



**Sensibilidad de *Candida albicans* cepa ATCC 10231 a
Nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde de
Moringa oleifera.**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**AUTOR:
VIVIAN BRILLITT LIEVANO ROMERO**

**ASESOR INTERNO:
SONIA MARCELA ROSAS ARANGO, MSc**

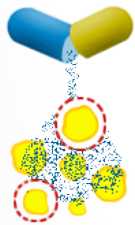
Grupo de investigación PGAE

Introducción



El género *Candida* incluye aproximadamente a 154 especies, entre ellas, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. dublinensis*, son frecuentemente aisladas de infecciones en humanos, siendo *C. albicans* la más relevante en términos de patogenicidad

Como causa de infecciones nosocomiales se ha reportado:
EE.UU.: 4to lugar (Wisplinghoff *et al.*, 2004)
Suiza: 7mo lugar (Marchetti *et al.*, 2004)
Colombia: 5to lugar (Menzin *et al.*, 2009)



Una de la principales causas de la resistencia esta dada por:

- Tratamientos profilácticos
- Dosificación inadecuada
- Prescripción empírica (Práctica común en la comunidad)
- Tratamientos incompletos



Debido a la resistencia de *Candida albicans* al uso de tratamientos convencionales, se proponen alternativas como el uso de Nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde con el fin de aplicar un tratamiento con beneficio ambiental y baja toxicidad.

Oportunidad de investigación

La literatura evidencia, la inhibición de crecimiento de *Candida albicans* con el uso de Nanopartículas de plata obtenida por síntesis verde (Villamizar *et al* 2015 y Moodley *et al* 2018), evaluada bajo técnicas convencionales como difusión en disco y Concentración Mínima Inhibitoria, asegurando su efecto fungicida sin embargo la literatura no muestra una técnica rigurosa de seguimiento que permita afirmar que frente a los factores de virulencia y posible adaptación de *Candida albicans* se desarrolle tolerancia a la toxicidad y el efecto final no sea de inhibición completa del microorganismo en evaluación.

Así mismo es escaso el análisis sobre el efecto inhibitor o la toxicidad inducida por la solución antioxidante usada en la síntesis de la nanopartícula sobre la levadura debido a que las mediciones se centran en la solución final que ya se encuentra unida a metales.

¿cuál es el efecto posible del extracto de una planta con contenido antioxidante, libre y unido a nanopartículas metálicas sobre una cepa ATCC de *Candida albicans*, formadora de biofilm ?

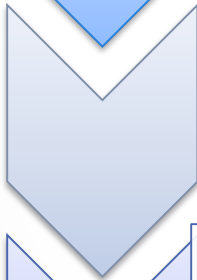
Objetivos

General

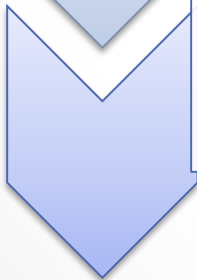
Evaluar la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* cepa ATCC 10231 con nanopartículas de plata (AgNPs) obtenidas por síntesis verde de *Moringa oleifera*



- Caracterizar las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde a partir de *Moringa oleifera*.



- Determinar la concentración del extracto acuoso de *Moringa oleifera* que muestre una inhibición efectiva sobre la cepa ATCC 10231 de *Candida albicans*.



- Establecer la técnica de inhibición antimicótica de las Nanopartículas de plata (AgNPs) obtenidas por síntesis verde a partir de *Moringa oleifera* mediante técnicas de crecimiento y difusión.

Antecedentes

Efecto fungicida en *C. albicans* de AgNPs por SV de *Geranium maculatum* en materiales de impresión y diseño odontológico, inhibiendo el crecimiento de este microorganismo, capaz de adherirse a materiales como en estudio el Alginato.

Revisión de aplicaciones de AgNPs, vías de exposición y efectos citotóxicos, evidenciando que el tamaño y la forma de la nanopartículas tienen un efecto menos tóxico cuando se forman esféricamente.

Efecto fungicida de AgNPs por SV de *M. oleifera* y su aplicación en ungüentos, estudio en irritación de piel conejos albinos con *Candida albicans*, demostrando la naturaleza no tóxica de las AgNPs

Síntesis de nanopartículas de plata a partir de extractos de hojas de moringa y su potencial antimicrobiano sobre *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *C. albicans*. Hallando una inhibición a una MIC 6,25 µg/ml (Técnica microdilución)

Contreras *et al*, 2012

Vasques -Muñoz *et al*, 2013

Ávalos *et al*, 2013

Jasuja *et al*, 2014

Vibhute, 2014

Villamizar y Monroy *et al*, 2015

Moodley *et al*, 2018

Efecto fungicida en *C. albicans* de AgNPs y AgNO₃ frente a cultivos con tratamiento con Fluconazol donde evaluó la capacidad de crecimiento post tratamiento, observando la incapacidad de recuperación de crecimiento.

Efecto antibacteriano sobre *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* de AgNPs por SV, en técnica de difusión en disco, utilizando como control Estreptomicina, evaluando las zonas de inhibición encontrándolas similares.

Uso de AgNPs en inhibición de crecimiento de microorganismos en alimentos empacados al vacío, mostrando al final del ensayo una inhibición de crecimiento en *E. coli* y *C. albicans* aisladas de las muestras de los alimentos.

Marco referencial

Clasificación taxonómica

Reino: *Fungi*

Filo: *Ascomycota*

Subfilo: *Saccharomycotina*

Clase: *Saccharomyceatales*

Orden: *Saccharomycetales*

Familia: *Saccharomycetaceae*

Género: *Candida*



- Especie *Candida albicans*, reconocida como agente causante de infecciones asociadas al cuidado de la salud, cuenta con:

Candidiasis

Diferentes formas de presentación dentro de ellas encontramos:

- Esofagitis
- Peritoneal
- Ocular
- Oral
- Cutánea
- Endocarditis por implantación de dispositivos cardiacos
- Candidiasis vulvovaginal
- Forma clínica mas común
Candidemia

Kasper *et al*, 2018

Factores de riesgo asociados:

- Pacientes inmunocomprometidos
- Pacientes con estancias largas de hospitalización
- Pacientes con Diabetes mellitus
- Pacientes con tratamiento a radioterapia e inmunoterapia.

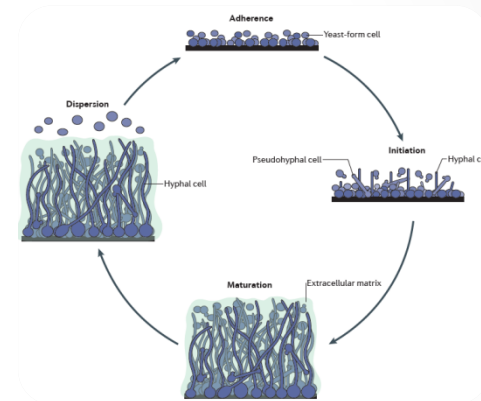


Marco referencial

Factores de virulencia:

- **Morfogénesis:** Levadura, pseudohifas o hifas verdaderas.
- **Enzimas:** Proteasas (SAP), fosfolipasas, lipasas
- **Adherencia:** Adhesinas de tipo aglutina ALS.
- **Adaptación** al ambiente por la expresión del gen PHR1 en la pared celular (controlada pH)

Formación de biofilm

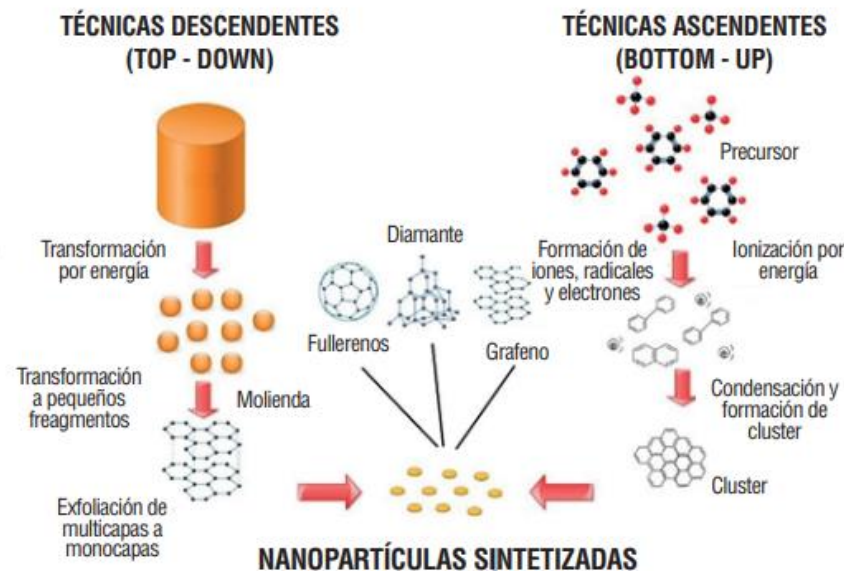


Mathew, *et al* 2017

Expresión de genes de resistencia antifúngica como: MDR1-ERG11-Flu1 presente en la membrana celular relacionados con la resistencia al Fluconazol.

Nanopartículas de plata AgNPs

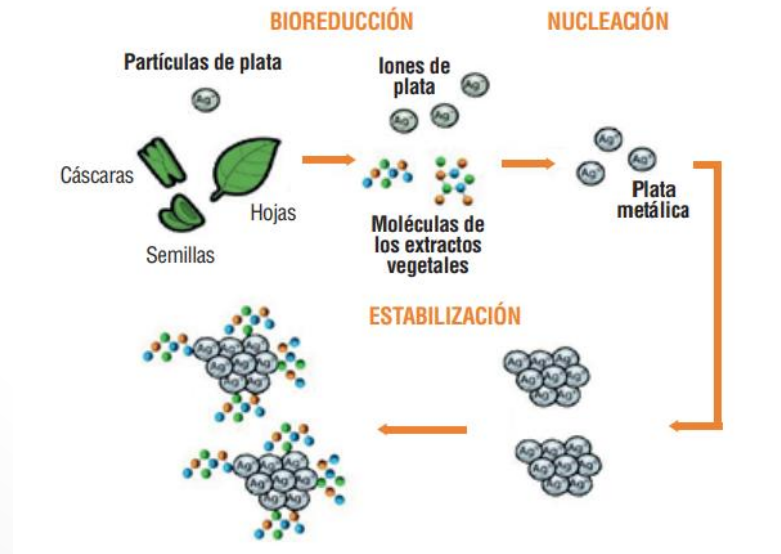
Han generado interés por investigadores, debido a sus propiedades en cuanto a estabilidad química, conductividad, efecto catalizador y sus efectos sobre microorganismos bacterianos y fúngicos, siendo un motivo de interés en el área de la investigación para el control de enfermedades infecciosas.



Nobile CJ,2015

Síntesis verde

- La síntesis verde es simple y generalmente implica una reacción de un solo recipiente.
- Contribuye a la protección del ecosistema.
- Se eliminan los productos químicos peligrosos asociados a la toxicidad, lo que aumenta la biocompatibilidad del producto resultante con tejidos normales para aplicaciones in vivo.
- Las entidades biológicas verdes se pueden usar como agentes reductores y agentes de protección, proporcionando a las Nanopartículas de Plata (AgNPs) una estabilidad coloidal mejorada

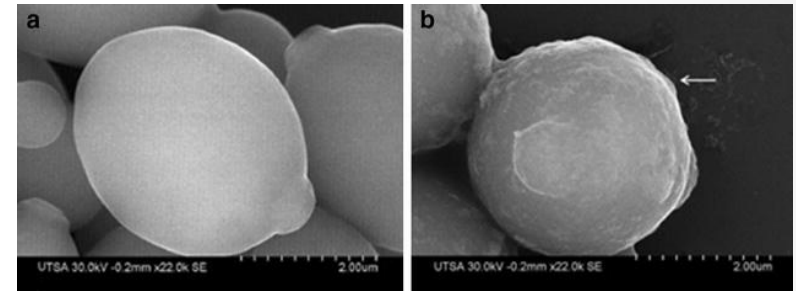
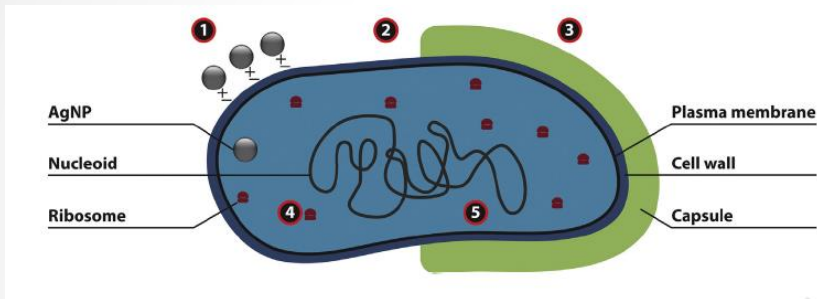


Moringa oleifera



- ✓ Antioxidantes naturales, tales como vitamina C, flavonoides y compuestos fenólicos como ácido gálico.
- ✓ Alto contenido de vitaminas, minerales, aminoácidos esenciales.
- ✓ De acuerdo a la capacidad de absorción de radicales de oxígeno- ORAC, la *moringa* alcanza un valor que oscila entre 50.000 unidades por cada 100 gr.

Efecto de las Nanopartículas de plata AgNPs extraídas por síntesis verde sobre el microorganismo .



Tomado de: Chandra J et al., 2001

1. Atracción electrostática de iones libres.
2. Cambios en la permeabilidad, alteración de la respiración, fuga de contenido intracelular.
3. Efectos sobre la fosforilación.
4. Inhibición de la síntesis y función de proteínas.
5. Interacción con moléculas que contiene fósforo.

Tomado de: Durán N *et al.*, 2015

Metodología

Tipo de investigación:

El desarrollo del estudio tiene un diseño cuantitativo de tipo descriptivo y transversal.

Muestra

La cepa en estudio fue ATCC 10231 de *Candida albicans* y se obtuvo del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Fases y procedimientos

Fase 1

- Preparación del extracto acuoso de *Moringa oleifera* para la síntesis de Nanopartículas de plata. Moodley *et al*, 2018

Fase 2

- Caracterización de Nanopartículas de plata AgNPs. Ahmed *et al*, 2016

Fase 3

- Evaluación de la inhibición de crecimiento por la técnica de difusión en disco en agar PDA. Vinnetha *et al*, 2015

Fase 4

- Valoración de sensibilidad a las nanopartículas por medio del equipo Bioscreen C10- Ensayo de curva de crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231

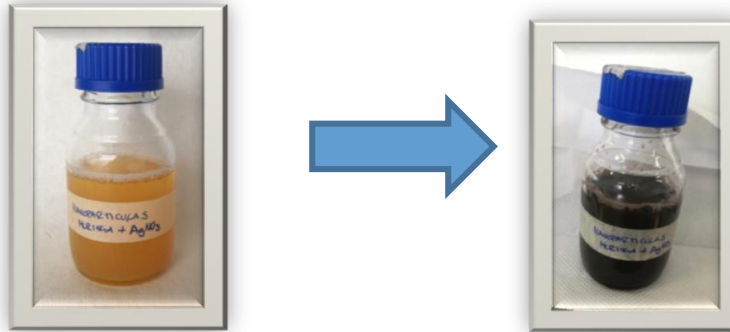
Resultados

Fase 1

Preparación extracto acuoso.

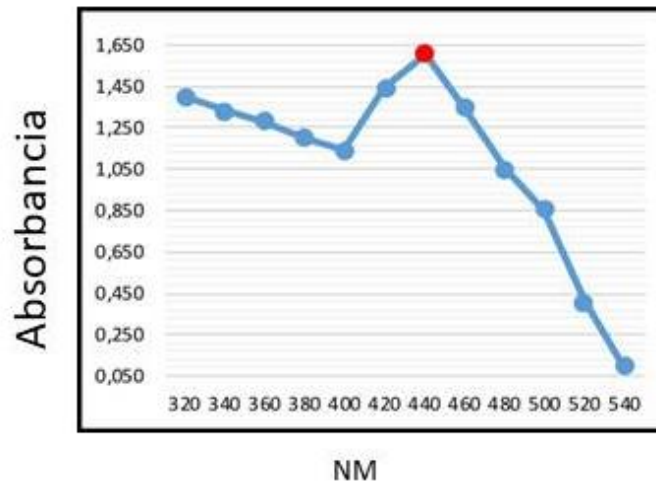
- ✓ Se utilizaron 10gr de hojas secas de *Moringa oleifera* en 100 ml de agua destilada
- ✓ Se preparo Nitrato de plata a una concentración de 0,1M

Síntesis de Nanopartículas de plata.



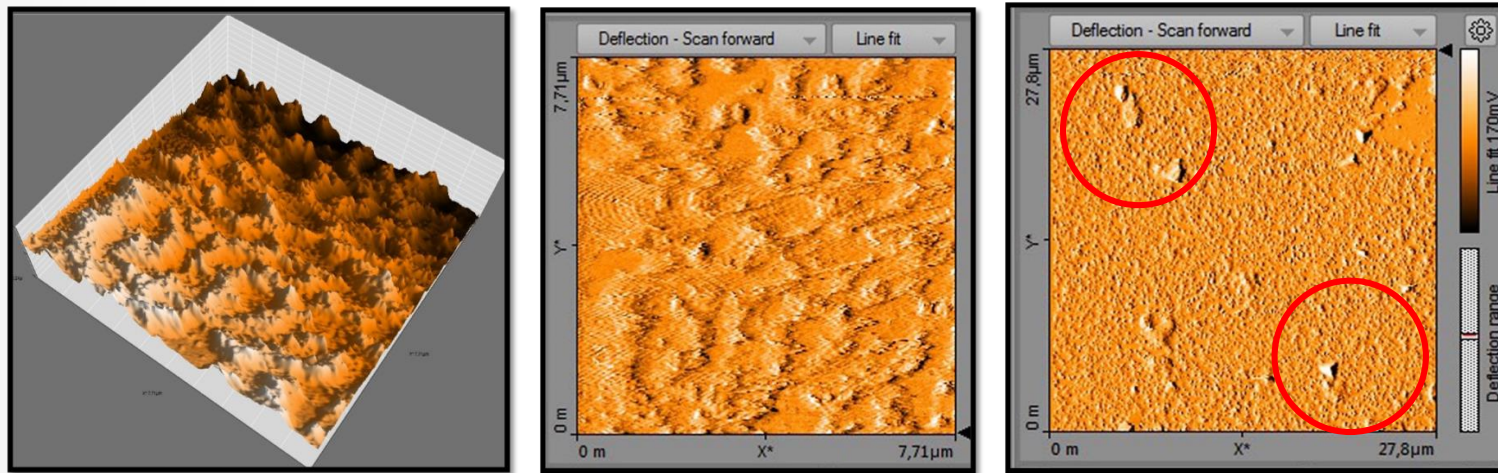
Cambio colorimétrico de la solución (AgNO_3 + Extracto de *Moringa oleifera*) (Fenómeno de resonancia de plasmones)

Valoración del espectro de absorción para el fenómeno de resonancia de plasmón superficial.



Fase 2

Caracterización de las Nanopartículas de plata por medio del AFM (Microscopia de Fuerza Atómica)

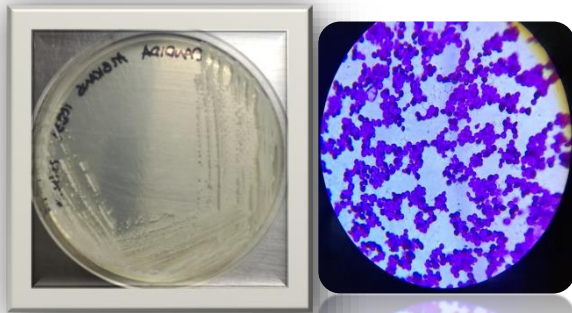


Plano topográfico en 3D y mapa de color de acercamiento a una escala de 7.8 μm evidenciando nanopartículas de Ag poli dispersas, tamaño aprox. 50 a 70nm y forma esférica, lo que caracteriza la viabilidad de las nanopartículas.

Fase 3

Evaluación de la inhibición de crecimiento por la técnica de difusión en disco en Agar Papa Dextrosa.

Para la evaluación de la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* cepa ATCC 10231, se evaluó frente a un control positivo Fluconazol disco impregnado con 20 μ l y un control negativo, para así obtener un punto de comparación en evaluación de la inhibición de crecimiento



Cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231 evidenciando colonias blancas lisas y brillantes. Blastoconidias, ovaladas tamaños aproximado 4- 6 μ m



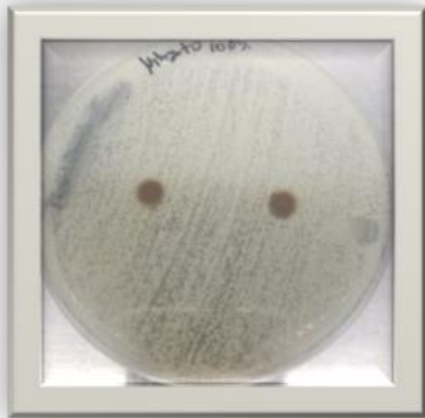
Evaluación inhibición de crecimiento con discos impregnados con Nitrato de Plata AgNO₃.



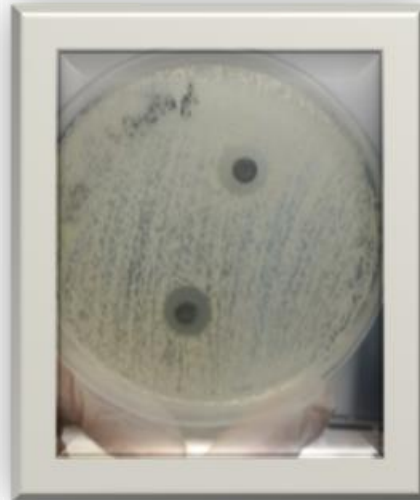
Evaluación inhibición de crecimiento con discos impregnados con Extracto de Moringa.

Fase 3

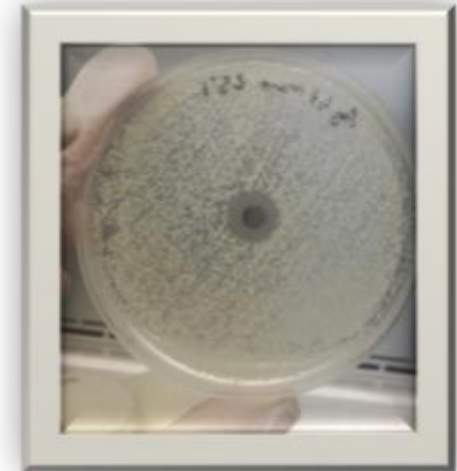
Evaluación de la inhibición de crecimiento por la técnica de difusión en disco en agar PDA.



Evaluación inhibición de crecimiento con discos impregnados con Nanopartículas a una proporción de volumen del 75 %. Halo de inhibición de 12 mm



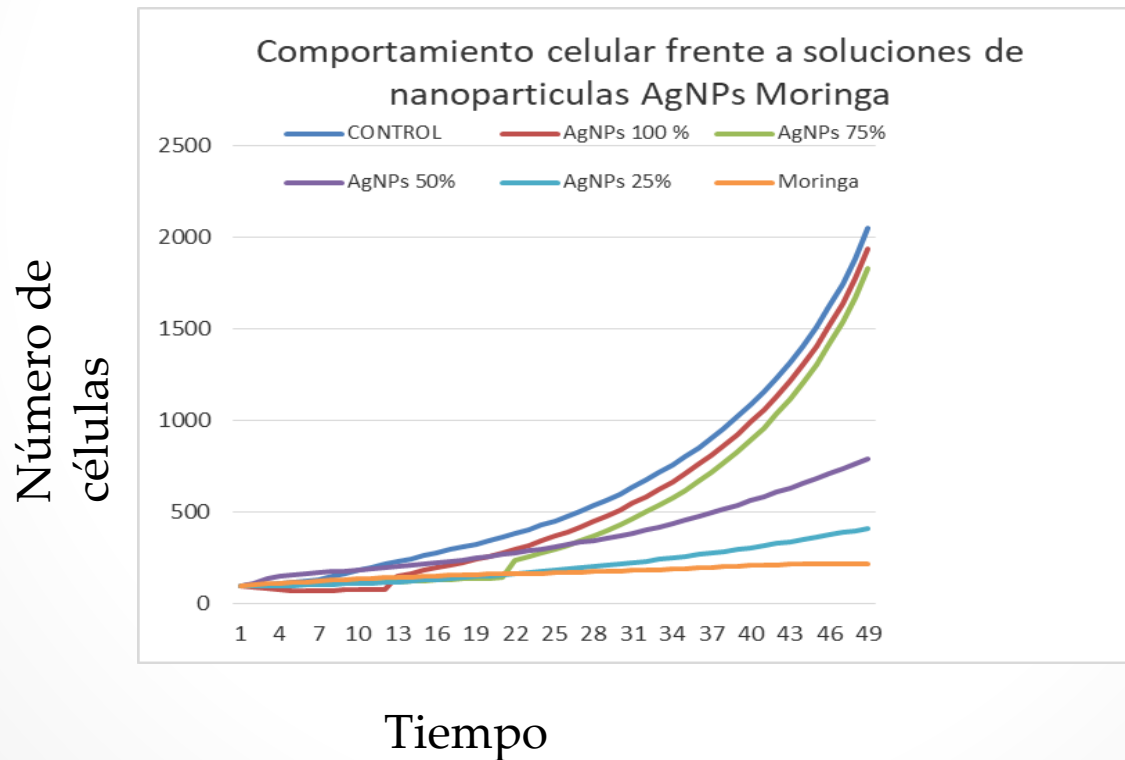
Evaluación inhibición de crecimiento con discos impregnados con Nanopartículas a una proporción de volumen al 50 %. Halo de inhibición de 14 mm



Evaluación inhibición de crecimiento con discos impregnados con Nanopartículas a una proporción de volumen al 25 %. Halo de inhibición de 14 mm

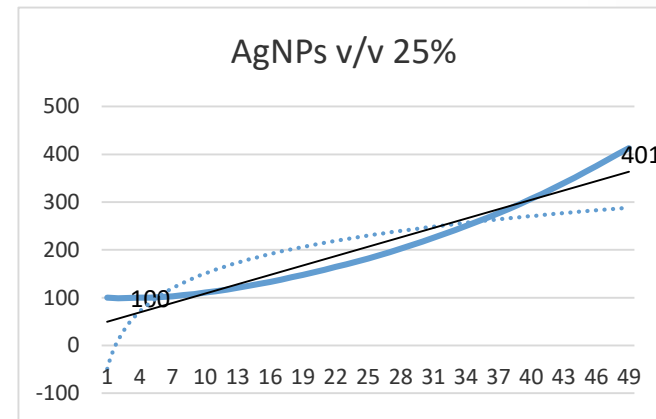
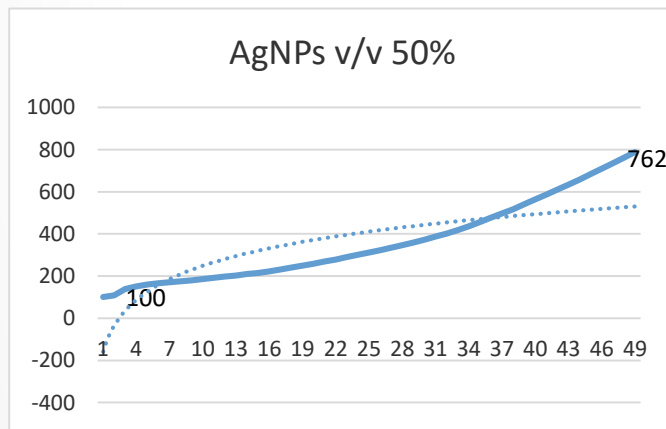
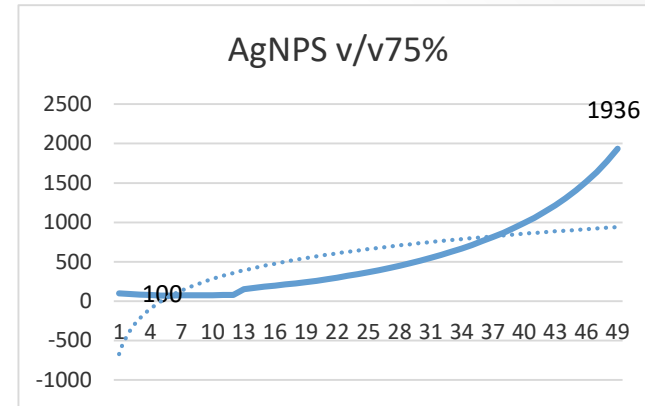
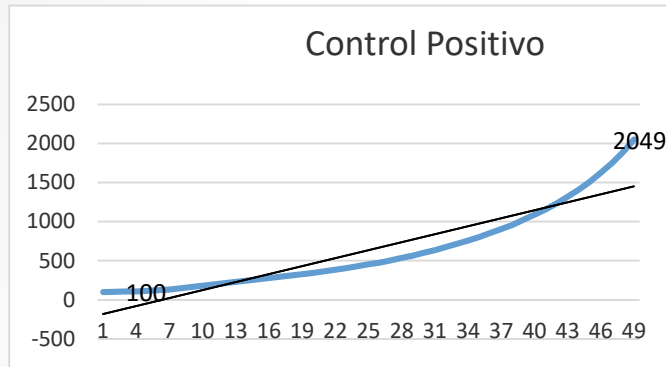
Fase 4

Valoración de sensibilidad a las nanopartículas por medio del equipo Bioscreen C10- Ensayo de curva de crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231



Fase 4

Valoración de sensibilidad a las nanopartículas por medio del equipo Bioscreen C10- Ensayo de curva de crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231



Para evidenciar mejor el comportamiento frente a la tendencia logarítmica de los resultados en el ensayo, se elaboraron las siguientes graficas En donde se aprecia que al igual que en el control la tendencia al final del ensayo es a continuar el crecimiento aunque se presente un número menor de células, esto sugiere un efecto fungistático al final del ensayo

Discusión

- Estudios propuestos por Shakeel et al en 2016 y Coz Bolaños han usado extracto hidroalcohólicos de *Moringa oleifera* para la inhibición de crecimiento de *Candida albicans* mostrando la inhibición a altas concentraciones, caso contrario a la evaluación de inhibición con el uso de extracto acuoso en donde se logra evidenciar una inhibición de crecimiento a una concentración menor.
- Técnicas de difusión en disco como las propuestas por Vinnetha 2016 y la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria, permiten solo evidenciar un efecto fungicida. Para este caso la evaluación de las Nanopartículas de plata, requieren pruebas complementarias por la toxicidad de plata frente a los mecanismos de resistencia y la capacidad de adaptación y formación de biofilm de *Candida albicans*, lo que nos permite evidenciar en nuestro estudio la posibilidad de evaluar bajo técnicas complementarias para la evaluación fungistática de la aplicación de Nanopartículas de plata.
- Avello et al 2019, sugiere que el efecto antimicrobiano y antifúngico a partir de extractos botánicos a través de microdosis o diluidos en donde se evidencia que a mayor dilución de la solución hay mayor inhibición, demostrada en nuestro estudio de acuerdo a la inhibición de crecimiento de *Candida albicans* a las concentraciones al 50% y 25% del extracto acuoso de *Moringa oleifera*.
- Se ha demostrado que las nanopartículas de plata tienen un efecto inhibitorio en la formación de la biopelícula formada por *Candida albicans*, debido a su disrupción en la membrana celular y su inhibición en la filamentación. Lara et al 2015, lo que permite reconocer una alternativa efectiva en el tratamiento para inhibir la resistencia. Mostrando en nuestro caso una inhibición de crecimiento disminuyendo la capacidad para la formación de biofilm.

CONCLUSIONES

- El extracto acuoso de *Moringa oleifera* fue ideal para la obtención de componentes antioxidantes abundantes en las hojas, actuando como agentes reductores iones de plata y estabilizantes en la biosíntesis de nanopartículas plata.
- Se hallaron las características morfológicas esperadas mediante microscopia de fuerza atómica (AFM), donde la nanoesferas tienen un tamaño entre 50 a 70nm, lo cual les permite una mejor interacción y penetración en las membranas celulares.

- En los ensayos de crecimiento fúngico realizados en *Candida albicans* cepa ATCC 10231 se evidenció una inhibición en la concentración celular inicial comparando el control positivo a partir de las concentraciones establecidas.
- Con los datos obtenidos en este estudio, se evidenció un crecimiento evaluado por el ensayo de curva de crecimiento lo que permite reconocer su efecto fungistático y no fungicida, haciendo necesario un posterior estudio sobre la evaluación de dicho efecto.

Recomendaciones

- Realizar ensayos para mejorar la técnica de la síntesis de nanopartículas con la hoja fresca de *Moringa oleifera* y evaluar la formación de nanoesferas.
- Evaluar la aplicación de Nanopartículas de plata y la toxicidad en modelos biológicos, para su posterior aplicación en dispositivos médicos u odontológicos.

Referencias bibliográficas

- Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *J Adv Res [Internet]*. 2016;7(1):17–28. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>
- Jasuja ND, Gupta DK, Reza M, Joshi SC. Green synthesis of AgNPs stabilized with biowaste and their antimicrobial activities. *Brazilian J Microbiol*. 2014;45(4):1325–32
- Villamizar R, Monroy L. Uso de Nanopartículas de plata en el control de microorganismos patógenos presentes en alimentos. *LIMENTECH-Ciencia y Tecnol Aliment*. 2015;13(1):54–9.
- Rodríguez-Luis, O. E., Hernández-Delgadillo, R., Sánchez-Nájera, R. I., Martínez-Castañón, G. A., Niño-Martínez, N., Sánchez Navarro, M. D. C., ... Cabral-Romero, C. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles and their bactericidal and antimycotic activities against oral microbes. *Journal of Nanomaterials*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9204573>
- Vazquez-Muñoz, R. (2013). Efectos de las nanopartículas de plata en el hongo patógeno *Candida albicans*.
- Vibhute SK*, K. V. K. P. W. G. (2014). Synthesis of Silver Nanoparticles From Moringa Oleifera: Formulation and Evaluation Against *Candida Albicans*. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 4(3), 1581–1587.
- Taxonomy browser. *Candida albicans*. Consultado 2018 Agos 18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5476>
- Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001;9(7):327–35.
- Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horiz Med (Barcelona)*. 2018;18(1):75–85
- Álvarez TR, Lancha IMP, Gerardo IL, Machín M, Rentería YB, Clara III, et al. Candidiasis invasiva en una unidad de cuidados intensivos neonatales de La Habana Invasive candidiasis observed in an intensive neonatal care unit in Havana. 2017;89(3):319–29.
- Park Y. A new paradigm shift for the green synthesis of antibacterial silver nanoparticles utilizing plant extracts. *Toxicol Res [Internet]*. 2014;30(3):169–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.5487/TR.2014.30.3.169>
- Canett-Romero R, Arvayo-Mata KL, Vanessa R-GN. ASPECTOS TÓXICOS MÁS RELEVANTES DE Moringa oleifera Y SUS POSIBLES DAÑOS MOST RELEVANT TOXIC ASPECTS OF Moringa oleifera AND ITS POSSIBLE DAMAGES. 2014 [Internet]. 2013;37–43. Disponible en: www.biotecnica.uson.mx
- Echavarría A, D'Armas Regnault H, Lisbeth N, Matute L, Jaramillo C, Rojas de Astudillo L, et al. Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales / Evaluation of antioxidant capacity and secondary metabolites of sixteen medicinal plants extracts. *Cienc Unemi*. 2018;9(20):29
- Rivera LEC, Ramos AP. Actividad antimicótica de nanopartículas. 2014;7(12)
- Moodley JS, Krishna SBN, Pillay K, Serphen, Govender P. Green synthesis of silver nanoparticles from Moringa oleifera leaf extracts and its antimicrobial potential. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*. 2018;9
- Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 2004; 39 (3):309-17.
- Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, Eggimann P, Ruef C, Garbino J, et al. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clin Infect Dis*. 2004; 38 (3):311-20.
- Menzin J, Meyers J, Friedman M, Perfect J, Langston A, Danna R, et al. Mortality, length of hospitalization, and costs associated with invasive fungal infections in high-risk patients. *Am J Health Syst Pharm*. 2009;66(19):1711-7.
- Kasper, D. L., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., & Loscalzo, J. (2018). Harrison's principles of internal medicine.