> 48H			10 <sup>5</sup> 48H		
10 <sup>6</sup> 72H			10 <sup>5</sup> 72H		

Figura 12: Protocolo determinación de CMI



# 4. Determinación de CMI

# FUNDAMENTO MTT



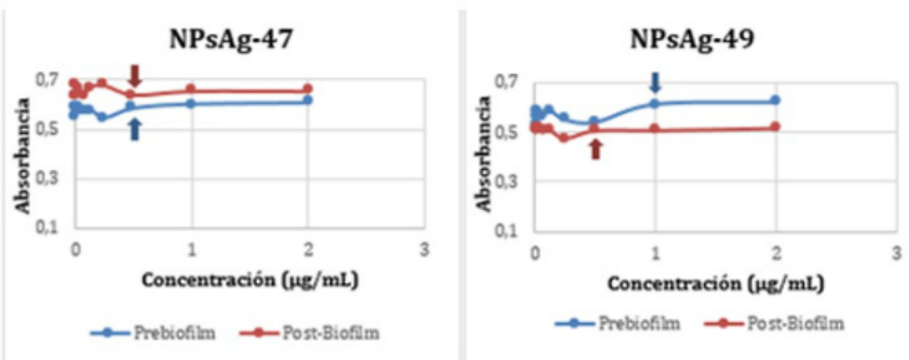
AUTORES

Figura 13: Reducción de MTT

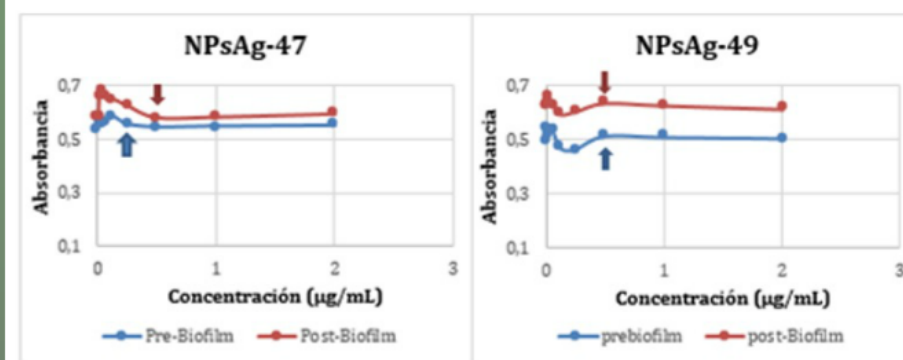
# DETERMINACIÓN DE MIC NPsAg-47 Y NPsAg-49

Figura 14: Gráficos de dispersión para la determinación de CMI de las NPsAg-47 y NPsAg-49 para *Candida spp.*

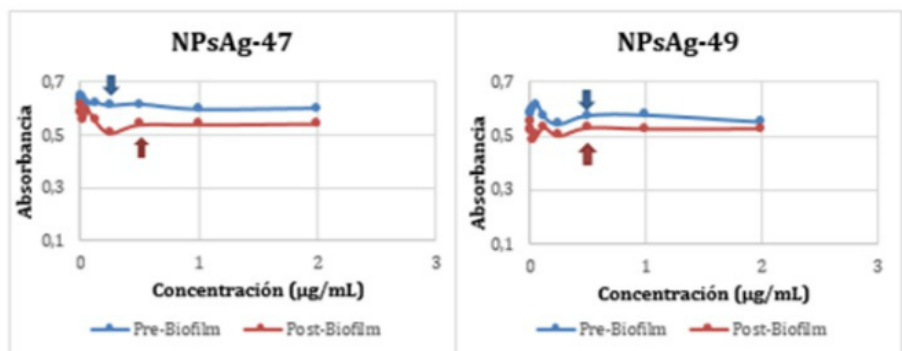
## *Candida albicans*



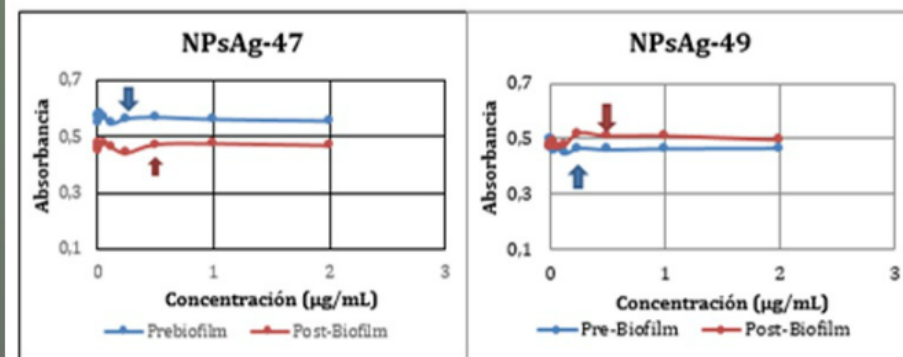
## *Candida guilliermondii*



## *Candida tropicalis*

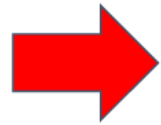


## *Candida auris*



● MIC para NPsAg-47 y NPsAg-49

Especie	NPsAg-47 (MIC µg/mL)	NPsAg-49 (MIC µg/mL)
<i>C. albicans</i>	0.5	0.5
<i>C. guilliermondii</i>	0.5	0.5
<i>C. tropicalis</i>	0.5	0.5
<i>C. auris</i>	0.5	0.5



## MIC para NPsAg-47 y NPsAg-49

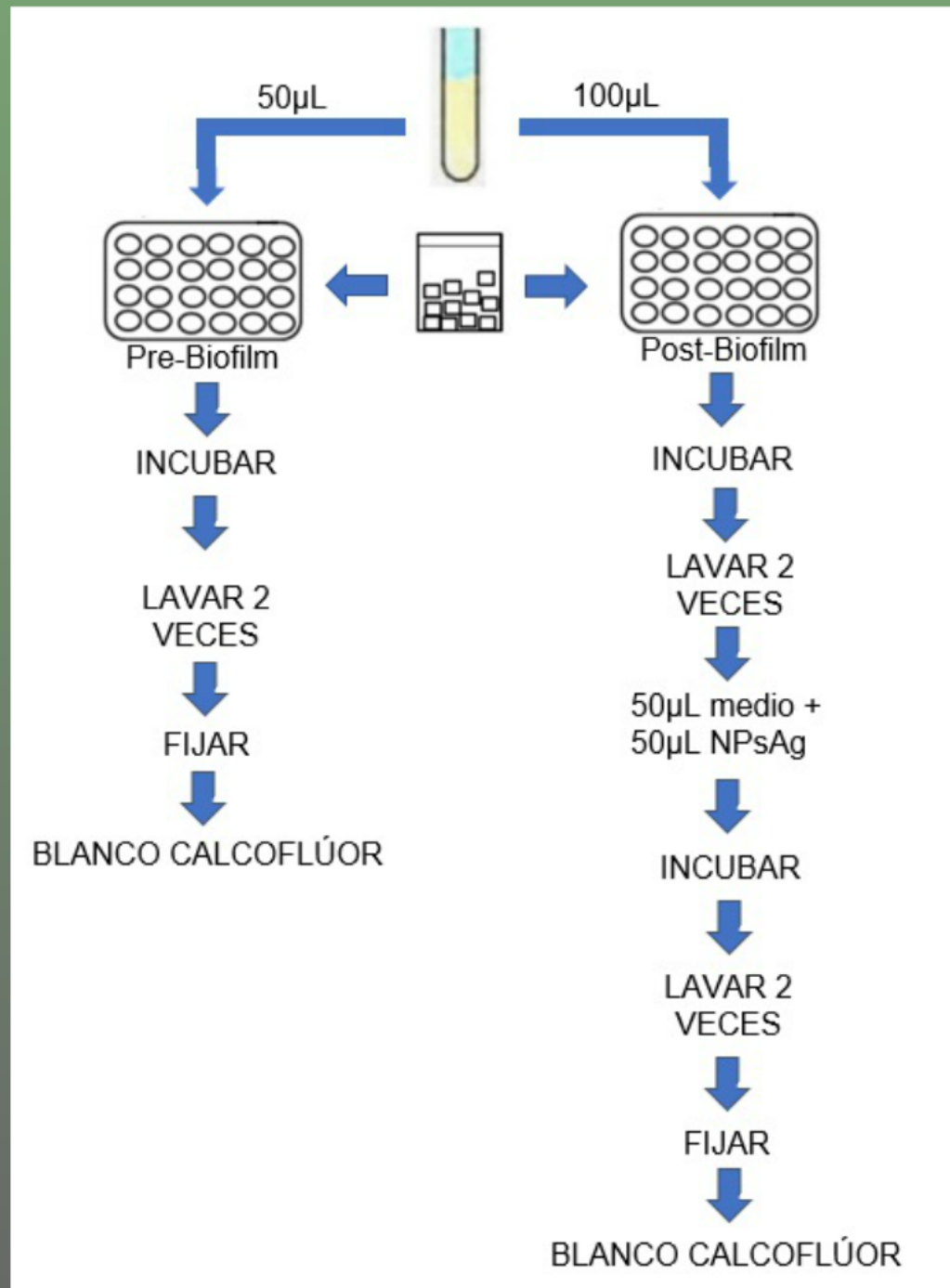
Microorganismos	NPsAg-47		NPsAg-49	
	Pre-biofilm	Post-biofilm	Pre-biofilm	Post-biofilm
<i>Candida albicans</i>	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	1,0 µg/mL	0,5 µg/mL
<i>Candida guilliermondii</i>	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL
<i>Candida tropicalis</i>	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL
<i>Candida auris</i>	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL

Tabla 3: Resultado de CMI para NPsAg.

Wang y col. (MIC) de 2.0 mg/ml en *C. albicans*

Figura 15: Evaluación efecto de NPsAg por BC

# 5. EFECTO DE NPsAg SOBRE BIOFILM EVALUADO CON BLANCO DE CALCOFLÚOR



# EFECTO DE NPsAg SOBRE BIOFILM EVALUADO CON BLANCO DE CALCOFLÚOR

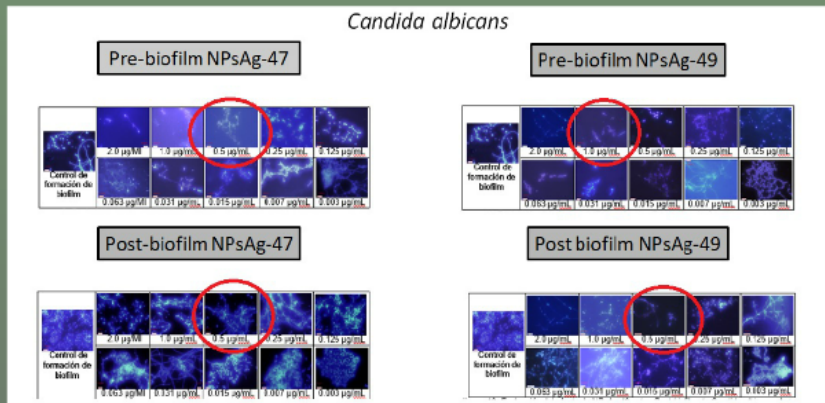
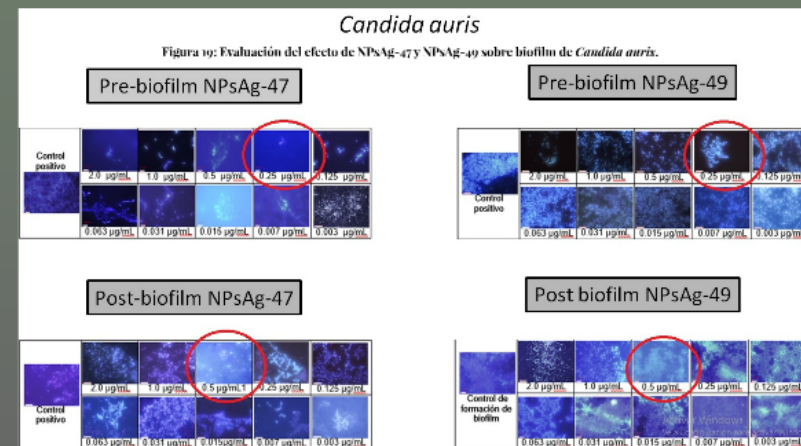
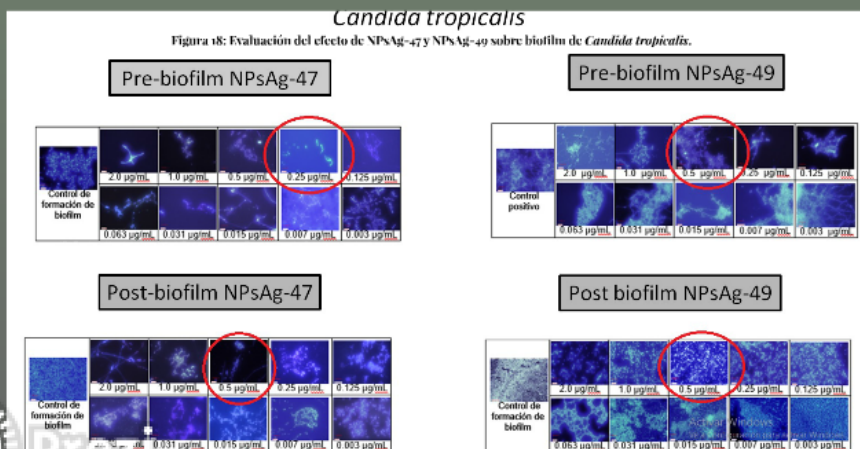
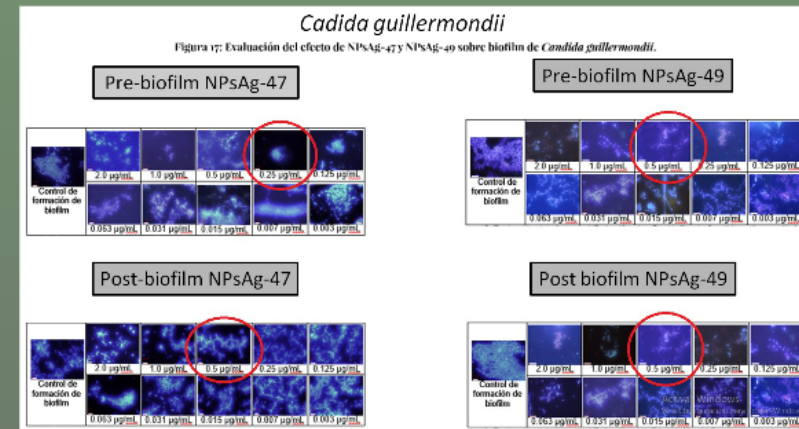
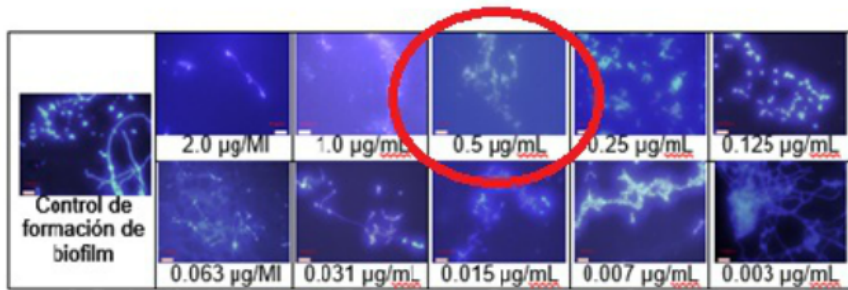


Figura 16: Evaluación del efecto de NPsAg-47 y NPsAg-49 sobre biofilm de *Candida albicans*.

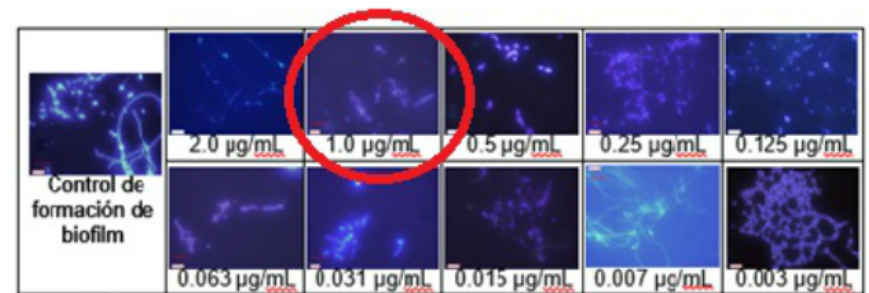


## *Candida albicans*

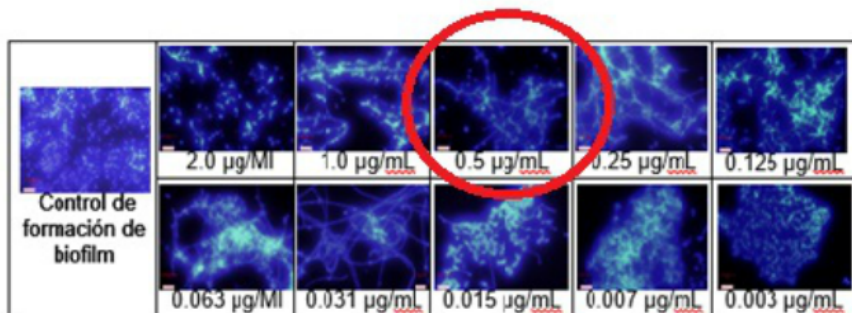
### Pre-biofilm NPsAg-47



### Pre-biofilm NPsAg-49



### Post-biofilm NPsAg-47



### Post biofilm NPsAg-49

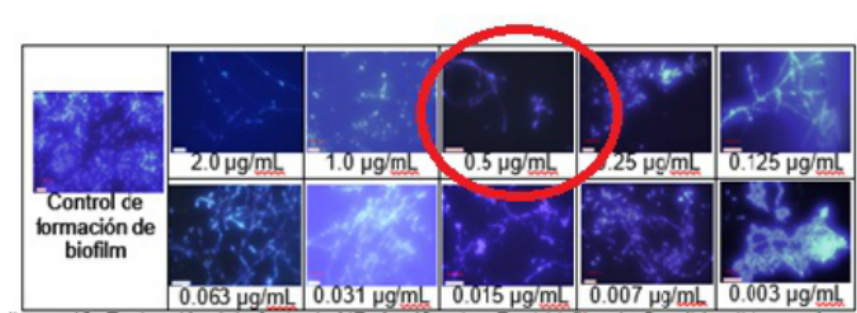


Figura 16: Evaluación del efecto de NPsAg-47 y NPsAg-49 sobre biofilm de *Candida albicans*.

## *Candida tropicalis*

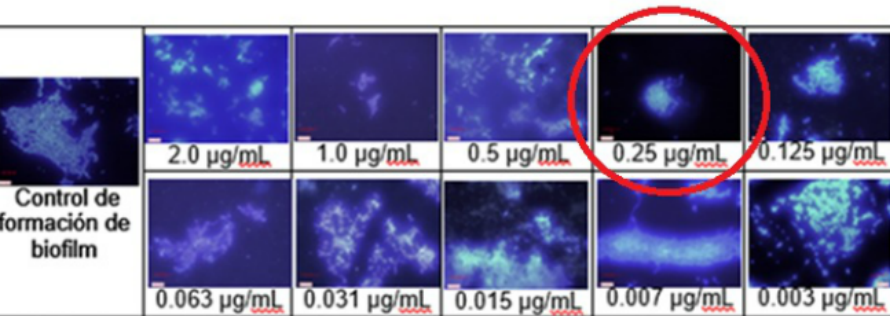
Figura 18: Evaluación del efecto de NPsAg-47 y NPsAg-49 sobre biofilm de *Candida tropicalis*.



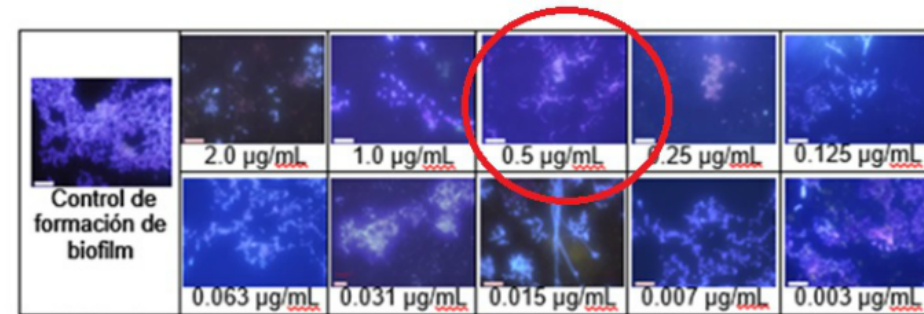
# *Candida guilliermondii*

Figura 17: Evaluación del efecto de NPsAg-47 y NPsAg-49 sobre biofilm de *Candida guilliermondii*.

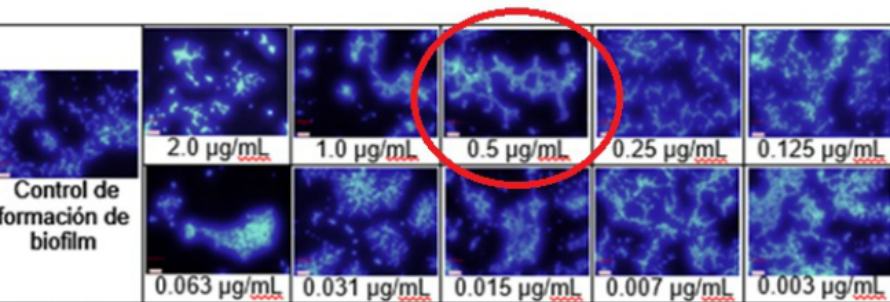
## Pre-biofilm NPsAg-47



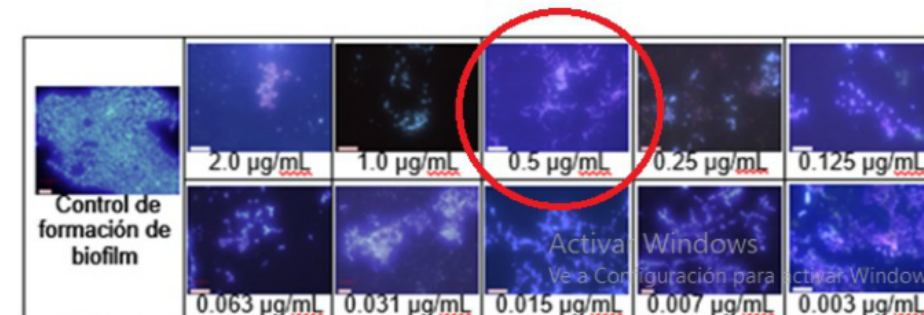
## Pre-biofilm NPsAg-49



## Post-biofilm NPsAg-47



## Post biofilm NPsAg-49



biofilm



biofilm

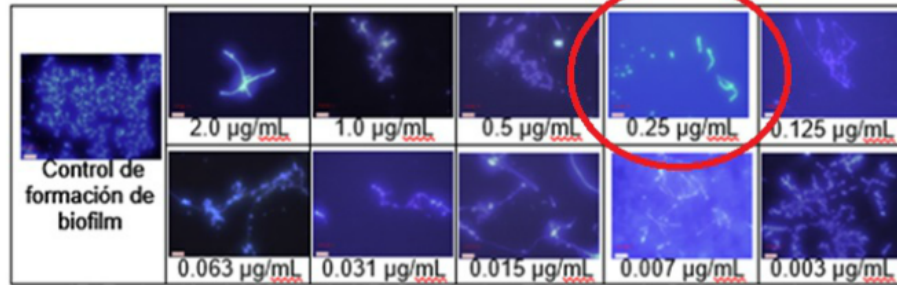


Figura 16: Evaluación del efecto de NPsAg-47 y NPsAg-49 sobre biofilm de *Candida albicans*.

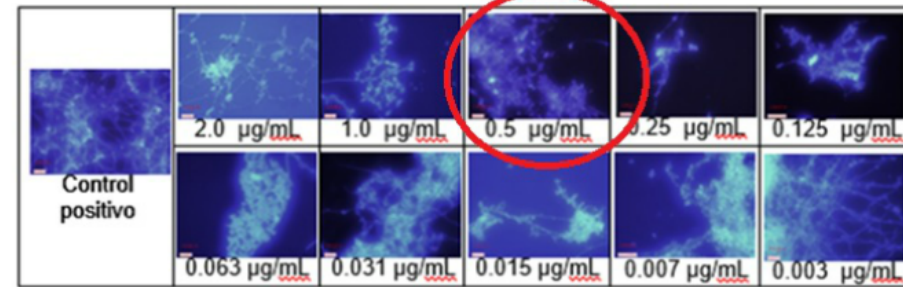
## *Candida tropicalis*

Figura 18: Evaluación del efecto de NPsAg-47 y NPsAg-49 sobre biofilm de *Candida tropicalis*.

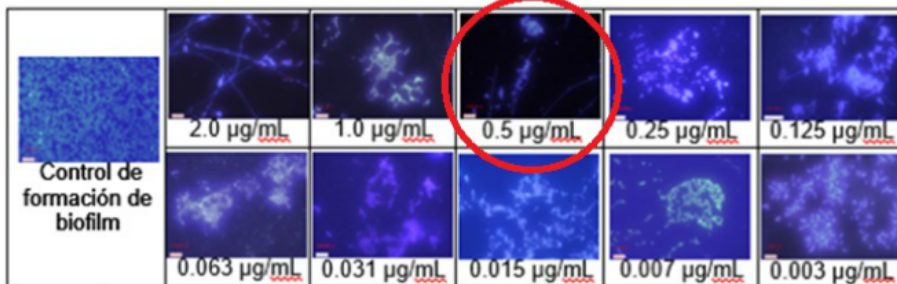
Pre-biofilm NPsAg-47



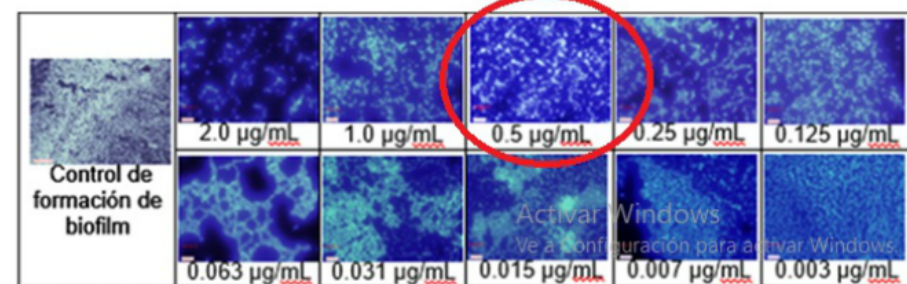
Pre-biofilm NPsAg-49



Post-biofilm NPsAg-47



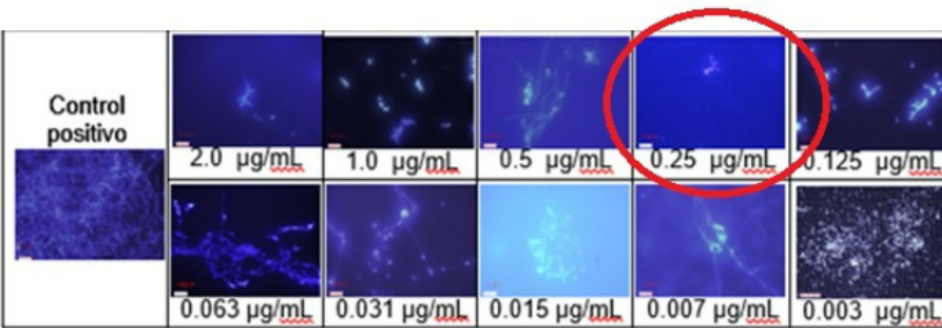
Post biofilm NPsAg-49



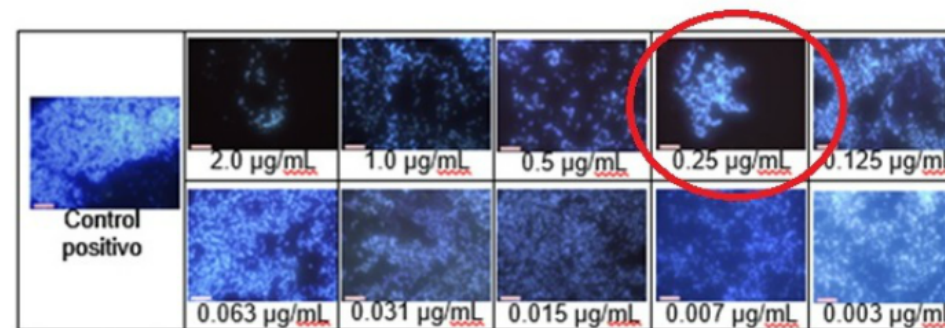
# Candida auris

Figura 19: Evaluación del efecto de NPsAg-47 y NPsAg-49 sobre biofilm de *Candida auris*.

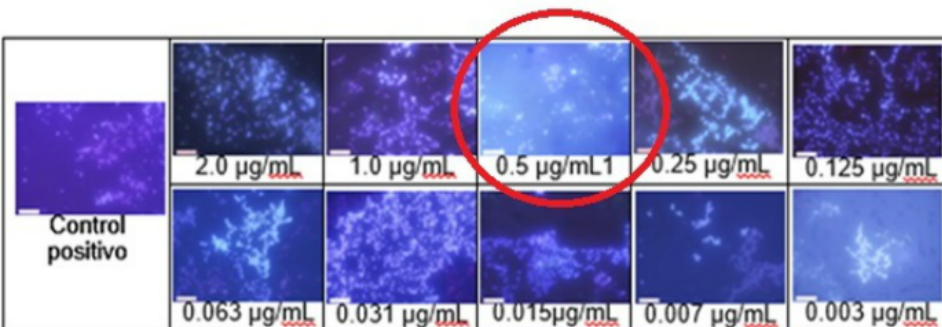
## Pre-biofilm NPsAg-47



## Pre-biofilm NPsAg-49



## Post-biofilm NPsAg-47



## Post biofilm NPsAg-49

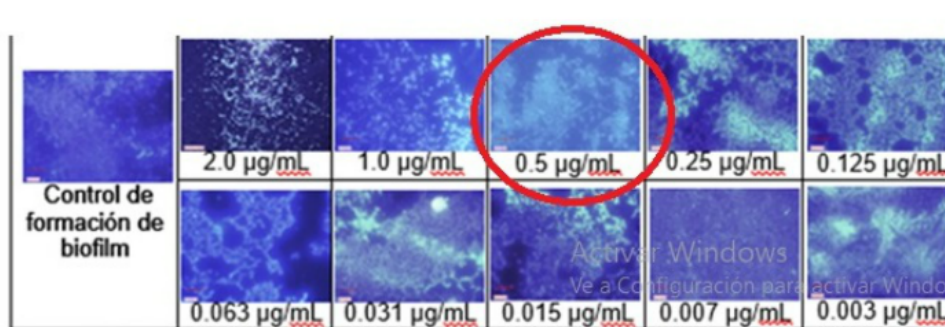


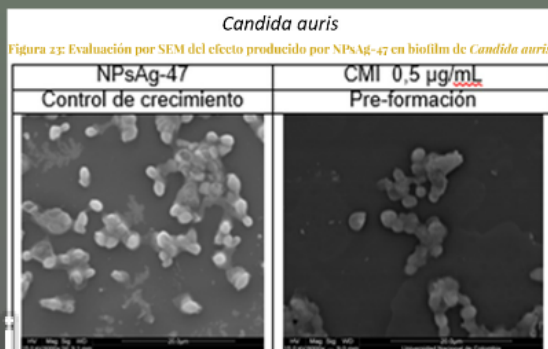
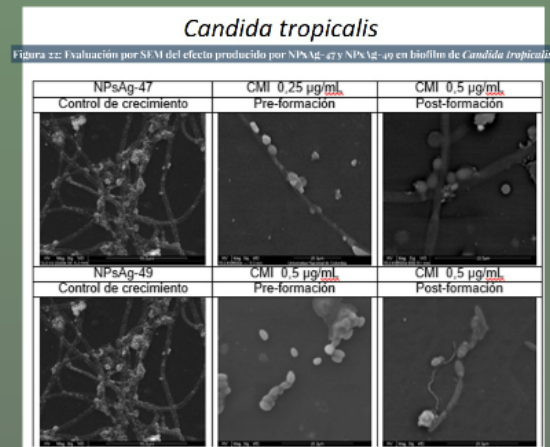
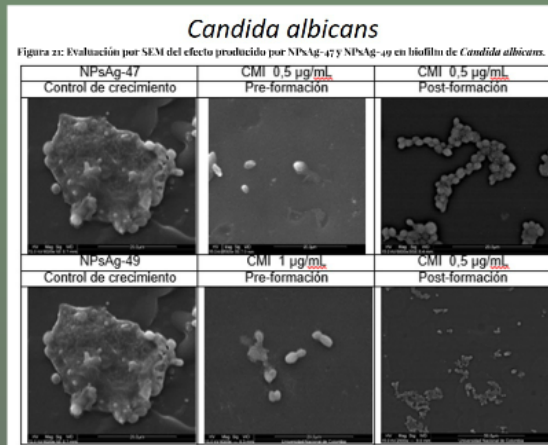
Figura 20: Evaluación del efecto NPsAg por SEM



## 6. EFECTO DE NPsAg SOBRE BIOFILM EVALUADO CON MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO SEM

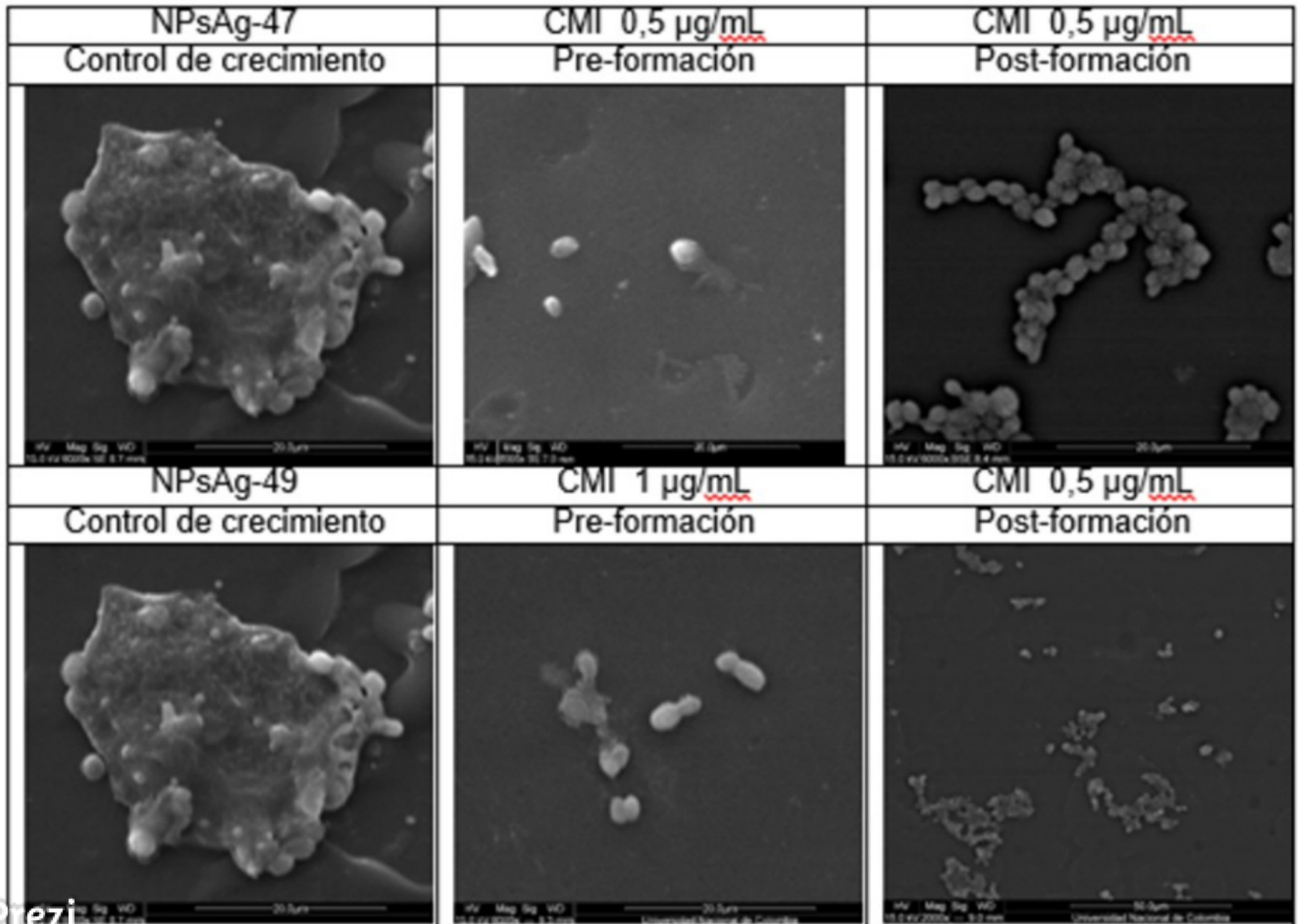
Universidad Nacional-  
Laboratorio de Geología

# EFECTO DE NPsAg SOBRE BIOFILM EVALUADO CON MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO (SEM)



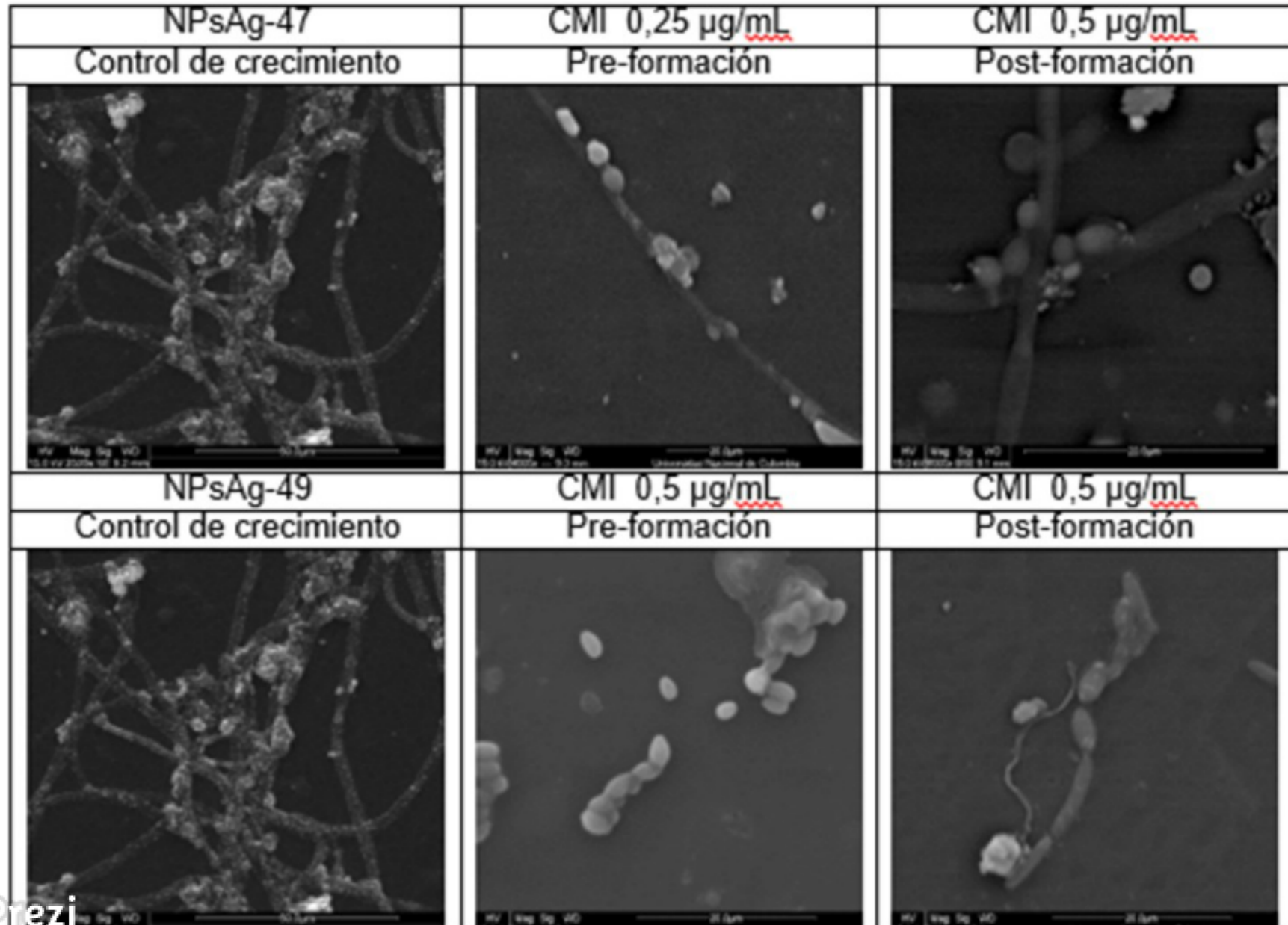
# *Candida albicans*

Figura 21: Evaluación por SEM del efecto producido por NPsAg-47 y NPsAg-49 en biofilm de *Candida albicans*.



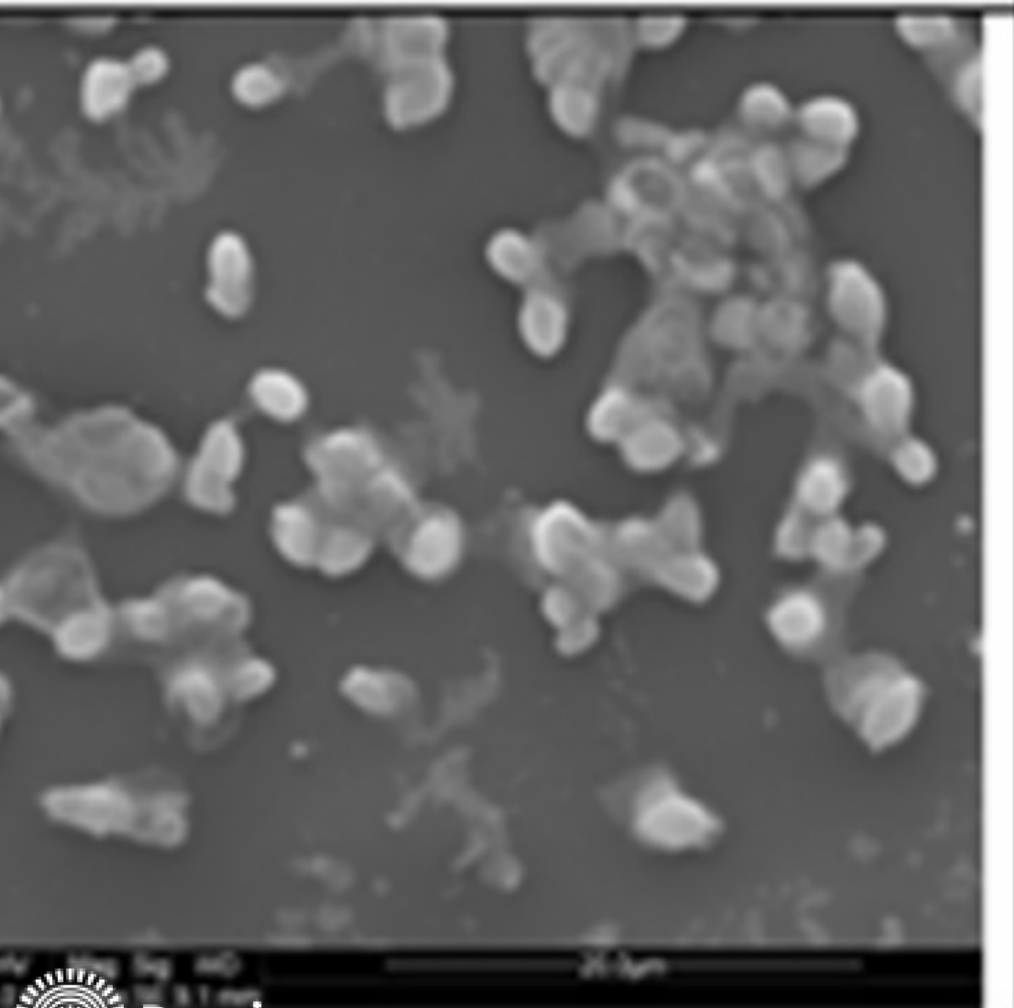
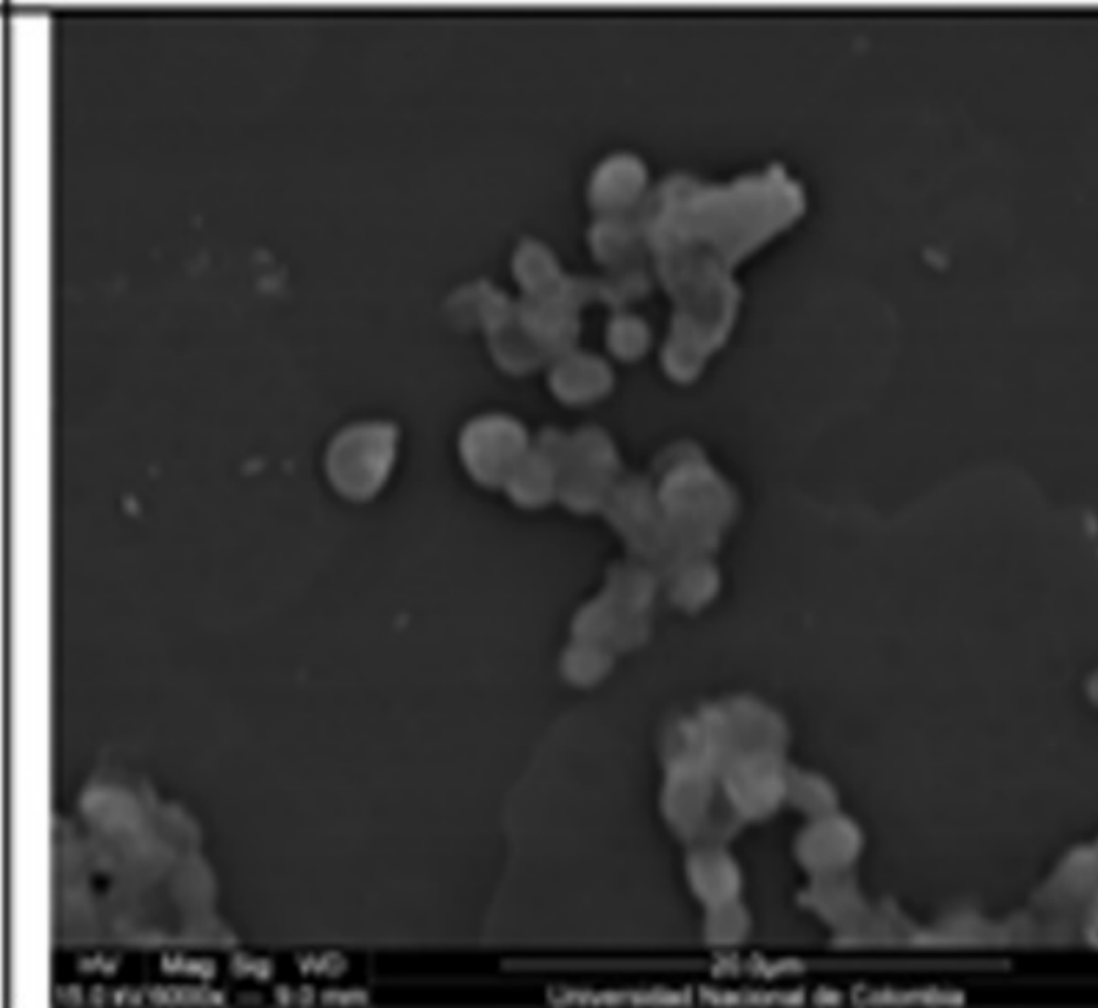
# *Candida tropicalis*

Figura 22: Evaluación por SEM del efecto producido por NPsAg-47 y NPsAg-49 en biofilm de *Candida tropicalis*.



# *Candida auris*

Figura 23: Evaluación por SEM del efecto producido por NPsAg-47 en biofilm de *Candida auris*

NPsAg-47	CMI 0,5 $\mu\text{g/mL}$
Control de crecimiento	Pre-formación
 Scanning electron micrograph (SEM) showing a dense population of Candida auris cells. The cells are mostly oval-shaped and appear to be in various stages of growth, forming a thick, interconnected network. The background is dark, and the cells are light gray. A scale bar at the bottom right indicates 20 μm. Technical data at the bottom left includes: HV 15.0 kV, Mag 5000x, Sig 10.0, WD 9.2 mm.	 Scanning electron micrograph (SEM) showing a sparse population of Candida auris cells. The cells are mostly oval-shaped and appear to be in various stages of growth, forming a thin, disconnected network. The background is dark, and the cells are light gray. A scale bar at the bottom right indicates 20 μm. Technical data at the bottom left includes: HV 15.0 kV, Mag 5000x, Sig 10.0, WD 9.2 mm.



# SITIOS DE ACCIÓN NPsAg EN LEVADURAS

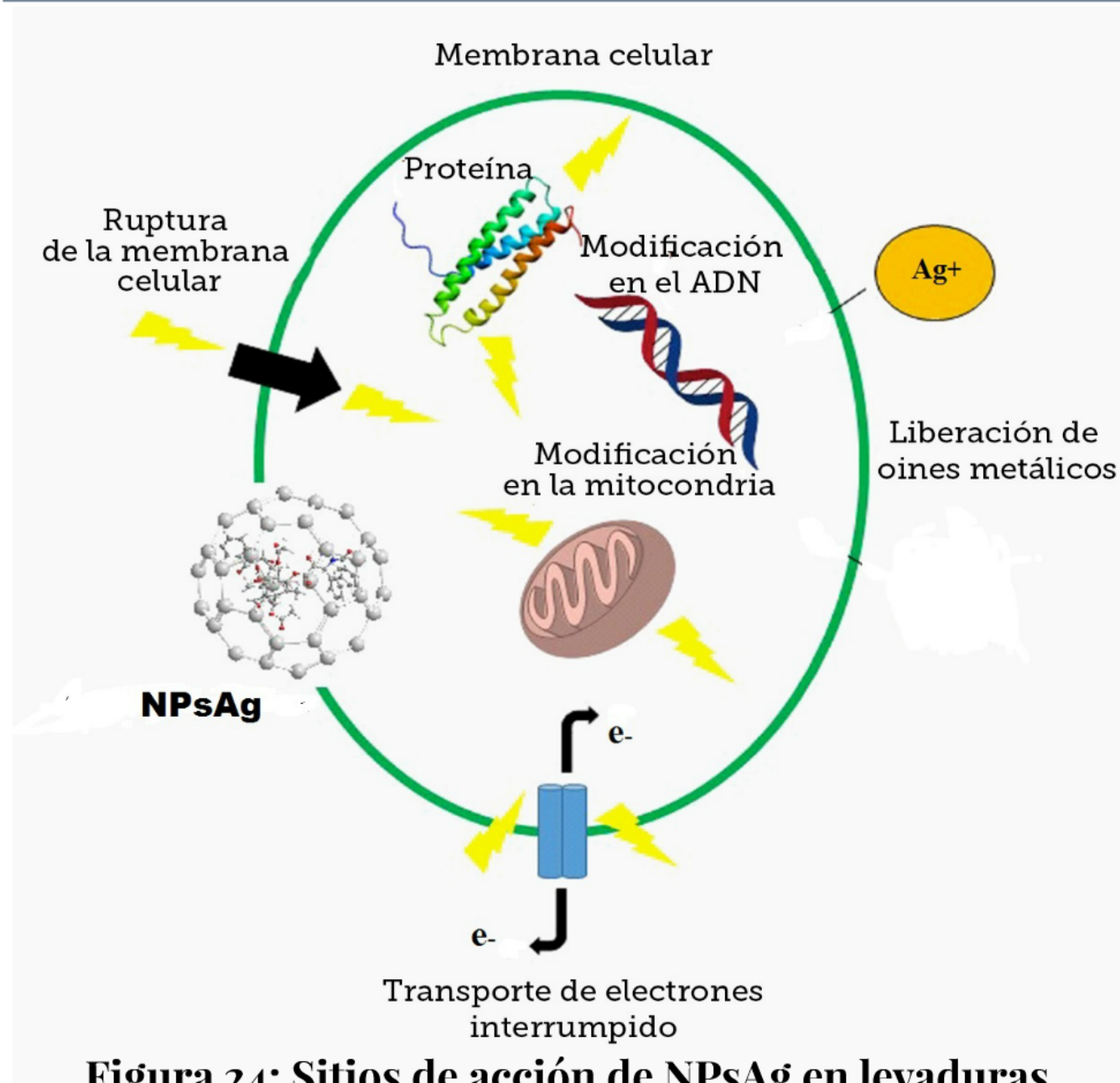


Figura 24: Sitios de acción de NPsAg en levaduras

# DAÑO A NIVEL DE MEMBRANA DE LEVADURAS

*Candida albicans*



Selvaraj y col. evidenciaron daño en la membrana de *Candida albicans*, ocasionado por las NPuAg.

Lara y col, confirmaron la acción de NPuAg sobre la membrana de la levadura.

Figura 25: Deformación a nivel de membrana de levaduras de *C. albicans*.

# CONCLUSIONES

- Las nanopartículas de plata inhiben in vitro la formación de biofilm por *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* y *C. auris*.
- Seleccionamos a la NPsAg-47 como la mejor alternativa para combatir el pre-biofilm de *Candida spp.* por ser eficiente en concentración de 0,25µg/ml.
- Las concentraciones mínimas inhibitorias para las NPsAg obtenidas en este ensayo fueron de 0,5µg/ml y 0,25µg/ml, lo que permite evidenciar que las concentraciones necesarias para lograr un efecto son bajas.
- Las NPsAg provocaron la reducción de la formación de biofilm y se evidencio mediante microscopía electrónica de barrido el daño en la membrana de las levaduras.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Pérez Y. A, Contreras S. AM, Zolezzi R. P, Cruz P. C, Fierro A. C, Faúndez V. C, et al. Infección por hongos en catéteres venosos centrales. *Revista chilena de pediatría*. 2002;73:489-94.
2. Seidler M, Salvenmoser S, Muller FM. Liposomal amphotericin B eradicates *Candida albicans* biofilm in a continuous catheter flow model. *FEMS Yeast Res. England*2010. p. 492-5.
3. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol. England*2013. p. 10-24.
4. Vazquez-Munoz R, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *PLoS One*. 2014;9(10):e108876.
5. Motoa G, Munoz JS, Onate J, Pallares CJ, Hernandez C, Villegas MV. Epidemiology of *Candida* isolates from Intensive Care Units in Colombia from 2010 to 2013. *Rev Iberoam Micol*. 2017;34(1):17-22. Epub 2016/11/05.
6. Barahona-Correa J, Calvo-Valderrama M, Romero-Alvernia D, Angulo-Mora J, Alarcón-Figueroa L, Rodríguez-Malagón M, et al. Epidemiology of Candidemia at a University Hospital in Colombia 2008-2014. *Universitas Medica*. 2019;60(1):1-9.
7. INS INdS. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica 31. 2019. p. 31.
8. NCBI. Taxonomy *Candida* [available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1535326>
9. Selvaraj M, Pandurangan P, Ramasami N, Rajendran SB, Sangilimuthu SN, Perumal P. Highly potential antifungal activity of quantum-sized silver nanoparticles against *Candida albicans*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;173(1):55-66. Epub 2014/03/22.
10. Lara HH, Romero-Urbina DG, Pierce C, Lopez-Ribot JL, Arellano-Jimenez MJ, Jose-Yacaman M. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *Journal of nanobiotechnology*. 2015;13:91

# AGRADECIMIENTOS

- A la Dra. Marcela Gómez por la dirección, acompañamiento y paciencia en todo nuestro proceso de aprendizaje en nuestro trabajo de grado.
- A la Profesora Jovanna Acero por su asesoría.
- A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por nuestra formación profesional.
- A la Fundación Universitaria de las Ciencias de la Salud por el financiamiento y locación.
- A nuestras familias por el apoyo incondicional y el amor brindado