

# UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA



**FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD**

**PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO**

**Bogotá 2018**

**ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICÓTICA DE *Aspergillus  
flavus* A NANOPARTÍCULAS DE PLATA OBTENIDAS POR SÍNTESIS  
VERDE**

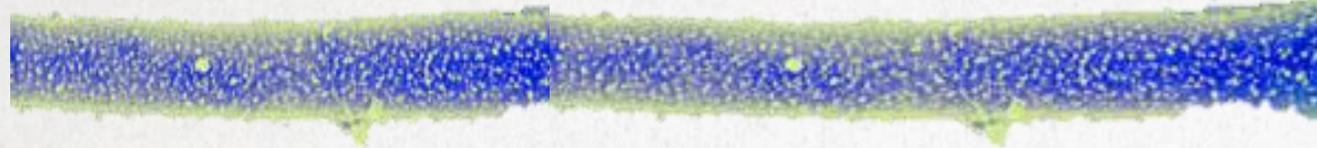
**Elaborado por**

**LAURA JULIANA CORTES PIRAZAN**

**Asesor**

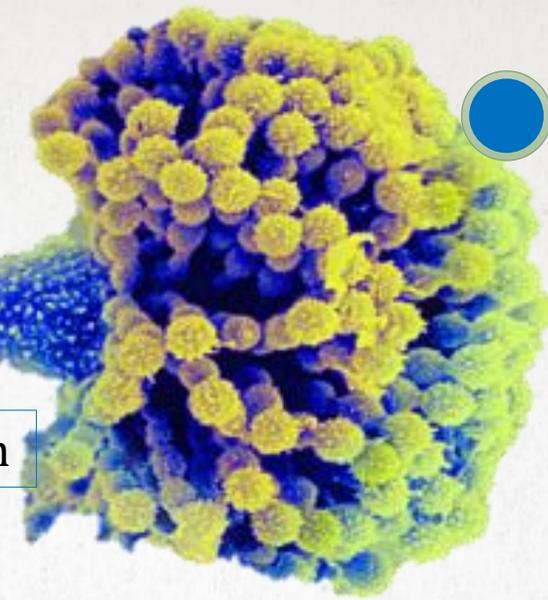
**Sonia Marcela Rosas Arango**

# Aspergillus spp.



1. Infecciones Oportunistas

2. Problemas de contaminación

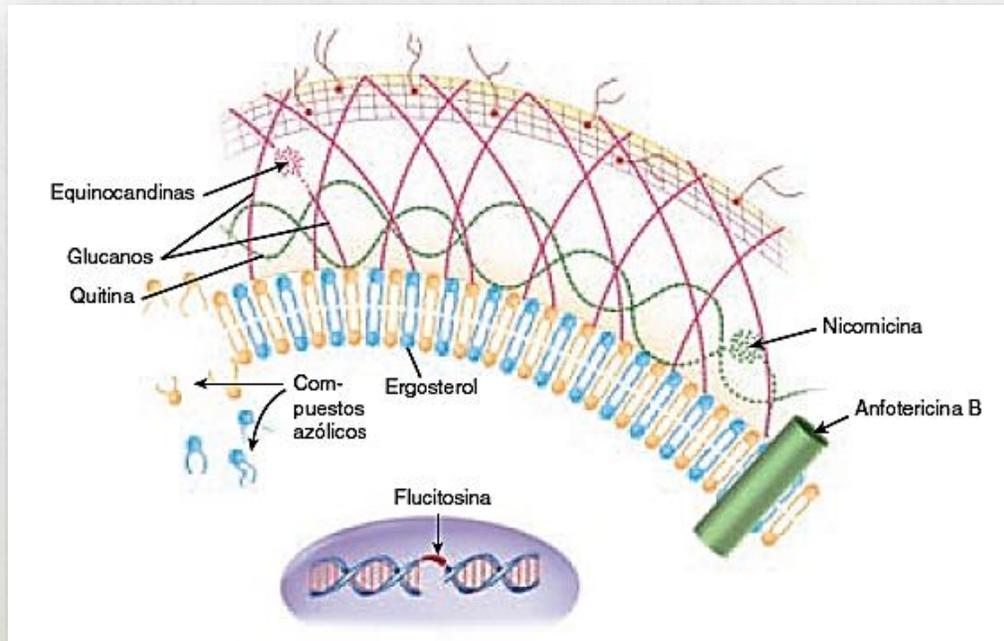


 *Aspergillus fumigatus*  
(80%)

 *Aspergillus flavus*  
(15-20%)

 *Aspergillus niger, A. terreus y A. nidulans*

## Mecanismos de resistencia



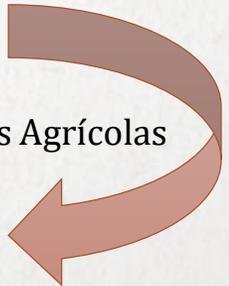
Microbiología Medica . Sherris. 5ta edición

- \* Modificación de la membrana en el ergosterol
- \* Bombas de expulsión
- \* Alteración de la desmetilasa (Cyp51A y Cyp51B)
- \* Evasión del paso metabólico
- \* Formación de Biofilm

 Fungicidas Agrícolas

## Tratamientos alternativos

- \* Péptidos antimicrobianos
- \* Nanopartículas con efecto toxico (Ag)  Biogénesis de NP
- \* Nanopartículas vehiculizantes de fármacos



# OBJETIVOS

Se determino la sensibilidad antimicótica de nanopartículas de Ag obtenidas por síntesis verde a partir de *Moringa oleífera* sobre una cepa de *Aspergillus flavus*, proveniente de la colección del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

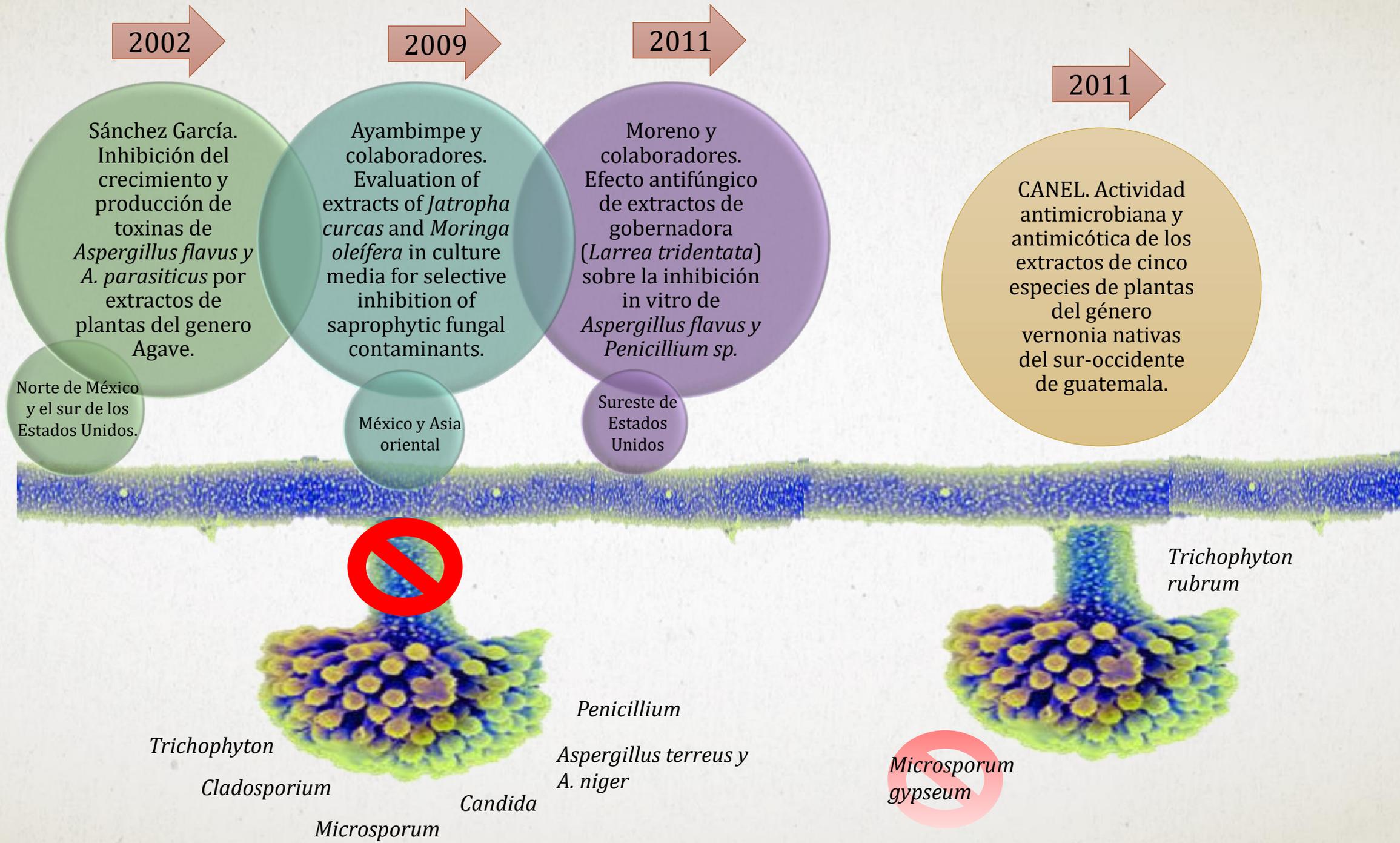
Se caracterizaron nanopartículas de Ag a partir del extracto acuoso de *Moringa oleífera*.

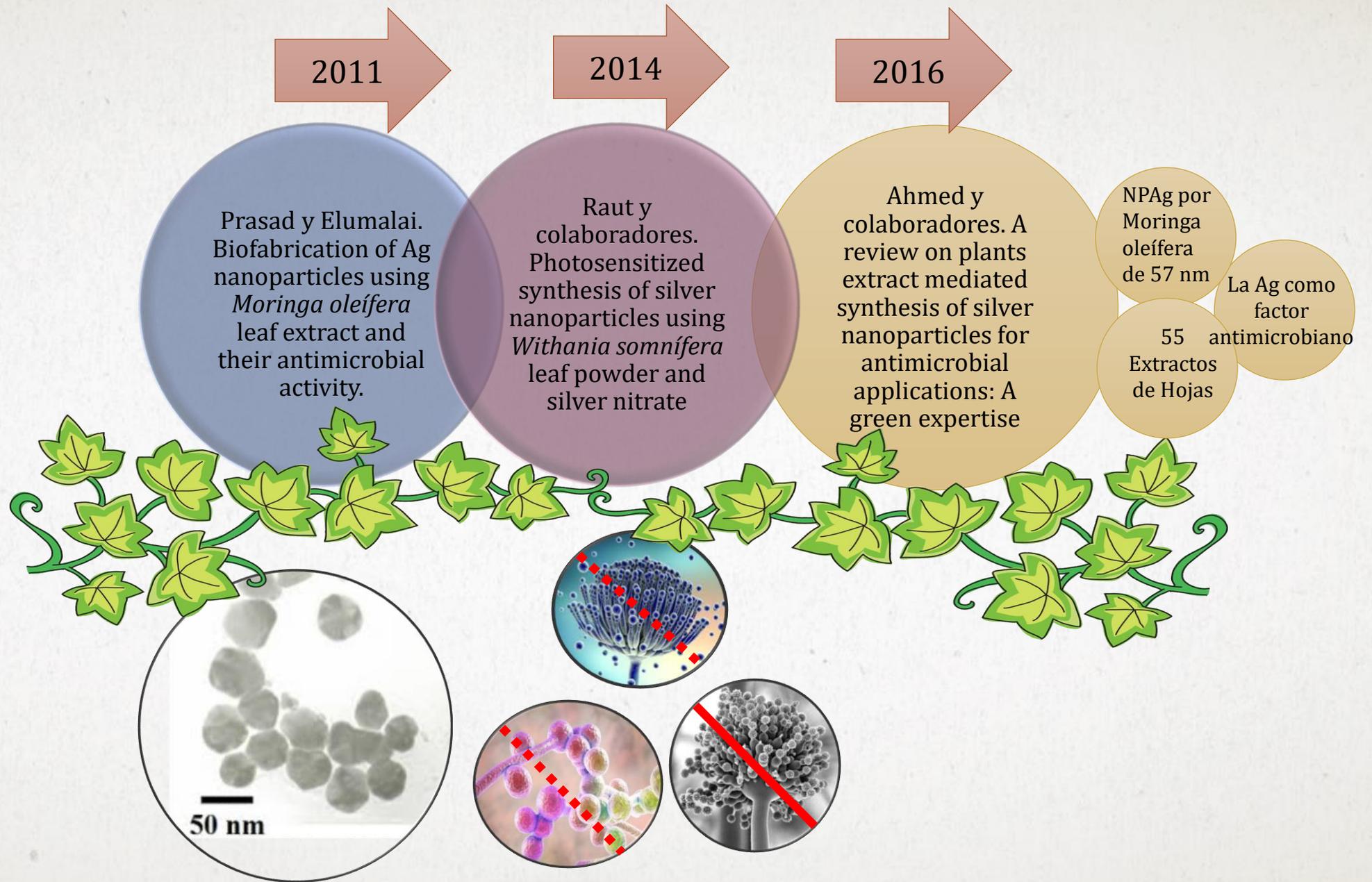
Se evaluó la sensibilidad antimicótica de las nanopartículas de Ag en la cepa de *Aspergillus flavus*.

Se comparo la efectividad de las nanopartículas de Ag frente al extracto acuoso e hidroalcohólico de *Moringa oleífera* en la cepa de *Aspergillus flavus*.

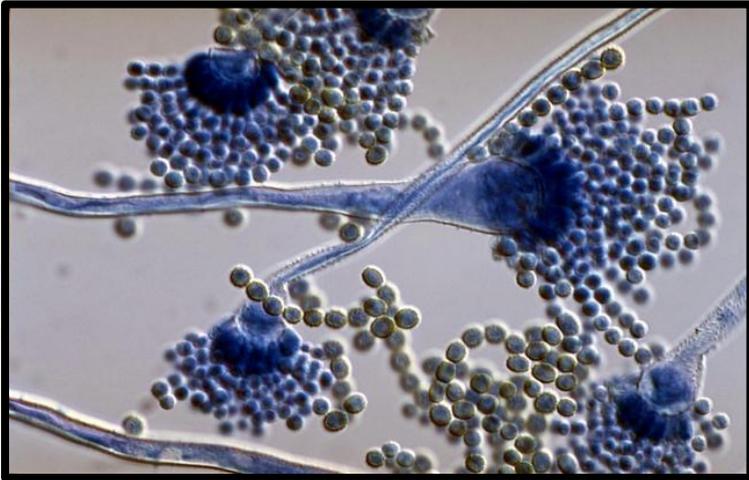


A  
N  
T  
E  
C  
E  
D  
E  
N  
T  
E  
S





# GENERO *Aspergillus*



<http://www.clt.astate.edu/mhuss/Aspergillus%20flavus%20pict.jpg>

## Clasificación Taxonómica

Reino: Fungi  
Filo: Ascomycota  
Clase: Eurotiomycetes  
Orden: Eurotiales  
Familia: Trichocomaceae  
Género: *Aspergillus*  
Especies: (250) *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* y *A. ustus*.

1729 Micheli en Italia.  
1809 Link (CINB)

Similitud morfológica de la cabeza conidial con un “aspergillus”

Organismo filamentoso, hialino, saprofito, completo y de distribución mundial

Amplio rango de temperatura (12°C – 57°C) humedad y aerobiosis

Problemas de contaminación en productos vegetales (pre y post cosecha)

Micotoxinas

# *Aspergillus flavus*



Condiciones cálidas y secas. T° optima de 37°C (25-42°C)

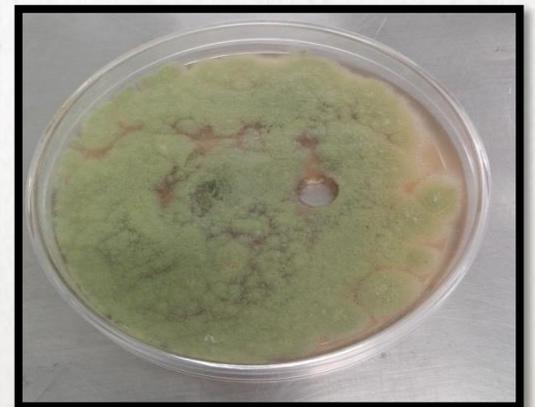
Incidencia en Estados Unidos en niños (65 y 72%)

Afecciones hematológicas (79%)

## Características Cultivo en Agar

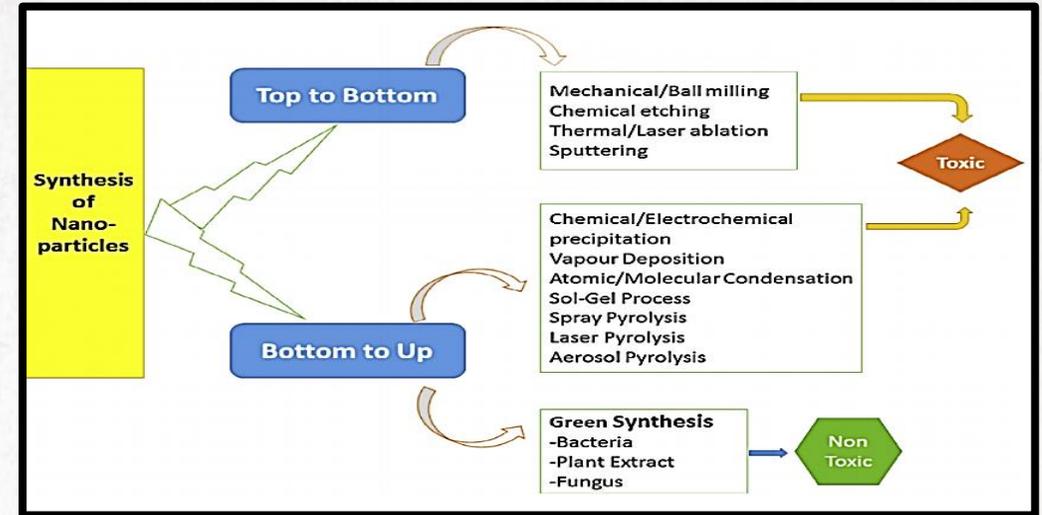
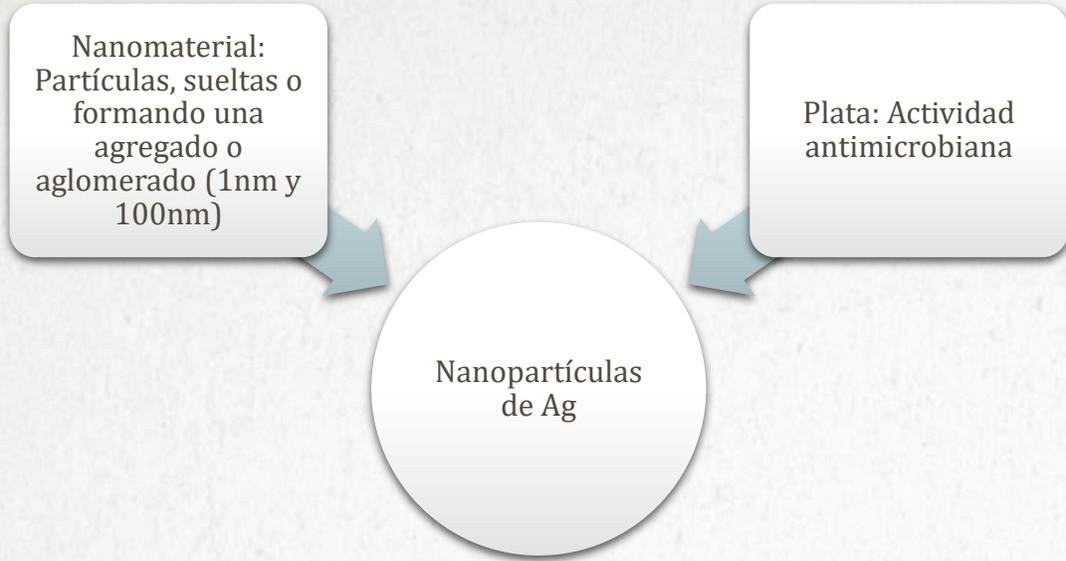


Cortes Pirazan 2018



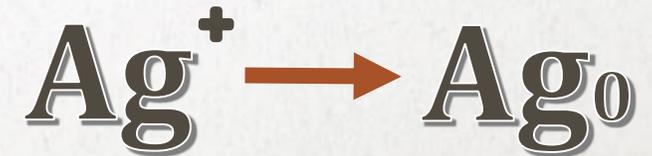
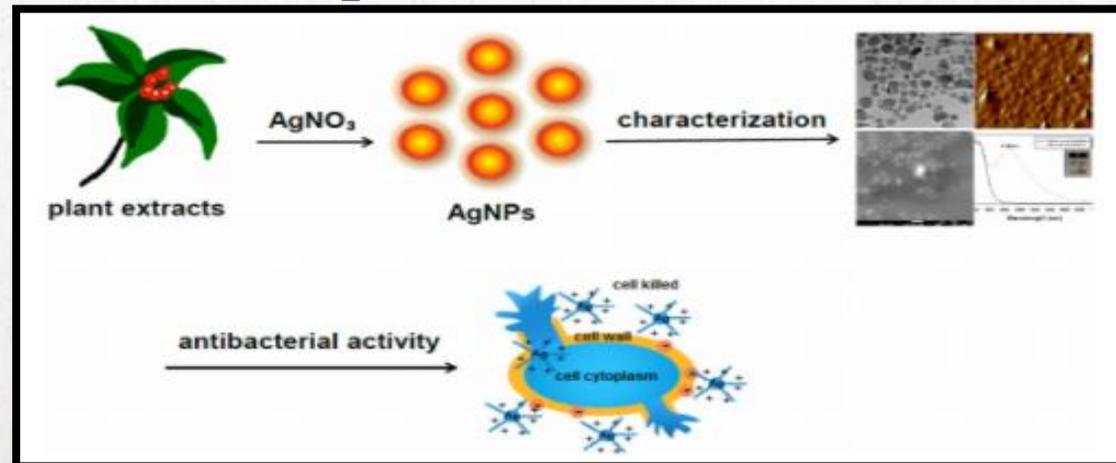
Cortes Pirazan 2018

# NANOPARTÍCULAS DE PLATA (Ag)

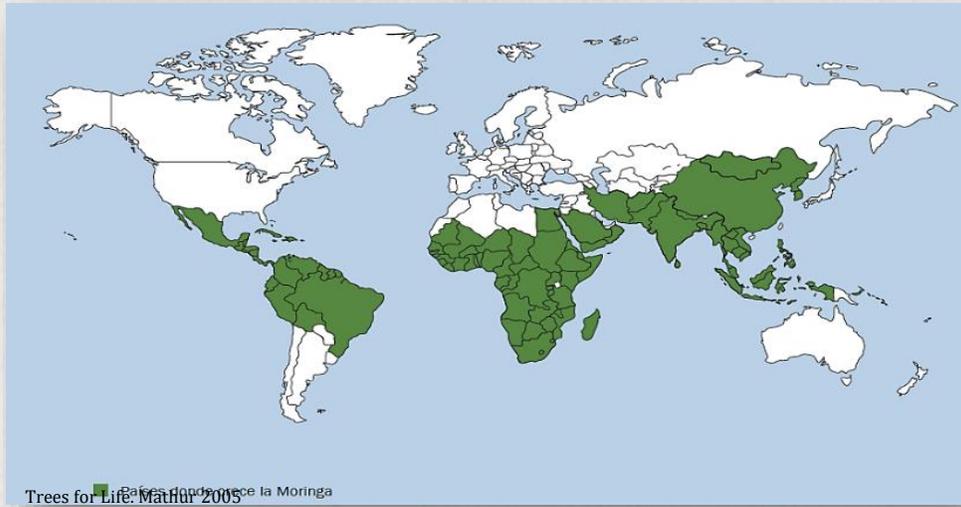


A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. Ahmed 2016

## Biogénesis de Nanopartículas



# Moringa oleífera



<http://rualonso.blogspot.com.co/2014/09/las-magnificas-propiedades-del-arbol.html>

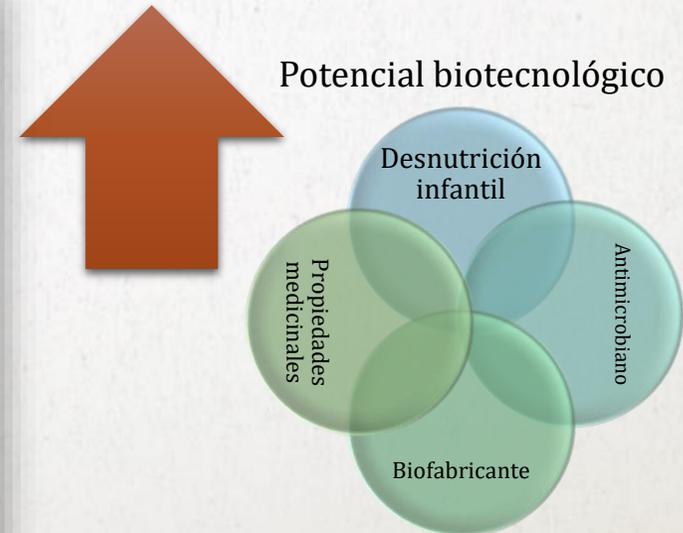
## Antioxidantes

- \* Vitamina C
- \* Tocoferoles
- \* Compuestos fenólicos (flavonoides, ácido gálico, quercetina y kaempferol).

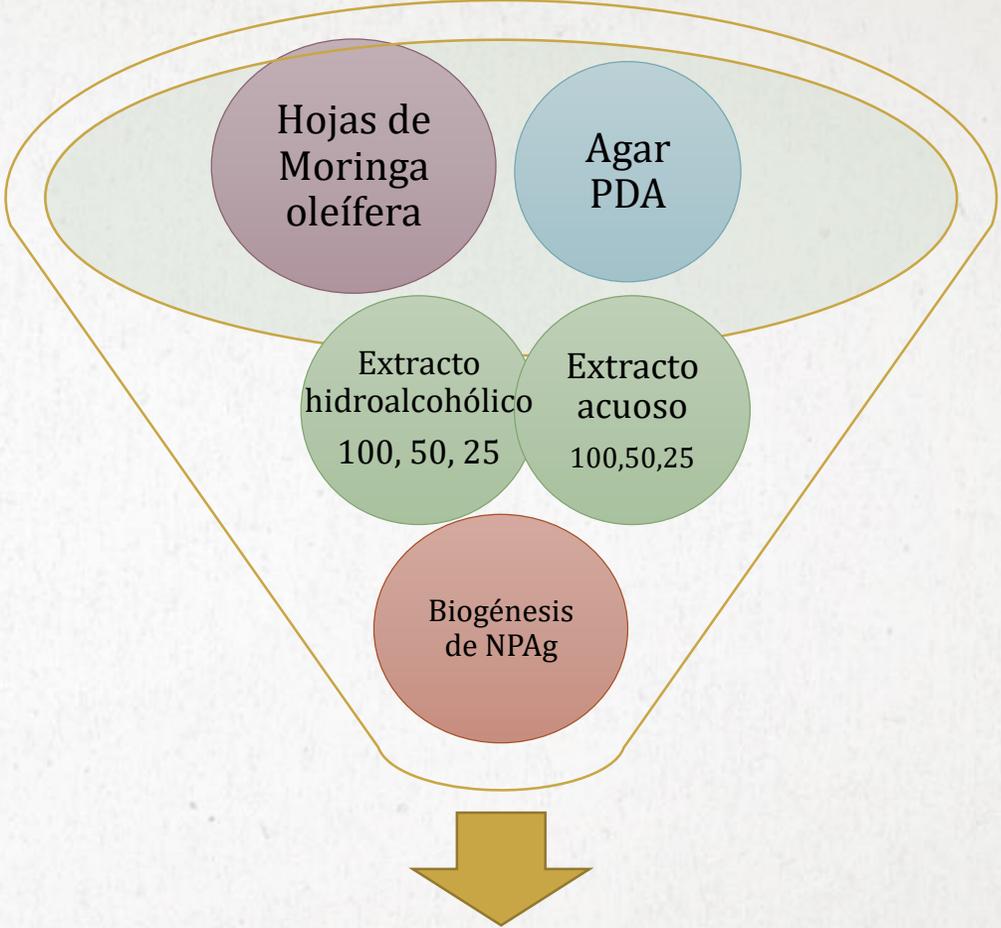
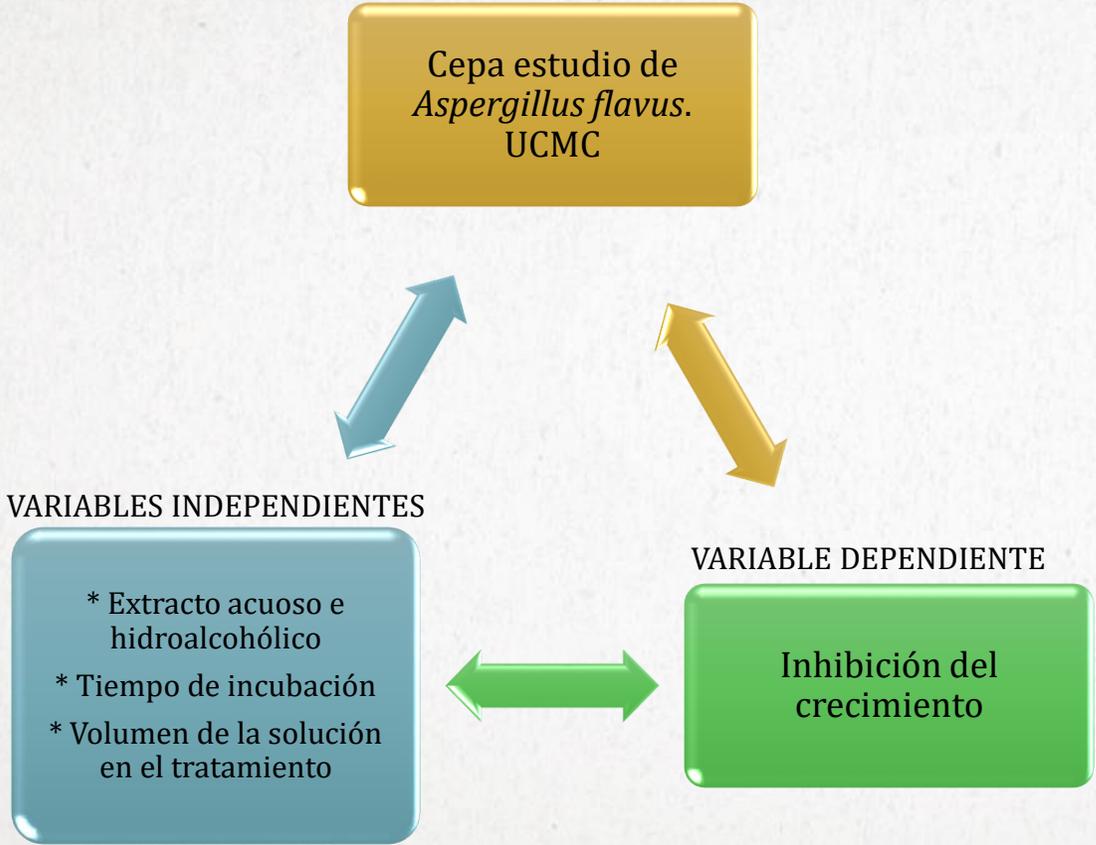
### MORINGA OLEIFERA

HOJAS FRESCAS	GRAMO POR GRAMO, LAS HOJAS FRESCAS CONTIENEN APROXIMADAMENTE:	GRAMO POR GRAMO, LAS HOJAS SECAS CONTIENEN APROXIMADAMENTE:	HOJAS SECAS
	4 VECES MAS VITAMINA A QUE LAS ZANAHORIAS	10 VECES MAS VITAMINA A QUE LAS ZANAHORIAS	
	7 VECES MAS VITAMINA C QUE LAS NARANJAS	1/2 DE VITAMINA C QUE LAS NARANJAS	
	4 VECES MAS CALCIO QUE LA LECHE	17 VECES MAS CALCIO QUE LA LECHE	
	3 VECES MAS POTASIO QUE LOS PLATANOS	15 VECES MAS POTASIO QUE LOS PLATANOS	
	3/4 DE LA CANTIDAD DE HIERRO QUE LAS ESPINACAS	25 VECES LA CANTIDAD DE HIERRO QUE LAS ESPINACAS	
	2 VECES MAS PROTEINA QUE EL YOGURT	9 VECES MAS PROTEINA QUE EL YOGURT	

Trees for Life. Mathur 2005.



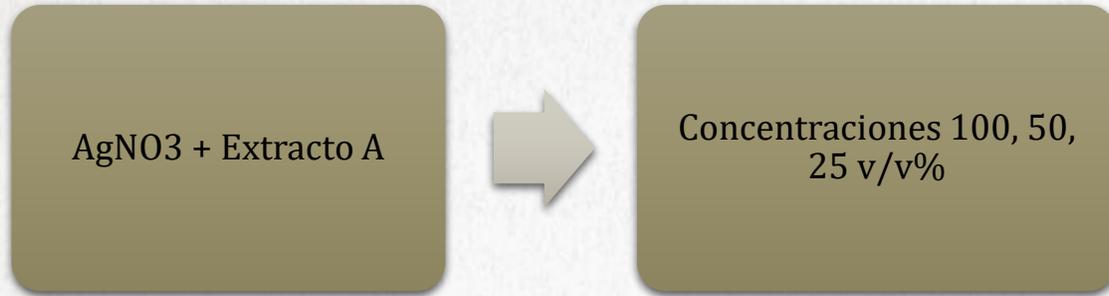
Modelo cuantitativo de tipo  
descriptivo, pre - experimental



Caracterización de nanopartículas de plata  
Prueba de sensibilidad antimicótica

Siguiendo el protocolo recomendado por Rodríguez Pedroso et al. y Canel Monterroso.

## Biogénesis de Nanopartículas Ag



Caracterización  
Nanopartículas Ag por AFM

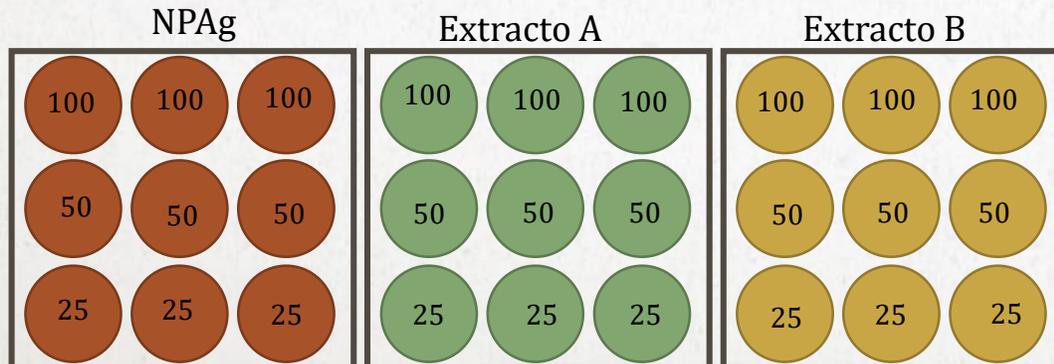
Nano Surf EyeScan 2.



Tecnoparque SENA 2018

Escala 100 μm a 7,8 μm

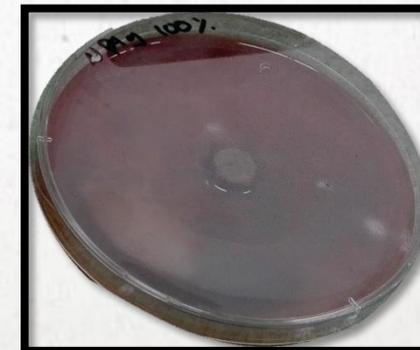
## Prueba de sensibilidad a las NPAg, Extracto acuoso e hidroalcohólico



Medio PDA (C+)



Cepa *Aspergillus flavus* (C-)



Cortes Pirazan 2018

25°C x 9 días



Cortes Pirazan 2018

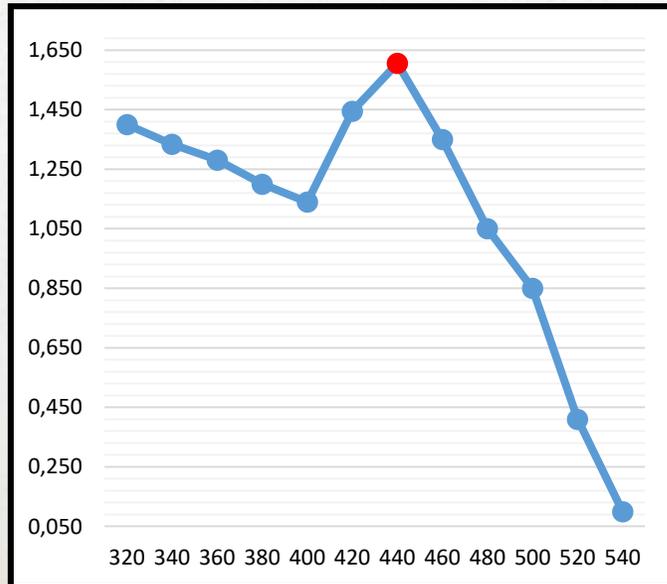
24, 48, 120 y 168 Horas

# Fenómeno de resonancia de plasmones y caracterización de nanopartículas de Ag con AFM

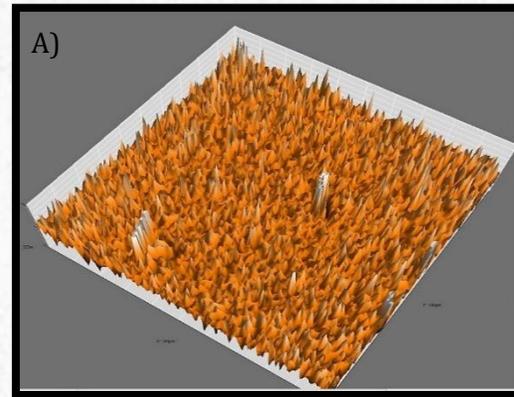
R  
E  
S  
U  
L  
T  
A  
D  
O  
S



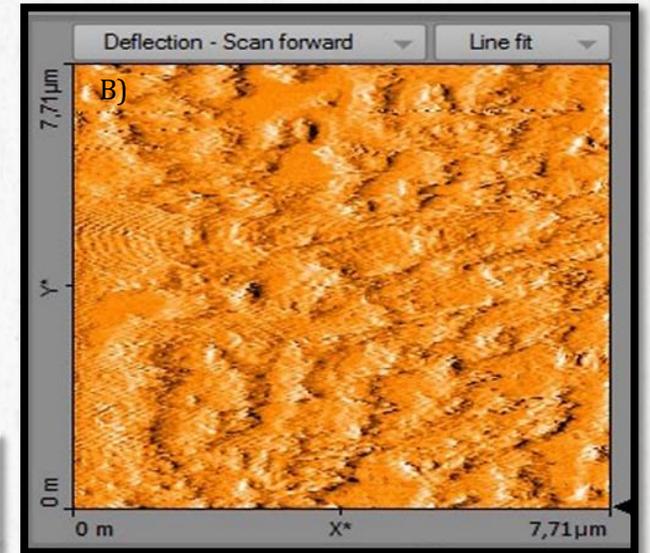
Cortes Pirazan 2018



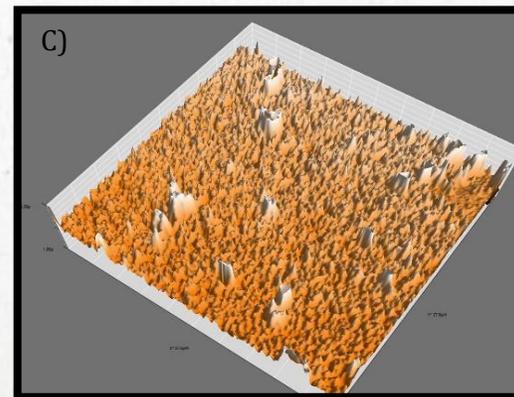
Visualización microscopia AFM de Nanopartículas de plata. A) Topografía 3D a escala 100  $\mu\text{m}$  B) Mapa de color Escala 7,8  $\mu\text{m}$  (C) Topografía 3D a escala 27.8  $\mu\text{m}$



Tecnoparque SENA 2018



Tecnoparque SENA 2018



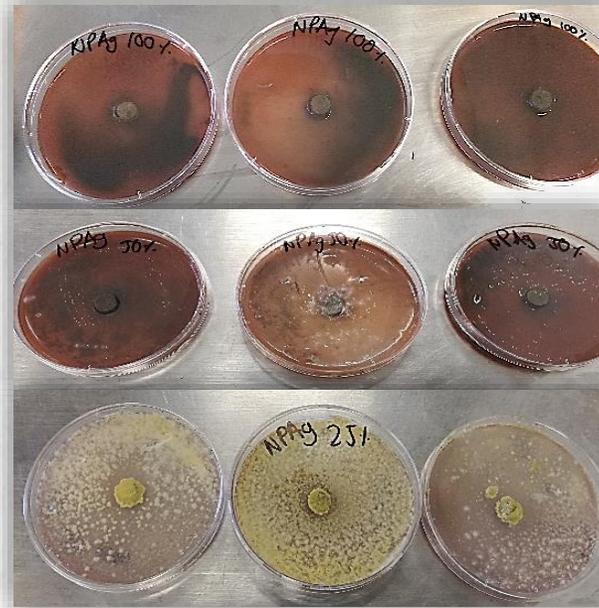
Tecnoparque SENA 2018

Nanopartículas esféricas aprox. 50 a 70 nm

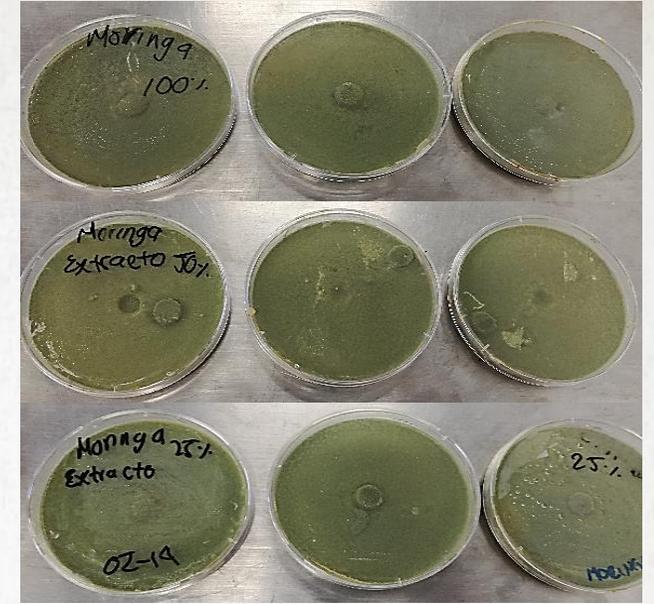
# Sensibilidad Antimicótica

Inhibición de crecimiento en *Aspergillus flavus* (cm)

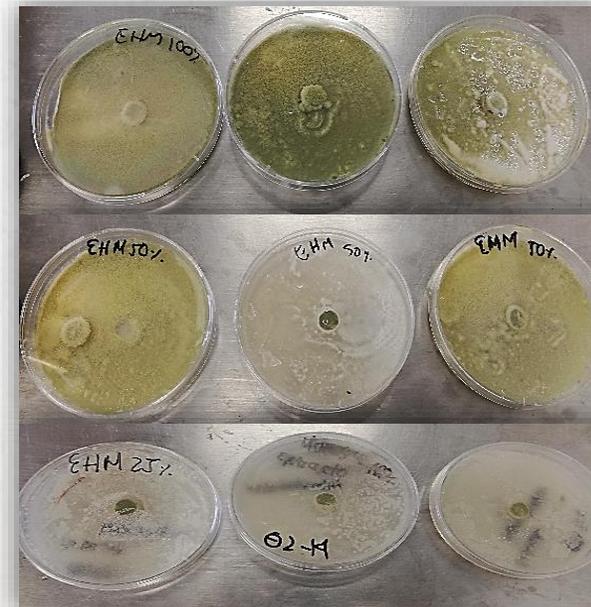
Días	%V/V	NP de Ag	Extracto A	Extracto B	Control Negativo	Control positivo	
1	100	99,2	99,2	99,2	99,2	0	
2		99,2	0	99,2	99,2	0	
5		99,2	0	0	99,2	0	
6		99,2	0	0	99,2	0	
7		99,2	0	0	99,2	0	
1		50	99,2	99,2	99,2	99,2	0
2			99,2	0	99,2	99,2	0
5	99,2		0	0	99,2	0	
6	99,2		0	0	99,2	0	
7	99,2		0	0	99,2	0	
1	25	99,2	99,2	99,2	99,2	0	
2		99,2	0	99,2	99,2	0	
5		0	0	0	99,2	0	
6		0	0	0	99,2	0	
7		0	0	0	99,2	0	



Cortes Pirazan 2018



Cortes Pirazan 2018



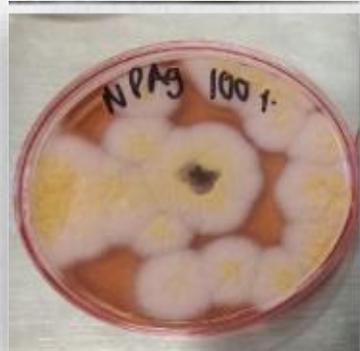
Cortes Pirazan 2018

R  
E  
S  
U  
L  
T  
A  
D  
O  
S

# Prueba de Germinación



Cortes Pirazan 2018



Cortes Pirazan 2018



Cortes Pirazan 2018



# Anova y Prueba de Tukey

## 1. Análisis de varianza de la concentración de las 3 soluciones estudiadas

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Entre grupos</b>	17057,11	2	8528,5546	5,2	0,0236373	3,88529
<b>Dentro de los grupos</b>	19681,28	12	1640,1066			
<b>Total</b>	36738,39	14				

Prueba de Tukey de la concentración al 100% de las 3 soluciones estudiadas.

VHS: 68,27

	NPAg	Extracto B	Extracto A
<b>100%</b>		59,52	79,36
<b>50%</b>			19,84
<b>25%</b>			

## 2. Análisis de varianza de un factor con las 3 concentraciones de la solución de Nanopartículas de plata.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Entre grupos</b>	11808,768	2	5904,384	6	0,015625	3,88529
<b>Dentro de los grupos</b>	11808,768	12	984,064			
<b>Total</b>	23617,536	14				

Prueba de Tukey de las diferentes concentraciones de la solución de NPAg.

VHS: 52,88

	100	50	25
<b>A</b>		0	59,52
<b>B</b>			59,52
<b>C</b>			

## 3. Análisis de varianza de un factor con el extracto hidroalcohólico de *Moringa oleífera*.

Valor de P: >0.05

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Entre Grupos</b>	7,28e-12	2	3,63e-12	1e-15	1	3,88529
<b>Dentro de los grupos</b>	35426,3	12	2952,192			
<b>Total</b>	35426,3	14				

Se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ )



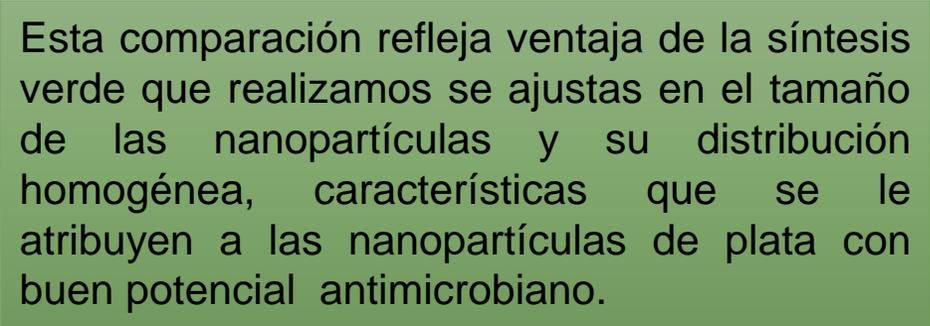
Prasad y Elumalai (2011). Síntesis verde de *Moringa oleífera*. El MET revelo NPAg esféricas de 57nm aprox y con una amplia distribución, este ensayo evaluó la actividad antimicrobiana en bacterias.

Determinan que la morfología de las NPAg depende de los principales componentes del extracto proveniente de las plantas y las condiciones de síntesis. Por lo tanto, cabe la posibilidad de controlar las propiedades y dimensiones de las NP.

Krishnarananj et al. (2015). Extracto de hojas de *Malva crispa* por microondas El AFM revelo NPAg esféricas de 5 a 50nm. Para reconocer su actividad antimicrobiana utilizaron técnica de difusión en Agar y medio envenenado en patógenos bacterianos y en hongos. Las nanopartículas sintetizadas a partir de 2 a 3 mM de concentración de AgNO<sub>3</sub> mostraron excelentes actividades inhibitorias contra patógenos tanto bacterianos como fúngicos.



Flores (2014). Síntesis química. El AFM revelo NPAg esféricas, agregadas de 100 a 300 nm Las cuales fueron eficientes en varios microorganismos bacterianos y levaduras, pero no con hongos del genero *Penicillium* y *Trichophyton*



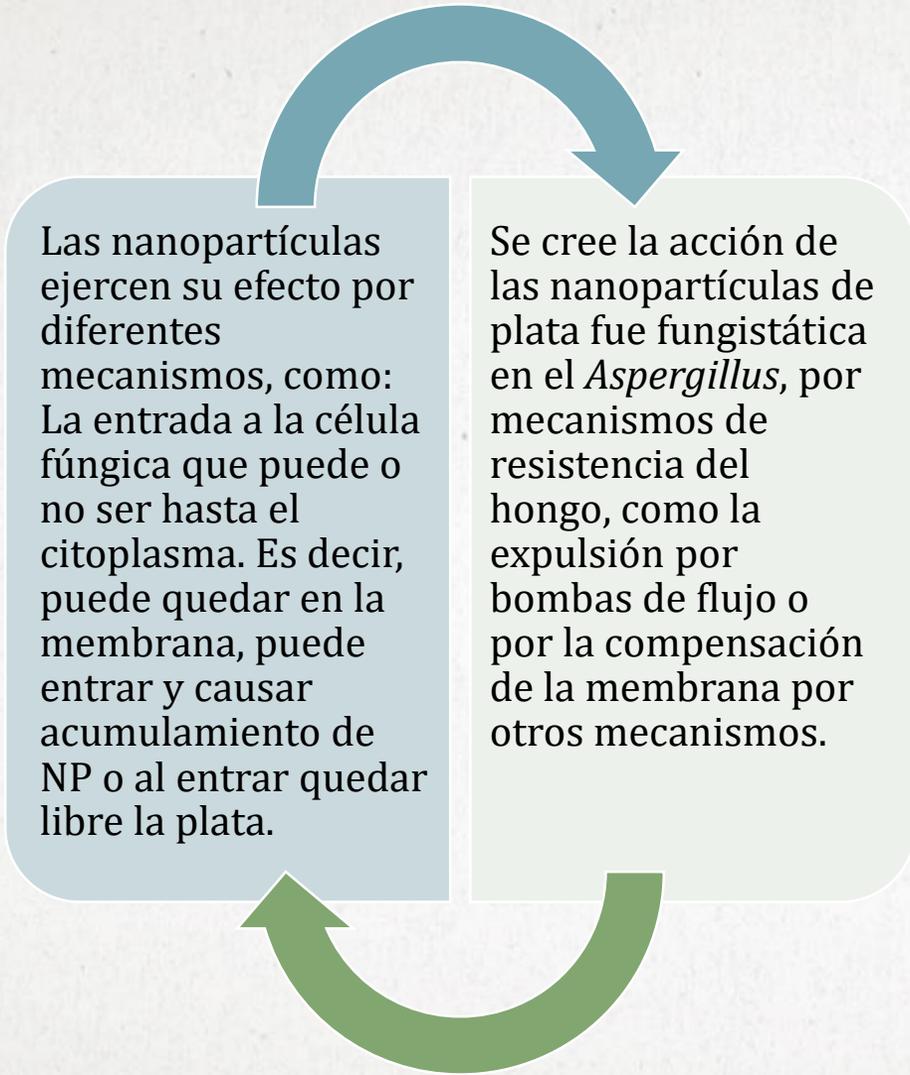
Esta comparación refleja ventaja de la síntesis verde que realizamos se ajustas en el tamaño de las nanopartículas y su distribución homogénea, características que se le atribuyen a las nanopartículas de plata con buen potencial antimicrobiano.

Sánchez (2002). a partir de extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de diferentes partes de la planta, evidenciando que solo los extractos alcohólicos de la inflorescencia tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de las cepas fúngicas probadas.

Moreno et al. (2011). Extractos alcohólicos de *Larrea tridentata*. La evaluación de la actividad se realizó mediante dos técnicas; la técnica del pozo en agar y la técnica dilución de extracto en agar. Los resultados arrojados por ambas técnicas permitieron detectar los efectos antifúngicos que presentaron los extractos; destacando especialmente los etanólicos y metanólicos, ya que con ellos se lograron inhibiciones de hasta el 100% en ambas cepas (*Aspergillus flavus* y *Penicillium sp*)

Como el Extracto A e Extracto B no generaron inhibición de crecimiento en ninguna de las concentraciones se podría inferir que *A. flavus* tiene algún mecanismo de resistencia sobre la acción de *Moringa oleífera* o en su defecto el extracto hidroalcohólico no logró obtener antioxidantes con acción antifúngica.

Los extractos alcohólicos, tienen un efecto fungicida contra *A. flavus* y otros mohos, sin embargo el estudio de Sánchez revela que no todas las partes de la planta en estudio ejercen dicho efecto, por lo que se resuelve que no todas las plantas y sus partes, tienen un efecto antifúngico y por consiguiente que el tipo de extracto influye en el efecto fúngico.





# C O N C L U S I O N E S

- \* Se obtuvieron nanopartículas de plata por síntesis verde a partir del extracto acuoso de *Moringa oleífera*, comprobando que sus componentes antioxidantes funcionan como agentes reductores del ion plata y esas nanopartículas tuvieron forma y distribución adecuada para lo que la literatura sugiere como un nanocompuesto antimicrobiano.
- \* En este estudio se comprobó la sensibilidad antifúngica de las nanopartículas de plata en la cepa de *Aspergillus flavus*, evidenciando que el efecto más positivo se observó a volúmenes de 100 y 50% a diferencia del 25% el cual tuvo crecimiento a los 5 días de incubación.
- \* Este estudio evidencio que la sensibilidad antimicótica de los extractos acuoso e hidroalcohólico de *Moringa oleífera* es nula frente a la cepa de *Aspergillus flavus*, pues la cantidad de compuestos en las plantas difieren en sus condiciones de pre y post cosecha. Adicionalmente la literatura pone en evidencia que los extractos a partir de elementos alcohólicos tienen un mejor efecto antifúngico.
- \* En este ensayo se comprobó una acción fungistática por parte de las nanopartículas Ag por síntesis verde sobre la cepa de *Aspergillus flavus*, pues en un posterior ensayo, el estadio de medición mostro un crecimiento compatible con el género *Aspergillus* a los tres días de incubación. Por lo que se sugiere realizar ensayos con nanopartículas metálicas a diferentes concentraciones.

- \* Se debe realizar la caracterización de nanopartículas de otros elementos como el zinc, oro, cobre, entre otros, a través de síntesis verde utilizando otras plantas con agentes antioxidantes.
- \* Es importante repetir este estudio utilizando extractos etanólicos de *Moringa oleífera*, para comparar los resultados con los estudios descritos anteriormente y así comprobar el efecto antifúngico, para descartar o comprobar un efecto fungicida se deben realizar pruebas con el extractos acuosos a diferentes concentraciones, teniendo en cuenta que la literatura describe que los componentes varían según la producción y la recolección de la planta.
- \* Con referencia a los resultados obtenidos en los estudios de Sanchez y Moreno, sería importante comparar la acción antifungica de diferentes plantas medicinales a partir del extracto acuoso, alcohólico y síntesis de nanopartículas en hongos oportunistas, evidenciando si el efecto antifúngico varía según la planta utilizada o por lo contrario la variable es el tipo de efecto antifúngico.

- ❑ Al laboratorio de bioremediación donde se desarrollaron los ensayos.
  - ❑ Al cepario de la UCMC por la disponibilidad de Cepa.
  - ❑ Al tecnoparque SENA, Chapinero por sus equipos y conocimientos brindados.
- ❑ Al grupo de investigación por el desarrollo de proyectos en Biogénesis de Nanopartículas.

---

# AGRADECIMIENTOS

**GRACIAS**



**Bogotá 2018**