



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

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

2019



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

Estudiantes:

Cristian Camilo Betancourt Ramírez
Cristel Alejandra Ramírez Doronsoro

Asesor:

Marcela Gómez Garzón MSc.

Asesor Interno:

Jovanna Acero Monroy MSc.

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

2019

DEDICATORIA

Este trabajo es dedicado principalmente a Dios por brindarme la sabiduría, la salud, para llevar a cabo y concluir exitosamente esta investigación para optar por mi título profesional superando todas las pruebas y obstáculos que se fueron presentando en el camino.

Mis amigos y amigas que siempre estuvieron para apoyarme y subirme el ánimo en los momentos más difíciles, nombrarlos a todos sería imposible ya que de todos tengo una parte en mi corazón y momentos que jamás olvidare, entre actividades académicas, problemas y miles de locuras que nos unieron al punto de ser una segunda familia.

A mis padres William Betancourt y Consuelo Ramírez, hermana menor Laura Betancourt, hermana y colega Katerinne Betancourt por siempre estar ahí para mí en los momentos más difíciles de mi vida brindándome todo su apoyo incondicional, estando presente en mis alegrías y desaciertos para siempre tener un soporte en las dificultades, a mis abuelos paternos Carmen y Héctor, pero en especial dedico esta tesis a mi abuelita Blanca Ramírez la cual me brindo todo su amor incondicional y apoyo dejando las mayores enseñanzas en mi vida haciéndome ser una mejor persona, hoy que estoy tan cerca de conseguir mi título profesional sé que aun estando en el cielo esta tan orgullosa de mi por haber cumplido esa promesa que hicimos hace años de que en la familia habría un nuevo profesional de la salud y aunque no estará físicamente en primera fila como lo acordamos sé que estará junto a mí en el resto de mi vida y más en estos momentos de alegría.

A todos, muchas gracias

Cristian Camilo Betancourt Ramírez

Este trabajo es dedicado principalmente a Dios por brindarme la oportunidad de vivir esta experiencia tan enriquecedora, llenándome de salud y sabiduría para superar cada reto y alcanzar mis metas; por los triunfos que me ha ayudado a obtener y por todos aquellos momentos de dificultad que he superado y me han dejado un aprendizaje.

A mimamá Andrea Doronsoro por ser tan maravillosa mujer, por brindarme su apoyo en todo lo que he necesitado durante toda mi vida, por su apoyo incondicional, por impulsarme y motivarme durante toda mi formación personal y profesional, por sus palabras llenas de amor y comprensión.

A mí ángel, German Ramirez que aunque no esté físicamente conmigo sé que desde el cielo me cuida y guía para seguir cada día adelante siendo una de mis mayores motivaciones, por haber sido el mejor padre llenándome de amor y sabiduría, ayudándome siempre a lograr mis sueños y metas.

A mi abuelita Josefina Mora por tan buena comunicación, por su infinita paciencia, consejos, vivencias, por cada aventura juntas, por cada experiencia que me ha fortalecido y porque gracias a su apoyo es posible culminar este proyecto.

M.Y.M.S y Y.A.R.G. por haber estado a mi lado en cada momento de dificultad dándome siempre el apoyo que necesité para seguir adelante y no rendirme, por sus palabras llenas de ternura y su amor incondicional.

A la profesora Marcela Gómez quien fue fundamental para obtener este triunfo, por ser un gran ejemplo, por brindarme sus conocimientos, su amistad, apoyo y consejos que son muy importantes para mi crecimiento personal y profesional.

Cristel Alejandra Ramirez Doronsoro

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo lo dedicamos a Dios por brindarnos fuerza y protección para culminar todas nuestras metas propuestas tanto a corto como a largo plazo, por brindarnos su bendición formándonos para cada día ser mejores personas.

Los agradecimientos van hacia nuestra directora de tesis la Dra. Marcela Gómez y nuestra asesora la Profesora Jovanna Acero, que nos brindaron toda su sabiduría y tiempo para lograr que este trabajo fuera posible, contando con el apoyo incondicional, el profesionalismo y fundamentalmente el respeto hacia nosotros compartiéndonos todos sus conocimientos.

A la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud (FUCS) por ser el lugar que nos acogió, proporcionándonos todos los materiales e instalaciones necesarias y financiando todo el proceso investigativo para el desarrollo de este proyecto.

A todos los docentes que hicieron parte de nuestra formación que día a día nos brindaron nuevas enseñanzas y nos dejaron conocimientos irremplazables, mencionarlos a todos sería imposible ya que cada uno deja una parte en nuestro corazón.

Gracias a nuestros padres, por habernos proporcionado la mejor educación y lecciones de vida, animándonos a crecer como personas y como profesionales. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría realizado, por eso, este trabajo es también el suyo. Por su amor y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí. Son los mejores padres.

Finalmente a nuestra amada Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca la cual fue nuestro hogar por estos 5 años dándonos momentos felices con personas irremplazables, donde nos formaron no solo como profesionales sino también como profesionales íntegros para la sociedad.

Tabla de Contenido

1. Resumen.....	13
Introducción.....	14
2. Objetivos	16
2.1 Objetivo general	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. Antecedentes	17
4. Marco teórico	21
4.1 Generalidades de <i>Candida spp.</i>	21
4.1.1 Características y morfología.....	21
4.1.2 Candidiasis sistémicas	23
4.1.3 Formación de biofilm	25
4.2 Nanopartículas de Plata.....	29
4.2.2 Síntesis verde de nanopartículas	30
4.2.3 Propiedades antifúngicas	32
5. Diseño metodológico.....	34
5.1 Tipo de investigación.....	34
5.2 Obtención de nanopartículas	34
5.3 Preparación de acrílicos.....	35
5.4 Selección de cepas	35
5.4.1 Selección de cepas productoras de biofilm	36
5.4.2 Protocolo de formación de biofilm de levaduras sobre acrílicos.....	37
5.5 Determinación de Concentración mínima inhibitoria (CMI) para NPsAg-47 y NPsAg-49	38

5.6 Evaluación del efecto de NPsAg en la síntesis de biofilm por Blanco de Calcoflúor (BC).....	41
5.7 Evaluación del efecto de NPsAg en la síntesis de biofilm por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	42
6. Resultados	44
6.1 Nanopartículas de plata	45
6.2 Formación de Biofilm.....	46
6.2.1 Cepas productoras	46
6.2.2 Protocolo de formación de biofilm de levaduras sobre acrílicos.....	47
6.3 Evaluación del efecto de NPsAg en la síntesis de biofilm por Blanco de Calcoflúor (BC).....	53
7. Discusión.....	65
8. Conclusiones.....	70
Referencias Bibliográficas.....	71
ANEXOS	75

Índice de tablas

Tabla 1: Taxonomía de <i>Candida spp.</i> Tomado de NCBI. (22)	22
Tabla 2: Condiciones de síntesis de NPsAg por Síntesis Verde	35
Tabla 3 Controles usados en el estudio de CMI. Autores	39
Tabla 4 Cepas productoras de Biofilm seleccionadas. Autores	46
Tabla 5 Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de <i>Candida albicans</i> . Autores.....	47
Tabla 6 Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de <i>Candida guilliermondii</i> . Autores.....	48
Tabla 7 Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de <i>Candida tropicalis</i> . Autores.....	49
Tabla 8 Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de <i>Candida auris</i> . Autores	50
Tabla 9 Resultado de CMI para NPsAg. Autores	53
Tabla 10 Evaluación por SEM del efecto producido por NPsAg-47 y NPsAg-49 en biofilm de <i>Candida albicans</i> . Autores	62
Tabla 11 Evaluación por SEM del efecto producido por NPsAg-47 y NPsAg-49 en biofilm de <i>Candida tropicalis</i> . Autores	63
Tabla 12 Evaluación por SEM del efecto producido por NPsAg-47 en biofilm de <i>Candida auris</i> . Autores.....	63

Índice de figuras

Figura 1: Morfología de <i>Candida albicans</i> . Autores	23
Figura 2: Proceso del desarrollo de biofilm fúngico. Autores	27
Figura 3: Producción de NPsAg, síntesis verde (Reacción). Autores	31
Figura 4: Reducción de NPsAg por síntesis verde desde Borojo. Autores.....	32
Figura 5: Flujograma procedimiento ensayo formación de biofilm. Autores	38
Figura 6: Flujograma procedimiento ensayo con NPsAg por BC	43
Figura 7: Flujograma procedimiento ensayo con NPsAg por SEM	44
Figura 8: Distribución del número de NPsAg de acuerdo al tamaño. Universidad Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE).....	45
Figura 9: Microscopia SEM de las NPsAg. Universidad Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE).....	46
Figura 10: Gráficos de dispersión para la determinación de CMI de las NPsAg-47 y NPsAg-49 para <i>Candida albicans</i> . Autores	51
Figura 11: Gráficos de dispersión para la determinación de CMI de las NPsAg-47 y NPsAg-49 para <i>Candida guilliermondii</i> . Autores	51
Figura 12: Gráficos de dispersión para la determinación de CMI de las NPsAg-47 y NPsAg-49 para <i>Candida tropicalis</i> . Autores	52
Figura 13: Gráficos de dispersión para la determinación de CMI de las NPsAg-47 y NPsAg-49 para <i>Candida auris</i> . Autores	52
Figura 14: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Pre-biofilm de <i>Candida albicans</i> . Autores.....	54
Figura 15: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Post-biofilm de <i>Candida albicans</i> . Autores.....	54
Figura 16: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Pre-biofilm de <i>Candida albicans</i> . Autores.....	55
Figura 17: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Post-biofilm de <i>Candida albicans</i> . Autores.....	55
Figura 18: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Pre-biofilm de <i>Candida guilliermondii</i> . Autores.....	56
Figura 19: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Post-biofilm de <i>Candida guilliermondii</i> . Autores.....	56
Figura 20: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Pre-biofilm de <i>Candida guilliermondii</i> . Autores.....	57
Figura 21: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Post-biofilm de <i>Candida guilliermondii</i> . Autores.....	57
Figura 22: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Pre-biofilm de <i>Candida tropicalis</i> . Autores.....	58
Figura 23: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Post-biofilm de <i>Candida tropicalis</i> . Autores.....	58

Figura 24: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Pre-biofilm de <i>Candida tropicalis</i> . Autores.....	59
Figura 25: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Post-biofilm de <i>Candida tropicalis</i> . Autores.....	59
Figura 26: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Pre-biofilm de <i>Candida auris</i> . Autores.....	60
Figura 27: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Post-biofilm de <i>Candida auris</i> . Autores.....	60
Figura 28: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Pre-biofilm de <i>Candida auris</i> . Autores.....	61
Figura 29: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Post-biofilm de <i>Candida auris</i> . Autores.....	61
Figura 30 Deformación a nivel de membrana de levaduras de <i>C. albicans</i> . Autores ...	64

1. Resumen

Las infecciones causadas por levaduras generalmente son de carácter oportunista, afectan principalmente a pacientes que requieren el uso de catéteres. *Candida sp* posee como factor de virulencia la formación de biofilm, lo cual le permite invadir tejidos vivos, zonas inertes como dispositivos médicos y evadir tratamientos. (1-3) Las nanopartículas de plata (NPsAg) presentan actividad antimicrobiana, por lo cual se determinó su capacidad para inhibir la formación de biofilm de *Candida sp* y su efecto sobre biofilm pre-formados. Para ello, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) in vitro de las NPsAg pre y post formación de biofilm sobre cuadros de acrílico con cuatro levaduras, *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* y *C. auris*, seleccionadas previamente y evaluadas durante el experimento por medio de tinción de Cristal Violeta (CV1.0%), Coloración de Gram, Blanco Calcofluor (BC), reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) como medidor de viabilidad celular y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Se observó inhibición de la formación del biofilm (Pre-Formación) en diferentes concentraciones de NPsAg-47: *C. albicans* 0,5µg/ml, *C. guilliermondii* 0,25µg/ml, *C. tropicalis* 0,25µg/ml y *C. auris* 1,0µg/ml; NPsAg-49: *C. albicans* 1,0µg/ml, *C. guilliermondii* 0,5µg/ml, *C. tropicalis* 0,5 µg/ml y *C. auris* 0,5 µg/ml y una concentración de 0,5µg/ml de NPsA-47 en Post-biofilm para todas las especies de *Candida*, lo cual permite concluir que las NPsAg son capaces de inhibir la formación de biofilm y provocar la eliminación de biofilm pre-formados.

Palabras clave: *Candida*; *Biofilms*; *Nanopartículas de plata*.

Autores: Cristian Camilo Betancourt Ramirez; Cristel Alejandra Ramirez Doronsoro.

Asesores: Marcela Gómez Garzón; Jovanna Acero Monroy

Introducción

Las infecciones fúngicas que se generan en hospitales se deben principalmente a la colonización de los dispositivos médicos invasivos por biofilm debido a su flujo continuo, materiales y tiempo que se encuentra en uso. La mayoría de estas infecciones son provocadas por levaduras del género *Candida*, convirtiéndose en un reto para el tratamiento propuesto a los pacientes en estado crítico por generación de resistencia a antifúngicos. La candidemia genera alta mortalidad en los pacientes de UCI, aumentando el número de días-pacientes hospitalizados. (4, 5)

La nanotecnología se enfoca en la fabricación de materiales en nanoescala usados con múltiples fines como los farmacéuticos, esto se logra mediante diferentes métodos, la técnica basada en síntesis verde es la que genera menor impacto al medio ambiente, al ser una metodología basada en el uso de microorganismos o extractos vegetales sin generación de residuos tóxicos. Las nanopartículas de plata (NPsAg) producidas con esta metodología presentan un efecto inhibitorio a baja concentración sobre el biofilm de microorganismos el cual se determina mediante lectura por absorbancia, brindando alternativas en tratamientos de diferentes tipos de infecciones. En estudios recientes, las NPsAg muestran eficacia contra *Candida spp.* Alterando la estructura de la membrana y formando poros que causan la fuga de iones y otros materiales, inducen apoptosis y provocan cambios ultraestructurales que llevan a la muerte de la levadura. (6)

La microscopía de barrido electrónico es la técnica utilizada para producir imágenes microscópicas en alta resolución utilizando un haz de electrones, teniendo como función visualizar texturas, objetos y microorganismos que se hayan recubierto previamente con un metal para su observación, esta técnica se ha utilizado para confirmar el daño causado en la membrana de las células que conforman el biofilm y la efectividad por parte de tratamientos innovadores.

Basados en lo anteriormente mencionado y teniendo en cuenta los estudios previamente realizados por el grupo de investigación GRIMIC se da continuidad a la línea investigativa mediante el desarrollo de múltiples protocolos para conocer los requerimientos adecuados para la formación óptima de biofilm, por lo tanto se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde de borjón afectan la formación del biofilm producido por especies de *Candida sp* sobre placas de acrílico?

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde de Borojó sobre biofilm de cepas de *Candida spp.*

2.2 Objetivos específicos

- Generar un protocolo para creación de biofilm de *Candida spp.* 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.

3. Antecedentes

Pérez y col, (7) en el año 2002, demostraron que en los pacientes pediátricos con patología hemato-oncológica, los hongos eran la principal causa de infección de catéter venoso central (CVC) de larga duración, siendo *Candida sp*, responsable de más de la mitad de las infecciones de CVC. No se evidenciaron factores de riesgo asociados como tratamiento con antibiótico o corticosteroides simultáneamente, presencia de válvulas derivativas, ni nutrición parenteral, además de la presencia del CVC para la infección por *Candida spp*. Al analizar 2.539 días de uso de CVC de larga duración, la tasa de infección por hongos asociado a 1.000 días de uso de CVC fue de 1,9%.

Seidler y col, (8) en el año 2010, infectaron catéteres de silicona colocados quirúrgicamente en conejos blancos de Nueva Zelanda con *C. albicans*. Evaluaron catéteres sin recubrimiento y recubiertos con Anfotericina B liposomal (LAMB) y fluconazol. Por medio de la microscopía electrónica de barrido (SEM) se observó abundante biofilm en los grupos de control y fluconazol, mientras que en el grupo LAMB evidenció una reducción del biofilm. Determinaron que LAMB puede erradicar biofilm en concentraciones de 0,5µg/mL.

Monteiro y col, (9) en el año 2011, al estudiar estomatitis en pacientes con prótesis dentales aislaron *C. albicans*, *C tropicalis*, *C. glabrata* como agentes causantes de la infección. Evaluaron la capacidad de creación de biofilm de estas cepas por la técnica de cristal violeta (CV) y por recuento de unidades formadora de colonia (UFC) se determinaron las células adheridas al biofilm de *Candida sp* al ser tratados con NPsAg. Determinaron que la actividad antifúngica era mayor contra *C. glabrata* que contra *C. albicans* al usar concentraciones de NPsAg superiores a 3,3 mg/ml.

Sardiy col, (10) establecieron en el año 2013, la importancia de la epidemiología y patogenicidad de las infecciones causadas por *Candida spp*. En la recopilación de datos realizada de los principales centros médicos de América del Norte, se observó un predominio de especies no albicans, *C. glabrata* 14%, *C. parapsilosis* 14%, *C.*

tropicalis 7.0% y *C. krusei* 2.0%, aunque *C. albicans* fue la especie más frecuentemente aislada 63%. En Sur América, también se observó un cambio en los índices de aislamientos de acuerdo con el estudio de candidemia de la Red Brasileña, *C. albicans* representó el 40.9% de los casos en Brasil, seguido de *C. tropicalis* (20%), *C. parapsilosis* (20%), *C. glabrata* (4.9%) y otras especies (12%), concluyendo que la mayor incidencia de micosis sistémicas causadas se debe a especies de *Candida* sp en pacientes hospitalizados.

Selvaraj y col, (2) en el año 2014, basados en el desarrollo de resistencia de *C. albicans* a los antimicóticos convencionales como anfotericina, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, equinocandinas, caspofungina, micafungina y anidulafungina, buscaron encontrar nuevas moléculas para el tratamiento de infecciones por *Candida* sp sin efectos adversos sobre las células del huésped. Sintetizaron NPsAg y las estabilizaron con polivinilpirrolidona. Evaluaron su actividad antifúngica contra el crecimiento de *C. albicans*, con lo cual lograron observar que el crecimiento de *C. albicans* se inhibió marcadamente cuando se incubaron con NPsAg a muy baja concentración (0.07 µg/ml).

Monteiro y col, (11) en el año 2014, estudiaron la estabilidad química de las NPsAg y su eficacia contra biofilm de *C. albicans* y *C. glabrata*. Estas nanopartículas fueron expuestas a precalentamiento de 50°C, 70°C y 100°C y cambios de pH de 5.0 a 9.0. Los resultados no mostraron influencia significativa en la biomasa total o la viabilidad celular del biofilm de *Candida*, lo cual les permitió concluir que la temperatura y las variaciones de pH de NPsAg no afectaron su eficacia.

Vazquez y col, (5) en el año 2014, determinaron que el tamaño de las NPsAg es de vital importancia para cumplir su función sobre cepas de *C. albicans* multiresistentes. Las NPsAg utilizadas fueron examinadas bajo microscopía electrónica de transmisión (TEM) para determinar su forma y tamaño. Se encontró que las NPsAg eran cuasi-esféricas, el rango de tamaño fue de 3-60 nm antes y después de la exposición y con efecto fungicida.

Lara y col, (6) en el año 2015, utilizaron un modelo de formación de biofilm en pocillos de placas de microtitulación para examinar los efectos inhibidores de las nanopartículas de plata (NPsAg) contra *C. albicans*, tanto para evaluar la inhibición de la formación de biofilm como la eliminación de células fúngicas. Se demostró la inhibición de la formación de biofilm de *C. albicans* y que las NPsAg fueron efectivas contra biofilm preformado debido a que la carga positiva de las NPsAg altera la membrana, volviéndola áspera y distendida debido al aumento de la permeabilidad, lo que permite que las NPsAg más pequeñas entren a la célula.

Motoa, G y col., (12) en el año 2017, realizaron una recopilación de casos reportados de infección intrahospitalaria durante 2010 y 2013 en los laboratorios de microbiología de 20 instituciones de tercer nivel en 10 ciudades de Colombia a través de Whonet® versión 5.6. Los aislados de *Candida* constituyeron el 94.5% de los 2680 hongos aislados, las frecuencias fueron similares para *C. albicans* y *C. no albicans* (48.3% y 51.7%, respectivamente). Entre las especies de *C. no albicans* se reportaron *C. tropicalis* (38.6%) y *C. parapsilosis* (28.5%) como las especies más frecuentes. Esto les permitió concluir que en las UCI de Colombia, el comportamiento de las levaduras es similar al reportado internacionalmente.

Rangel y col, (13) en el año 2018, realizaron evaluación de la capacidad de formación de biofilm de especies de *Candida* aisladas del torrente sanguíneo de pacientes con candidemia. Utilizando la técnica de cristal violeta y XTT se determinó que la especie que produjo biofilm con la biomasa más alta fue *C. tropicalis* (52,8%) y con la actividad metabólica más alta fue *C. glabrata*. Adicionalmente, permitiendo establecer que la tasa de morbilidad de los pacientes con candidemia estaba directamente relacionado con la fuerte formación biofilm.

Aggarwal y col, (14) en el año 2018, compararon la capacidad de producción de biofilm de diversas especies de *Candida* aisladas de 451 muestras clínicas y evaluadas mediante ensayo de cristal violeta. Se encontró que *C. albicans* constituía el 30% de los aislamientos de *Candida*, mientras que *C. tropicalis* era responsable de infección en

el 40% de los aislamientos. Las especies de *Candida no albicans* están reemplazando gradualmente a *C. albicans* debido a su exponencial aumento en infecciones clínicas. Con diferentes muestras biológicas (orina, hemocultivo, esputo, lavado bronco alveolar, pus, material de biopsia, uñas y LCR) se demostró que la capacidad de creación de biofilm por parte de *Candida* es alta, la presencia de biofilm en las muestras de hemocultivo evidencia la importancia clínica debido a la fácil invasión de dispositivos médicos como líneas venosas centrales o catéteres siendo factor predisponente para posible candidemia. En el caso de pacientes que no responden a terapia antifúngica típica se debe considerar pruebas para producción de biofilm.

Barahona, J y col., (15) en el año 2019, realizaron un estudio epidemiológico sobre infecciones intrahospitalarias ocurridas entre 2008 y 2014, en un hospital universitario de Bogotá, Colombia. En este estudio incluyeron 123 casos de candidemia, en donde la especie más aislada fue *C. albicans* (42%), seguida de *C. tropicalis* (20%), *C. parapsilosis* (12%) y *C. krusei* (8%). Gracias a sus resultados pudieron evidenciar que *Candida spp.*, es la quinta causa de infección masiva e invasiva en pacientes con condiciones de salud crítica.

El Instituto Nacional de Salud, en el año 2019, debido al aumento de infección por *C. auris* emitió un boletín de prensa, en donde informa que *C. albicans* sigue siendo la levadura de esta familia que representa mayor riesgo de enfermedad y muerte. Se aclaró que se ha realizado seguimiento a los casos confirmados como infección por *C. auris* y que todos los aislamientos han sido sensibles a los antifúngicos, por lo que se descarta la presencia en Colombia del “super hongo”. Adicionalmente informan que no se han registrado muertes por estas infecciones y aclaran que los pacientes que han adquirido infección con esta levadura, han sido enfermos en unidad de cuidados intensivos con comorbilidades severas y en algunos casos inmunosupresión. (16)

4. Marco teórico

4.1 Generalidades de *Candida spp.*

Los hongos causan infecciones que a menudo son difíciles de diagnosticar y tratar, debido a la generación de resistencia a antifúngicos lo que resulta en tasas de morbi-mortalidad elevadas. (2) Desde 1980, aumentaron los reportes de *Candida spp.* como patógeno humano y responsable de infecciones en pacientes hospitalizados e inmunosuprimidos, (14, 17) relacionado con aquellos que requieren el uso de dispositivos invasivos, como lo son los catéteres.

El estado inmunológico no es el único factor de riesgo relacionado con el uso de dispositivos médicos invasivos. Se han reportado pacientes con inmunidad normal con infección por *Candida*. (18) La probabilidad de encontrar una infección por especies de *Candida*, varía de un 2,0% al 37% en población con sistema inmunológico normal y un 13% al 76% en pacientes críticos. (17, 19) *C. albicans* (43%) ha sido la especie predominante debido a su carácter de microbiota normal, no obstante, está siendo reemplazada por *C. no albicans*, principalmente por *C. tropicalis* (34%), *C. glabrata* (12%) y las otras especies (11%). (14, 17)

4.1.1 Características y morfología

El género *Candida* son hongos pertenecientes al Phylum Ascomycota (Tabla 1), que comprende alrededor de 200 especies, de las cuales solo 20 son de importancia clínica. (19) Crecen como levaduras ovaladas o redondeadas, tamaño de 4.0 a 6.0 μm , se reproducen por gemación (blastoconidias), la mayoría de especies pueden formar pseudohifas y algunas hifas reales (Figura 1). (20, 21)

Tabla 1: Taxonomía de *Candida spp.* Tomado de NCBI. (22)

TAXONOMÍA	
REINO	Fungi
FILO	Ascomycota
SUBFILO	Saccharomycotina
CLASE	Saccharomycetes
SUBCLASE	Saccharomycetales
FAMILIA	Debaryomycetaceae
GÉNERO	<i>Candida</i>

La función de la pseudohifa radica en la adhesión de la levadura para poder causar una invasión sobre la superficie biótica o abiótica, además ayuda en procesos de nutrición; razón por la cual su presencia es un factor crucial en el proceso de invasión, complicando así los tratamientos de pacientes con infección causada por levaduras de importancia clínica (6) *Candida spp.* se encuentra como microbiota normal habitualmente aislada de la cavidad oral, el tracto gastrointestinal, urogenital y mucosas.

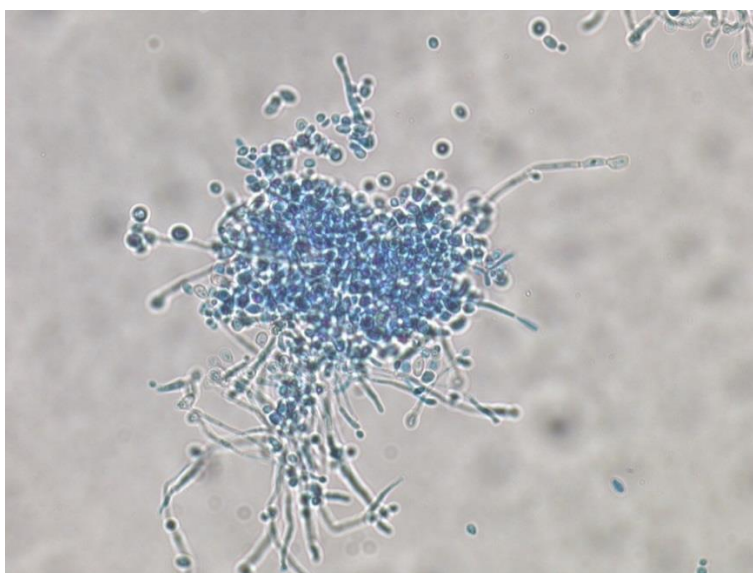


Figura 1: Morfología de Candida albicans. Autores

Las distintas especies de *Candida* pueden crecer en condiciones variables, en ambientes húmedos a una temperatura entre los 25 y 37°C (levadura termófila) y pH con rango entre 2,5 y 7,5, generalmente sus colonias son cremosas, limitadas, planas, opacas y en ocasiones rugosas o surcadas, de color blanco o blanco-amarillento. (19, 23)

La composición química de *Candida* está representada por proteínas y polisacáridos, la pared celular está compuesta por polisacáridos como la quitina, que ayuda en el proceso de la formación celular por medio de la gemación; glucano, que mantiene la estructura y rigidez de la pared celular y las manoproteínas que ayudan en la adhesión a los tejidos. (21, 24) La membrana citoplasmática es una estructura de gran importancia compuesta de proteínas y carbohidratos en menor proporción, contiene las enzimas responsables de la síntesis de la pared celular, presenta una doble capa de lípidos y posee invaginaciones. El núcleo es el encargado de almacenar el material genético y contiene una membrana nuclear acompañada de nucléolos. Las mitocondrias son los orgánulos cuya función es brindar la mayor parte de energía cumpliendo función de central energética y síntesis de ATP, en ausencia de estas sería imposible el uso de oxígeno y extracción de energía haciéndolas una región diana en tratamientos para la erradicación del hongo.

4.1.2 Candidiasis sistémicas

Alrededor del 70% de los pacientes ingresados en los hospitales son portadores de dispositivos intravasculares percutáneos. Con el paso de las décadas se ha evidenciado el aumento de micosis invasoras en pacientes de alto riesgo, estas infecciones están presentes en estos pacientes debido a que la mayoría de ellos requieren tratamientos con antibióticos de amplio espectro, esteroides y citotóxicos, además, necesitan implementar el uso de catéteres y procedimientos invasores. (19)

En Colombia desde el 2012, mediante la circular 045 de 2012 del Ministerio de Salud se comenzó a realizar vigilancia de las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) llevando un monitoreo desde el 1998 con un aumento en el año 2012-2013, las principales infecciones asociadas a dispositivos fueron las infecciones del torrente sanguíneo asociada a catéter en 5,1 casos e infecciones urinarias asociadas a catéter con 3,9 casos por 1000 días de uso de dispositivo. Los microorganismos que causan las infecciones torrente sanguíneo (ITS) asociadas a catéter acceden primero a la superficie intra o extraluminal del dispositivo donde se adhieren y se incorporan al biofilm que les permite mantener y diseminar la infección por la vía sanguínea, el método más frecuente de invasión es mediante ingreso percutáneo de organismos de la piel en el momento de la inserción del catéter y por su mala manipulación. (25)

En muchas Unidades de Cuidado Intensivo (UCI) se han evidenciado tasas acumuladas de infecciones relacionadas con el uso de ventilación mecánica, catéteres centrales y catéteres urinarios. En cuanto a las infecciones del torrente sanguíneo en pacientes hospitalizados en UCI, el 43,3% de los casos estuvo relacionada con uso de catéter central y los microorganismos más frecuentes fueron los *Staphylococcus* coagulasa negativos, *Enterococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp*, *Candida spp*.(25)

Candida sp es la tercera causa de infecciones relacionadas con catéteres después de *Staphylococcus* coagulasa negativo y *Staphylococcus aureus*, asociándose a altas tasas de mortalidad.(26, 27) El aumento de infecciones nosocomiales, especialmente del torrente sanguíneo (Candidemia), representa un 8-10% del total de los casos, que en la mayoría son pacientes que usan dispositivos médicos invasivos, al presentarse incremento de infecciones en pacientes hospitalizados con estado inmunológico comprometido y tratamientos convencionales ineficientes, aumenta la tasa de mortalidad a un rango de 35 % a 60 %. (3)

Candida spp., afecta principalmente mucosas como boca o vagina, piel, uñas y en forma sistémica otros órganos como pulmones y sistema digestivo.(20) Al presentarse

infección por *Candida*, el tratamiento oportuno es vital ya que esto puede cambiar el porcentaje de mortalidad de un 78% si el tratamiento es tardío a un 40% si se implementa el tratamiento de forma precoz.(17)

Aunque *C. albicans* es el agente más frecuente reportado en Candidiasis, en un estudio realizado por Cornistein y col se reporta el aumento de *Candidano albicans* como es el caso de *C. tropicalis* (24.61%), *C. glabrata* (8.10%) otras especies de *Candida* (10.56%) contra el índice de *C. albicans* (43.30%) demostrando que la prevalencia de *Candida no albicans* fue mayor que la de *C. albicans* (54.52% vs 43.3%).(19, 28)

C. guilliermondii junto a *C. parapsilosis* son microbiota normal en piel y uñas, por lo tanto se considera el foco de infección a través de manos (3-5%), en especial a nivel intrahospitalaria en pacientes que necesitan cambio frecuente de catéteres, causando una contaminación cruzada en dispositivos.(19, 20)

C. auris es una levadura que desde el 2015, se encuentra en vigilancia mundial por su presencia en infección nosocomial y su comportamiento multirresistente, especialmente al fluconazol, voriconazol, equinocandinas y a la anfotericina B. (29, 30) Debido a su difícil identificación por métodos convencionales se debe recurrir a equipos automatizados para evitar errores diagnósticos y fracaso en su tratamiento.(29)

4.1.3 Formación de biofilm

La virulencia de *Candida* se ha visto facilitada por diversos factores, entre los más importantes destacan la adherencia a los tejidos del huésped y dispositivos médicos, la formación de biofilm y la secreción de enzimas hidrolíticas (por ejemplo, proteasas, fosfolipasas y hemolisinas).(17) La formación de biofilm, juega un papel clave en la fisiopatología de la Candidiasis y siendo uno de los factores de virulencia más estudiado, particularmente en lo relacionado con dispositivos y catéteres in situ. (13)

El biofilm es una comunidad de microorganismos que forman una matriz polimérica orgánica autoproducida, que brinda ventajas nutricionales y cooperativas para mejorar el metabolismo y generar modificaciones genéticas.(14, 31) Las infecciones producidas por *C. albicans* están asociadas al crecimiento del biofilm, gracias a moléculas de señalización, como el farnesol, el ácido farnesoico, el triptofol y el alcohol feniletílico. El farnesol es una de las moléculas más importantes, ya que influye en la morfología de las levaduras sin afectar la tasa de crecimiento, induciendo la transición de levaduras a hifas y promover la dispersión de células de levadura de la superficie del biofilm. Adicionalmente, se ha reportado la presencia de genes implicados en la formación de biofilm (*mdr1*, *cdr1*, *cdr2* y *flo8*) y otros en la codificación de bombas de flujo mediante *cdr* y *mdr*, que mediaran en los procesos de resistencia antifúngica.(17, 32)

El biofilm puede ayudar a mantener el papel de los hongos como patógenos a evadir los mecanismos inmunes del huésped, resistir el tratamiento antifúngico y la presión competitiva de otros organismos. Adicionalmente, el biofilm facilita la captura de nutrientes y permite una cooperación metabólica gracias a la comunicación célula a célula que se presenta.(33)

La formación de biofilm de las levaduras se realiza por medio de un proceso complejo de cuatro pasos, este inicia con la adhesión de forma continua a la superficie a colonizar (tejido o dispositivo médico); seguido por el proceso de formación, maduración y dispersión (Figura 2). (33, 34)

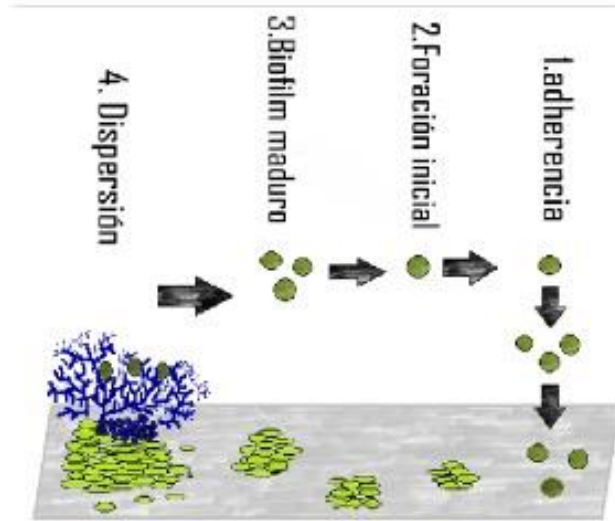


Figura 2: Proceso del desarrollo de biofilm fúngico. Autores

1. Adherencia a la superficie: es la etapa en la cual las células planctónicas empiezan a juntarse entre sí para formar una capa sobre la superficie, durante la adherencia las células fúngicas comienzan un proceso de secreción de proteínas de pared celular (ALS1, ALS3 Y HWP1) las cuales son necesarias para la adhesión, se encuentran reguladas mediante el gen *bcr1*.

2. Formación inicial: Las levaduras se multiplican y se acumulan para empezar a formar una matriz extracelular de polisacáridos con función estructural y de protección del biofilm ante antifúngicos, este proceso se encuentra a cargo de los reguladores RIM1 y Zap1. La formación de biofilm en este punto se da en dos etapas: la etapa temprana (4 – 11 horas) y la etapa intermedia (12 – 20 horas). Las hifas cumplen un papel de vital importancia en la proliferación del biofilm dando estabilidad y soporte a la estructura, en esta parte del proceso se encuentran involucrados los reguladores transcripciones Efg1, Tec1, Ndt80 y Rob1. (35)

3. Biofilm maduro: Se llega a la maduración del biofilm 24 a 72 horas, en este punto el biofilm de la levadura está compuesto por una densa red de levaduras, hifas y pseudohifas.

4. Dispersión: las levaduras que se ubican en la zona periférica del biofilm son liberadas a ambientes cercanos para expandir la colonización y dar inicio a un nuevo biofilm.

La producción de la matriz extracelular aumenta con la edad del biofilm y su composición se modifica según la especie que lo conforma. Se sabe que la función de la matriz se da mediante unos reguladores específicos, los cuales determinan la cantidad de la matriz, hay dos reguladores conocidos como *rlm1* y *zap1*. La eliminación de *rlm1* provoca una reducción en los niveles de la matriz, mientras que la eliminación de *zap1*, conduce a un aumento en la acumulación de material de la matriz extracelular. (35)

4.1.4 Resistencia a los antimicrobianos

La resistencia fúngica es una problemática que ha venido aumentando con el paso del tiempo y con el creciente aumento de casos de infecciones causada por *Candida sp*, esto ocurre debido al desarrollo de mecanismos por parte de los hongos, para contrarrestar la acción fungicida de los tratamientos convencionales.(4) Esta resistencia depende de la formación y la calidad del biofilm, esto influye en la reaparición y complicación de las infecciones.Varios estudios han demostrado que los biofilm de *Candida* son resistentes a la anfotericina B desoxicolato, el fluconazol, la flucitosina, el itraconazol y el ketoconazol.(36) La modificación de los antifúngicos, como en el caso de azoles (voriconazol y ravuconazol), no ha tenido una respuesta satisfactoria contra biofilm de *Candida* debido a la combinación de múltiples mecanismos entre los que destacan los siguientes: restricción en la penetración del antibiótico a través de la matriz del biofilm, presencia de enzimas catalizadoras del fármaco antifúngico, existencia de sistemas de señalización intercelular (Quorum Sensing) capaces de generar respuestas de estrés, desarrollo de respuestas de estrés a condiciones ambientales hostiles,sobreexpresión de genes implicados en mecanismos de resistencia, generación de microambientes hostiles a la acción antifúngica en el interior

del biofilm, con baja tensión superficial de oxígeno, capaces de inactivar los fármacos antifúngicos esto lo logra mediante diferentes mecanismos que contribuyen a que la matriz sea imposible de penetrar por los fármacos, al quedar atrapados en los canales de agua que forman el biofilm, sin poder alcanzar la célula diana. Además, la sustancia polimérica extracelular es capaz de interactuar con los fármacos antifúngicos inactivándolos o quelándolos.(37)

De los mecanismos asociados a la formación de biofilm, el circuito Quorum Sensing es el encargado de coordinar funciones como intervención en la inducción y formación de biofilm, el tirosol favorece la formación del biofilm en las etapas iniciales e intermedias del desarrollo, mientras que el farnesol evita el desarrollo excesivo de la misma,(37) la actividad aumentada de la bomba de flujo y la inducción de la respuesta al estrés han aumentado significativamente la resistencia de *Candida spp.*, a los antifúngicos habitualmente manejados, como: polienos (anfotericina B), triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol) y equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina).(2, 20)

4.2 Nanopartículas de Plata

La nanociencia es una rama de la ciencia encargada de manipular la materia a escala minúscula, presenta fenómenos buscando propiedades totalmente nuevas para síntesis de materiales y sistemas con propiedades únicas, ha tomado fuerza y se ha venido intensificando su investigación para diferentes ramas entre los que se encuentran usos ópticos, electrónicos, nanoquímica y biomédicos. En la rama biomédica se usan para tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por diferentes microorganismos como bacterias, hongos, parásitos y virus, debido a su actividad antimicrobiana.(38) El surgimiento de la síntesis verde, que combina propiedades de materiales biológicos con estructuras nanoestructuradas, permite la ampliación a un sistema biológico ambientalmente amigable.(39) La llegada de esta ciencia ha traído consigo múltiples beneficios entre ellos la utilización de compuestos microscópicos como partículas microscópicas con múltiples formas las cuales cumplen con una dimensión menor a la

de 100 nanómetros para ser caracterizadas como nanopartículas (NPs). Las nanopartículas se pueden formar por procesos naturales bióticos y abióticos, como también por la manipulación de productos químicos. Los mecanismos utilizados por estas traen consigo beneficios ambientales evitando la utilización de químicos. (40)

En la actualidad hay una gran variedad de nanopartículas sintetizadas a partir de diferentes materiales, con distintos tamaños y formas, dependiendo de cuál vaya a ser su utilización, diferenciándose por su composición, por lo cual se implementan diferentes tipos de materiales para su constitución. (41, 42)

La síntesis y utilización de las nanopartículas presenta múltiples ventajas; su tamaño brinda mayor facilidad para llegar a sitios donde los compuestos convencionales no logran llegar, transitar a través de vasos sanguíneos y penetrar las células. (43) Para lograr una correcta caracterización de las NPs se realiza por métodos analíticos como espectros UV-vis, microscopía electrónica de barrido (SEM), transmisión microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR), difracción de rayos X (DRX), análisis de rayos X por dispersión de energía (EDAX), dispersión dinámica de la luz (DLS) y análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA). (44) Las NPsAg son una alternativa que cada vez toma más fuerza debido a su fabricación y actividad antimicrobiana sensible contra diversos microorganismos. (45, 46)

4.2.2 Síntesis verde de nanopartículas

Las nanopartículas de plata (NPsAg) pueden ser sintetizadas mediante dos técnicas: top down y bottom up. El top down (descendiente) consiste en la obtención de la NPsAg a partir de macromoléculas que son sintetizadas hasta lograr el tamaño nanométrico. Para esta técnica se pueden usar métodos físicos y químicos, como ejemplo: la fotolitografía. La técnica bottom up (ascendente) consiste en utilizar las unidades básicas o partículas de la molécula, para ensamblarlas entre sí y construir la

nanopartícula. Esta técnica puede realizarse mediante métodos químicos y por síntesis verde.(42, 47)

La reducción de la plata por el método químico, conlleva a la contaminación del medio ambiente y resulta ser tóxico debido a los residuos de químicos derivados de la síntesis de las nanopartículas.(45) La síntesis verde ha sido la técnica actualmente implementada, debido a que para realizar la síntesis se manejan extractos de plantas o microorganismos que tienen la capacidad de reducir la plata (Figura 3). Al ser natural, no presenta toxicidad y se convierte en un proceso amigable con el medio ambiente.(48, 49) Para la síntesis de las NPsAg, se realizó la metodología de síntesis verde, usando extracto de borjón, el cual tiene propiedades antioxidantes, reductoras y estabilizantes. El proceso consiste en hacer reaccionar la plata con el extracto de borjón, el cual contiene fitoquímicos que van a reducir la plata. Luego estas partículas de plata se van a ensamblar entre sí, proceso llamado nucleación y formarán la nanopartícula de plata que a su vez va a ser estabilizada por agentes presentes en el extracto (Figura 4).(40)

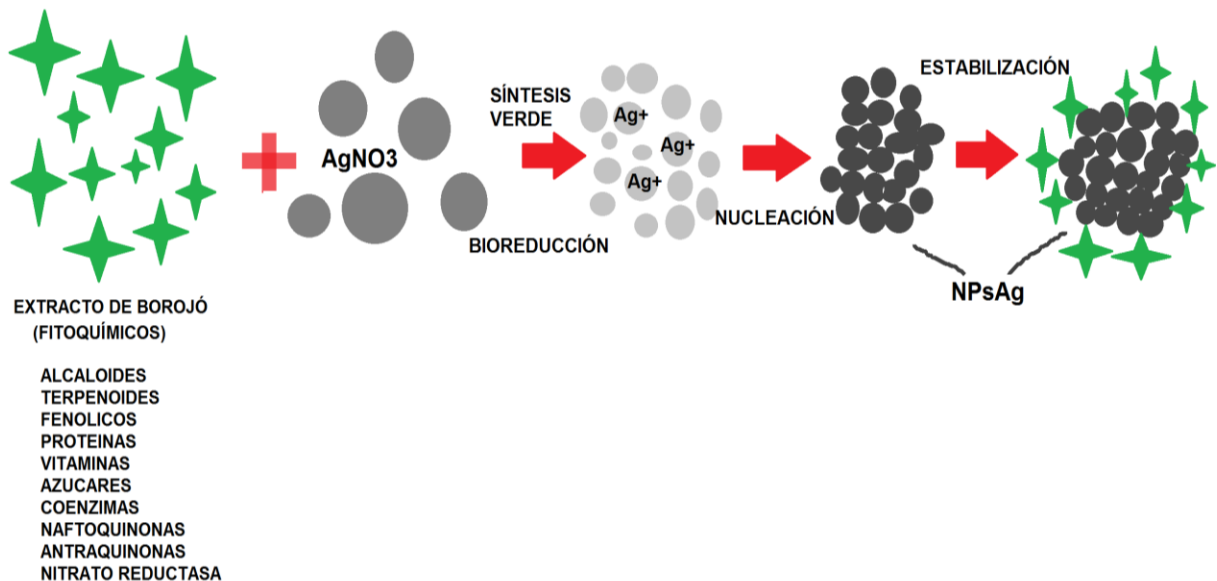


Figura 3: Producción de NPsAg, síntesis verde (Reacción). Autores

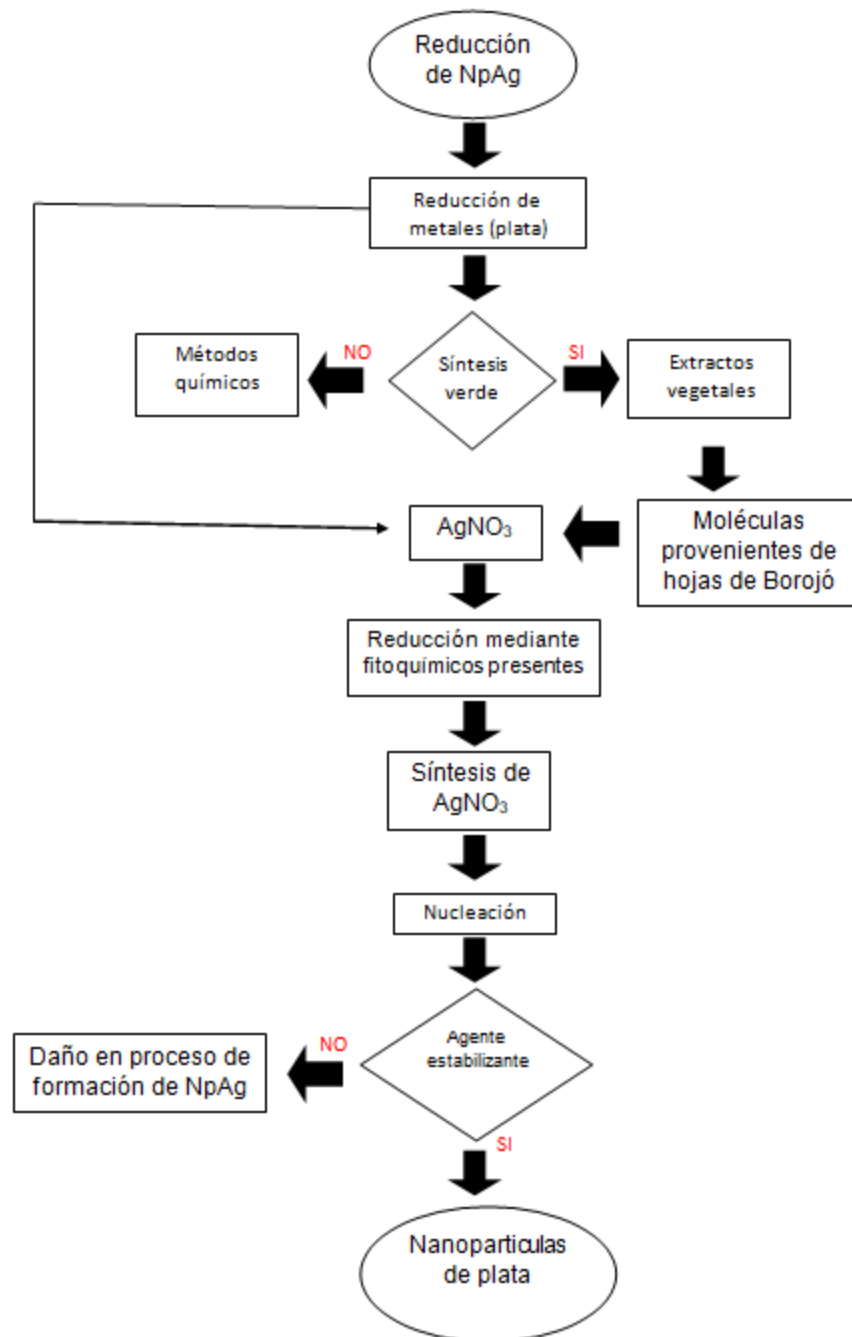


Figura 4: Reducción de NPsAg por síntesis verde desde Borjé. Autores

4.2.3 Propiedades antifúngicas

Las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata han permitido su estudio y acción contra microorganismos, como bacterias y hongos.(50)En la actualidad

tratamientos convencionales para *Candida sp* se basan principalmente en el uso de polienos (anfotericina B), triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol) y equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina). En los pacientes la administración de estos antifúngicos suelen presentar diversas complicaciones, entre las principales está la generación de resistencia por parte de la levadura, la toxicidad de la anfotericina B, los efectos adversos de algunos azoles (toxicidad e interacciones farmacológicas). Estos efectos causan múltiples problemas, razón por la que se busca una manera de contrarrestarlos haciendo una mezcla de los métodos convencionales con el uso de las nanopartículas de plata.(2)

La acción de NPsAg consiste en una interacción perjudicando la membrana celular ingresando por medio de múltiples vías de entrada como endocitosis, macropinocitosis, fagocitosis y pinocitosis, dando como resultado la ruptura de la barrera de permeabilidad de la membrana generando una porosidad. Se ha informado sobre el daño oxidativo de las membranas celulares debido a la liberación de Ag⁺ a partir de las NPs y su acción perjudicial sobre proteínas unidas a la membrana, esto da como resultado la pérdida de la integridad celular y osmótica que culmina en toxicidad aguda para las células fúngicas lo que indica un efecto favorable para la erradicación de los microorganismos sin llegar a causar una afectación en el paciente.(9)

5. Diseño metodológico

5.1 Tipo de investigación

Se llevó a cabo un estudio experimental descriptivo, realizado y financiado por el laboratorio de Microbiología de la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud (FUCS)

Población: Dos nanopartículas de plata sintetizadas por síntesis verde por la Universidad Central. Cepas de *Candida spp.* Productoras de biofilm aisladas de pacientes con candidiasis sistémica.

Muestra: Biofilm de *Candida spp.*

Variables:

- **Dependientes:**
 - Condiciones de incubación
 - Viabilidad de cepas repicadas

5.2 Obtención de nanopartículas

Dos Nanopartículas (Nanopartícula 47, Nanopartícula 49) se sintetizaron en la Universidad Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE) por la metodología de Síntesis Verde a partir de extracto de hojas de borjón (*Borjoa patinoi*) de acuerdo al protocolo estandarizado por (GP&SE). Las condiciones de síntesis son presentadas en la tabla 2.

	Volumen de extracto de Borojo (ml)	Molaridad de AgNO ₃	Temperatura de síntesis (°C)	Tiempo de síntesis (días)
NPsAg-47	2.0	5	25	25
NPsAg-49	2.0	5	25	45

Tabla 2: Condiciones de síntesis de NPsAg por Síntesis Verde

Se realizó caracterización de las NPsAg por UV-Vis y por microscopía SEM, antes de ser enviadas a la FUCS.

5.3 Preparación de acrílicos

Para el desarrollo de Biofilm, fueron utilizados cuadrados de acrílico de 1.0 cm x 1.0 cm. Previo a su uso, los cuadrados se lavaron con agua y jabón para retirar suciedad. Los cuadrados se secaron y se organizaron 30 cuadrados en bolsas para esterilizar auto sellable Yipak®. Se llevaron a esterilizar en autoclave M11 UltraClave. Los acrílicos fueron almacenados a temperatura ambiente dentro de las bolsas hasta el momento de su uso.

5.4 Selección de cepas

Las cepas de *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*. Fueron aisladas de hemocultivos e identificadas en el Hospital de San José Infantil sede Centro y la cepa de *C. auris* fue recuperada del cepario de la FUCS. Las cepas fueron mantenidas por repique mensual en agar papa dextrosa y bajo refrigeración hasta su utilización.

5.4.1 Selección de cepas productoras de biofilm

El trabajo inicio con 48 cepas de levaduras *Candida*, que fueron identificadas con números consecutivos según la especie de *Candida*, (*C. albicans* de 1 a 28, para *C. guilliermondii* de 31 a 38, para *C. tropicalis* de 41 a 48, y *C. auris* de 51 a 54).

Siguiendo la metodología propuesta por Lara et. al., H (6) se seleccionaron las cepas de *Candida* productoras de biofilm in vitro. Para esto se realizó repique en PDA (ver anexo 1) de las cepas de *Candida* y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se realizó dilución de las levaduras a una concentración de 1.0×10^6 UFC/ml en caldo PDA por turbidimetría y por duplicado se adicionaron 50µL en microplaca de poliestireno de 96 pozos junto con 50µL de caldo PDA. Para el blanco se adiciono 100µL de caldo PDA por duplicado y se incubo 24 horas a 37°C.

Se realizaron tres lavados con buffer fosfato 10X (PBS). Se retiró el PBS y se dejó secar la microplaca, para ser sometido a ensayo de cristal violeta siguiendo la metodología propuesta por Silva, S et. Al., (50) de la siguiente forma: se adicionaron 150µL de acetato de sodio al 2.0% en cada pozo durante 10 minutos para fijar, se retiró el acetato y se dejó secar a temperatura ambiente. Se agregaron 150 µL de colorante Cristal Violeta al 1.0% (CV 1.0%) a cada pozo y se incubo durante 1 hora a temperatura ambiente. Se retiró el colorante, se realizaron dos lavados con PBS y se dejó secar a temperatura ambiente. Se adicionan 150µL de metanol y las placas fueron leídas por turbidez en lector de microplaca para absorbancia Chromate a una longitud de onda de 630 nm.

Con los datos se determinó la media utilizando la herramienta Excel. La selección de las cepas productoras de biofilm se estableció por la comparación con la absorbancia del blanco y se seleccionó para cada especie la que presento mayor formación de biofilm.

5.4.2 Protocolo de formación de biofilm de levaduras sobre acrílicos

Con las cepas seleccionadas por mayor producción de biofilm (*C. albicans* cepa #4, *C. guilliermondii* cepa #31, *C. glabrata* cepa #46 y *C. auris* cepa #51) se generó biofilm sobre acrílicos siguiendo el protocolo propuesto por Wang (46) de la siguiente forma: se probaron dos concentraciones de levadura: 1.0×10^6 UFC/ml y 1.0×10^5 UFC/ml en caldo PDA. Se adicionaron 450 μ L de cada suspensión de levadura por duplicado en placas de cultivo celular de 24 pozos, por pozo se colocó un cuadrado de acrílico de 1.0 cm x 1.0 cm previamente esterilizado. Se montaron 3 experimentos, cada uno para ser evaluado después de incubar por 24, 48 y 72 horas a 37°C. Se montó un acrílico blanco sin presencia de levaduras para cada experimento.

5.4.3 Evaluación de formación de biofilm de levaduras sobre acrílicos

Una vez cumplidos los tiempos de incubación pre-establecidos, se lavan los acrílicos sumergiéndolos en PBS 10x y se fijaron sumergiéndolos en metanol 2 veces. Los acrílicos secos se sometieron a coloración de GRAM (ver anexo 2) para ser observados bajo microscopia óptica con objetivo de 40 y a coloración con Blanco Calcofluor (BC) (ver anexo 3) para ser estudiados bajo microscopia de fluorescencia (Longitud de onda: 300nm) con objetivo 40x. Por medio de la observación microscópica se determinó la formación de biofilm a los diferentes tiempos de incubación para seleccionar la concentración de levaduras en la que se formara el mejor el biofilm. (Figura 5)

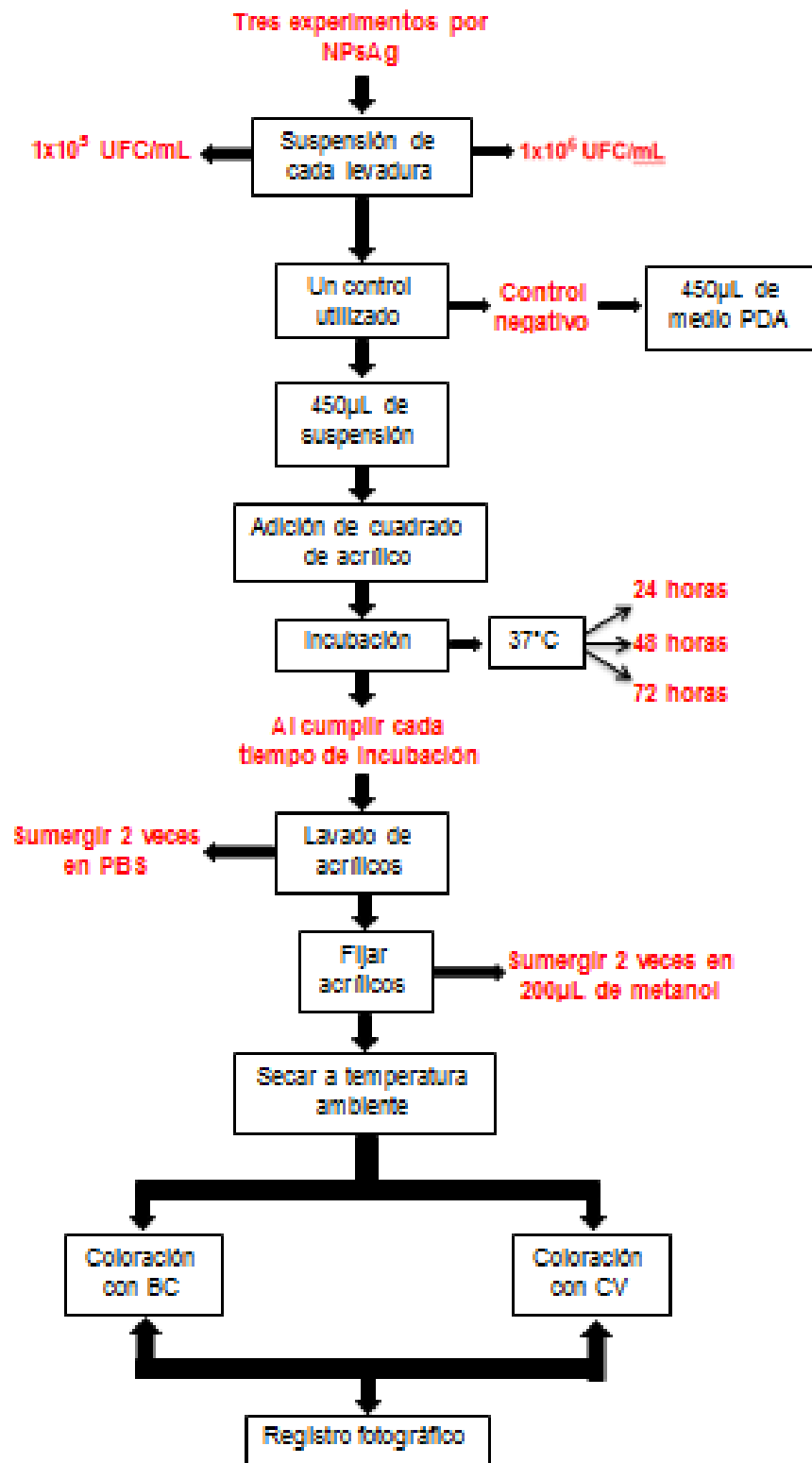


Figura 5: Flujograma procedimiento ensayo formación de biofilm. Autores

5.5 Determinación de Concentración mínima inhibitoria (CMI) para NPsAg-47 y NPsAg-49

A partir de este protocolo se evaluó la acción de las nanopartículas sobre la formación de biofilm en dos momentos: antes de que el biofilm sea formado, a lo que llamaremos pre-biofilm y adición de NPsAg a las 24 horas de formación de biofilm, a lo que denominamos post-biofilm.

El ensayo MTT permite medir la actividad metabólica de las células presentes en el biofilm, el MTT es reducido a cristales de formazan por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas, esta reducción depende de la reducción de NADH y NADPH, la menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) también conocido como vitamina K3 al ser un aceptor de electrones se adicionó para acelerar el proceso de reducción del MTT. Se realizó basados en el método de Mosmann (51) y modificaciones realizadas por Modiri y Pierce(52, 53) para levaduras de la siguiente forma: se montaron 4 controles, un control negativo que correspondía a 100µL de medio de cultivo y un control positivo correspondiente a 100µL de medio de cultivo + levadura a concentración de 1.0×10^6 UFC/ml, dos controles de pureza, uno con 100µL para NPsAg-47 y otro con 100µL para NPsAg-49 (Tabla 3).

Tabla 3 Controles usados en el estudio de CMI. Autores

Control de crecimiento	<i>Candida spp.</i>
Control de ausencia de crecimiento	Medio RPMI
Control de pureza	NPsAg-47
Control de pureza	NPsAg-49

Se evaluaron las NPsAg-47 y NPsAg-49 a diferentes concentraciones previamente preparadas (2.0µg/mL, 1.0µg/mL, 0,5µg/mL, 0,25µg/mL, 0,125µg/mL, 0,063µg/mL,

0,031µg/mL, 0,015µg/mL, 0,007µg/mL, 0,003µg/mL) por duplicado. Para la evaluación de pre-biofilm, se utilizaron las levaduras seleccionadas (*C. albicans* cepa #4, *C. guilliermondii* cepa #31, *C. glabrata* cepa #46 y *C. auris* cepa #51) a concentración de $1,0 \times 10^6$ UFC/ml (protocolo 5.4.3) teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente (protocolo 5.4.3) suspendidas en medio RPMI. El volumen final de cada pocillo fue de 100µL, de los cuales 50µL correspondieron a la suspensión de levadura y los otro 50µL a las NPsAg. Se incubó la placa a 37°C durante 24 horas, una vez concluido en tiempo de incubación se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con PBS.

Para evaluar post-biofilm en otra microplaca de 96 pozos se agregaron 100µL de cada levadura seleccionada (*C. albicans* cepa #4, *C. guilliermondii* cepa #31, *C. glabrata* cepa #46 y *C. auris* cepa #51) a concentración de $1,0 \times 10^6$ UFC/ml (protocolo 5.4.3) y se llevó a incubar por 24 horas a 37°C. Pasadas 24 horas se retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS y se adicionó en los pozos tomados como control 100µL de medio y en el resto de pozos 50µL de medio y 50µL de NPsAg-47 o NPsAg-49 a las diferentes concentraciones empleadas por duplicado, las placas se llevaron a incubar por 24 horas a 37°C, se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con PBS.

Para el montaje del ensayo MTT de las microplacas previamente lavadas, tanto para pre-biofilm y post-biofilm, la metodología fue la siguiente: se adicionaron 100µL de MTT en todos los pozos, las placas se cubrieron con papel aluminio y se llevaron a incubar durante 3 horas en oscuridad. Finalmente se retiró el papel aluminio e inmediatamente se realizó lectura por absorbancia en lector de Microelisa a 490nm.

Finalmente se tomaron los datos obtenidos por absorbancia y se calculó el promedio para cada levadura. Una vez obtenidos los promedios se realizaron gráficos de dispersión con la herramienta Excel.

5.6 Evaluación del efecto de NPsAg en la síntesis de biofilm por Blanco de Calcoflúor (BC)

Para esta evaluación se montaron 2 controles por duplicado para cada placa, dos controles positivos de 100µL de suspensión de levadura a una concentración de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL y dos controles negativos de 100µL de medio RPMI. (Figura 6)

- **Sin formación de biofilm (Pre-biofilm):** Se realizó suspensión de levaduras seleccionadas (*C. albicans* cepa #4, *C. guilliermondii* cepa #31, *C. glabrata* cepa #46 y *C. auris* cepa #51) en medio RPMI a una concentración de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. En placas de cultivo celular de 24 pozos se inoculó 50µL de la suspensión de levaduras por duplicado y se adicionaron 50µL de NPsAg-47 y NpsAg-49 a las concentraciones anteriormente seleccionadas (2.0µg/mL, 1.0µg/mL, 0,5µg/mL, 0,25µg/mL, 0,125µg/mL, 0,063µg/mL, 0,031µg/mL, 0,015µg/mL, 0,007µg/mL, 0,003µg/mL), inmediatamente se añadió un cuadrado de acrílico de 1.0 cm x 1.0 cm que había sido esterilizado previamente a cada pozo y se incubó por 24 horas a 37°C, posteriormente los cuadrados de acrílico fueron lavados sumergiendo dos veces en PBS y luego fueron fijados sumergiendo dos veces en 200µL de metanol y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente fueron sometidos a coloración de BC (ver anexo 3) para ser observados bajo microscopia de fluorescencia (Longitud de onda: 300nm) con objetivo 40x y obtener un registro fotográfico.

- **Con formación de biofilm (Post-biofilm):** Se realizó suspensión de levaduras seleccionadas (*C. albicans* cepa #4, *C. guilliermondii* cepa #31, *C. glabrata* cepa #46 y *C. auris* cepa #51) en medio RPMI a una concentración de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. En placas de cultivo celular de 24 pozos se inoculó 100µL de la suspensión de levaduras por duplicado y se adicionó un cuadrado de acrílico de 1 cm x 1 cm que había sido esterilizado previamente a cada pozo y se incubó por 24 horas a 37°C, posteriormente se adicionaron NPsAg-47 o NPsAg-49 a las concentraciones anteriormente seleccionadas (2.0µg/mL, 1.0µg/mL, 0,5µg/mL, 0,25µg/mL, 0,125µg/mL, 0,063µg/mL, 0,031µg/mL, 0,015µg/mL, 0,007µg/mL, 0,003µg/mL), se incubó por 24 horas a 37°C,

los cuadrados de acrílico fueron lavados sumergiendo dos veces en PBS y luego fueron fijados sumergiendo dos veces en 200µL de metanol y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente fueron sometidos a coloración de BC (ver anexo 3) para ser observados bajo microscopia de fluorescencia (Longitud de onda: 300nm) con objetivo 40x y obtener un registro fotográfico.

5.7 Evaluación del efecto de NPsAg en la síntesis de biofilm por Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

Se seleccionaron las levaduras (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Candida auris*) a las CMI obtenidas en el ensayo realizado por MTT para cada una, para ser evaluadas por SEM en la Universidad Nacional. No se procesaron muestras de *Candida guilliermondii* debido a costos.

Para la obtención de los cuadrados de acrílicos con NPsAg y Biofilm se realizó el mismo procedimiento que en Pre-Formación y Post-Formación para evaluación por BC, hasta llegar al paso de fijación con metanol. Los acrílicos se almacenaron a temperatura ambiente para ser trasladados a la Universidad Nacional. Allí se les realizó un recubrimiento con oro y fueron visualizadas por SEM de acuerdo al protocolo del laboratorio. (Figura 7)

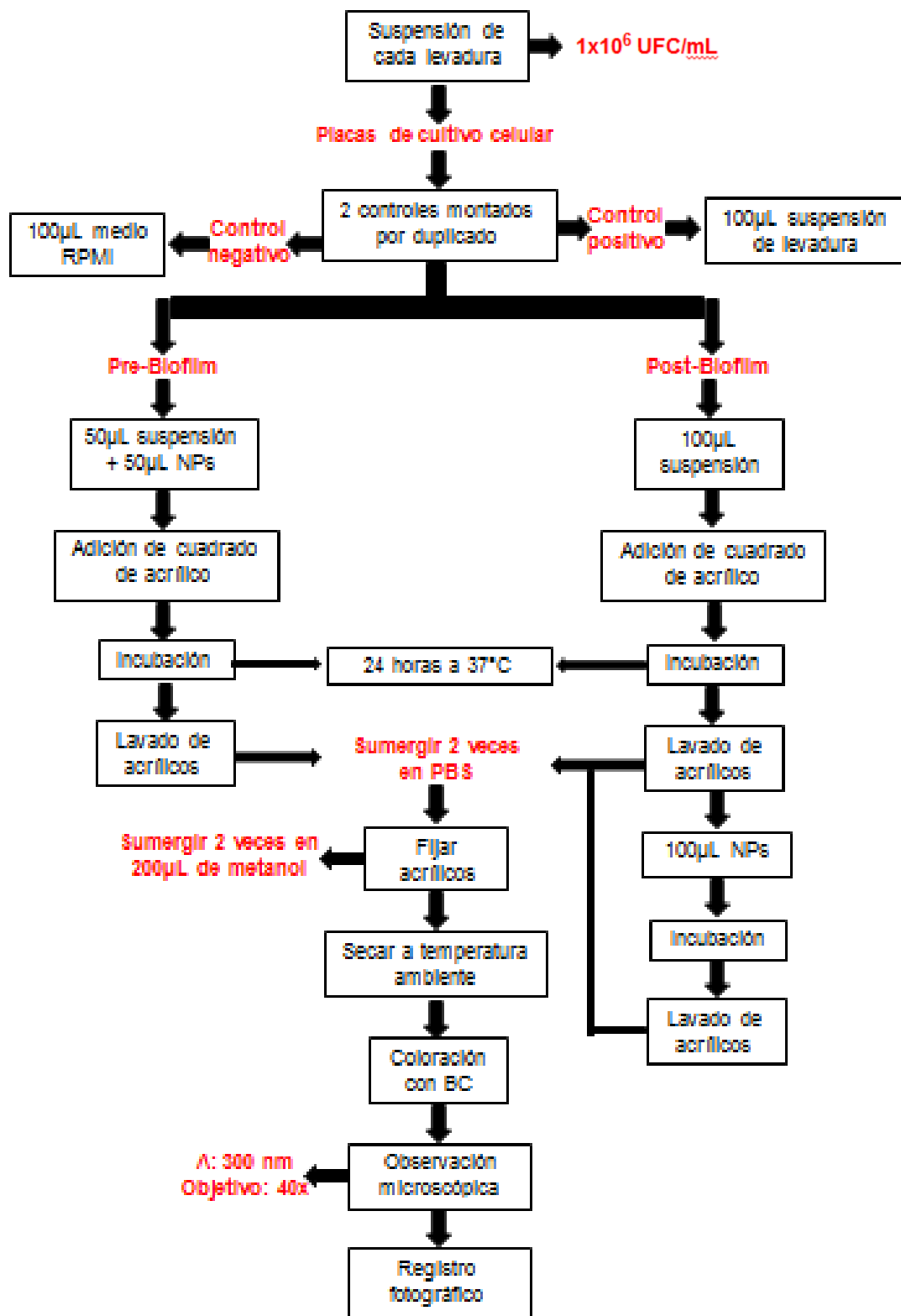


Figura 6: Flujo de procedimiento de ensayo con NPsAg por BC



Figura 7: Flujograma procedimiento ensayo con NP_sAg por SEM

6. Resultados

6.1 Nanopartículas de plata

La siguiente información fue suministrada por la **Universidad Central**, por el **Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE)** y corresponde a las NPsAg que se trabajaron:

- La distribución del número de las nanopartículas por el tamaño fue en promedio de 41,15 d nm de las NPsAg-47 y de 21,0 d nm de las NPsAg-49 (figura 8)

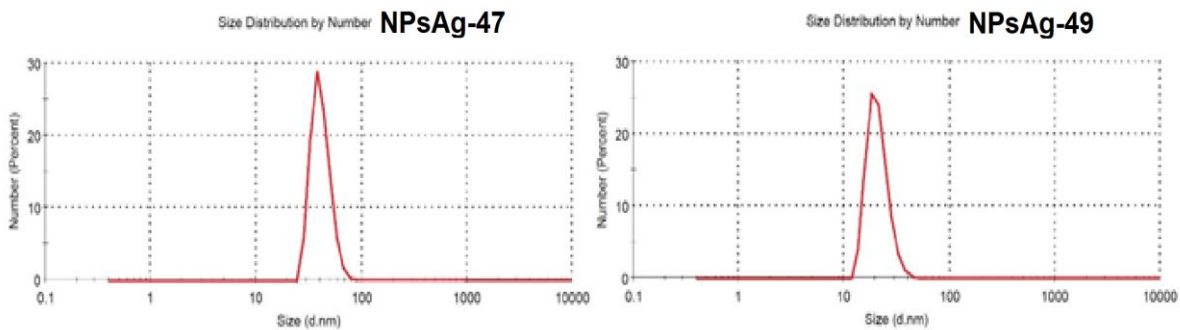


Figura 8: Distribución del número de NPsAg de acuerdo al tamaño. Universidad Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE)

- Por microscopia SEM se observó que las NPsAg-47 presentaron formas alargadas y redondas, mientras que NPsAg-49 formas redondas en su mayoría (Figura 9).
- La concentración obtenida de la NPsAg-47 fue de 0,6mg/ml y NPsAg-49 de 0,9mg/ml.

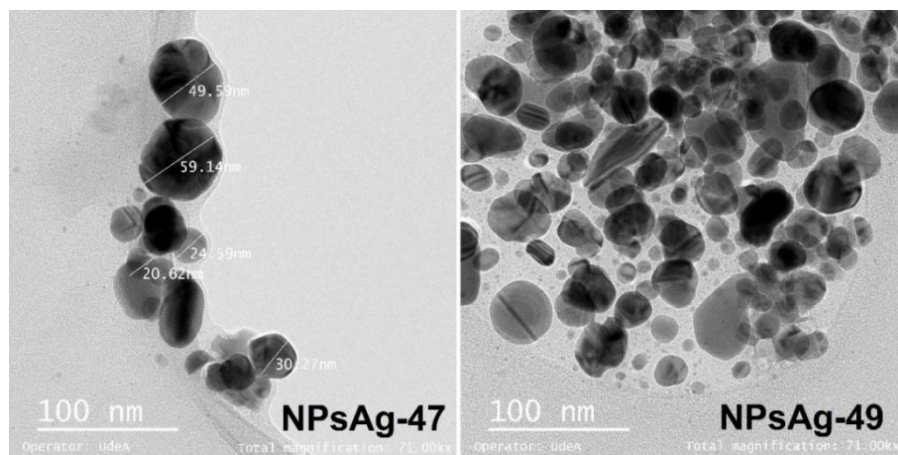


Figura 9: Microscopia SEM de las NPsAg. Universidad Central por el Grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE)

6.2 Formación de Biofilm

6.2.1 Cepas productoras

De acuerdo con los ensayos realizados para determinar la formación de biofilm, se seleccionaron entre las 48 cepas de *Candida spp.*, las cuatro cepas con mayor absorbancia presenta. El resultado es mostrado en la tabla 4. Los resultados de las 48 cepas de *Candida* son presentados en el anexo 4.

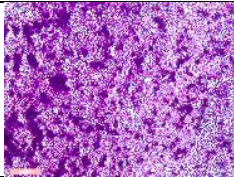
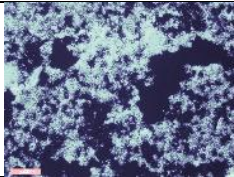
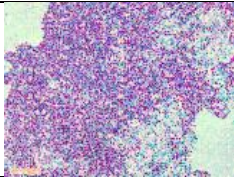
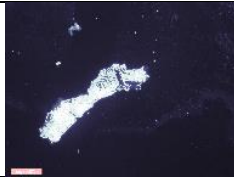

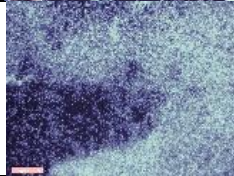
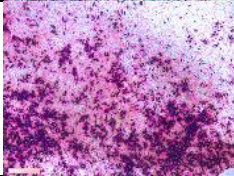

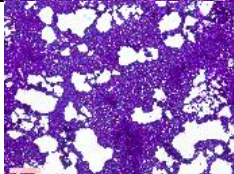
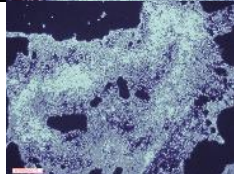
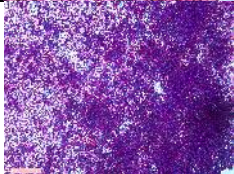
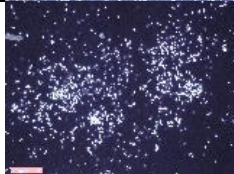
Tabla 4 Cepas productores de Biofilm seleccionadas. Autores

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

6.2.2 Protocolo de formación de biofilm de levaduras sobre acrílicos


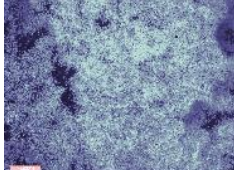
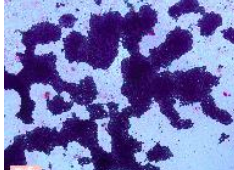

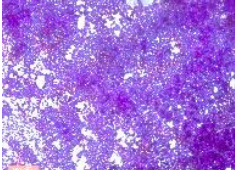

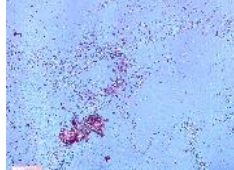
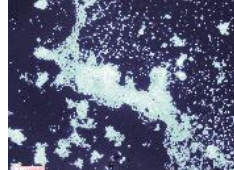


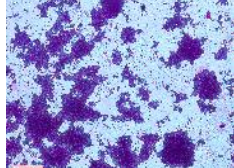
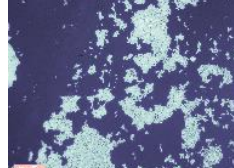
Se realizó registro fotográfico de la observación microscópica bajo objetivo 40x de los biofilm formados sobre acrílicos con coloración de Gram y BC, evaluando concentraciones de $1,0 \times 10^5$ UFC/ml y $1,0 \times 10^6$ UFC/ml a las 24, 48 y 72 horas. La comparación fotográfica es mostrada a continuación; en la tabla 5 para *C. albicans*, en la tabla 6 para *C. guilliermondii*, en la tabla 7 para *C. tropicalis* y en la tabla 8 para *C. auris*. Los criterios tenidos en cuenta fueron la densidad celular e intensidad del color que son proporcionales a la biomasa que forma el biofilm.

Tabla 5 Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de *Candida albicans*. Autores

	GRAM	Blanco Calcofluor		GRAM	Blanco Calcofluor
10^6 24H			10^5 24H		
10^6 48H			10^5 48H		
10^6 72H			10^5 72H		

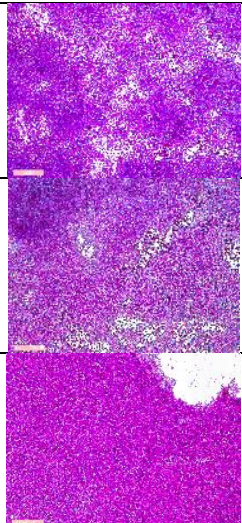
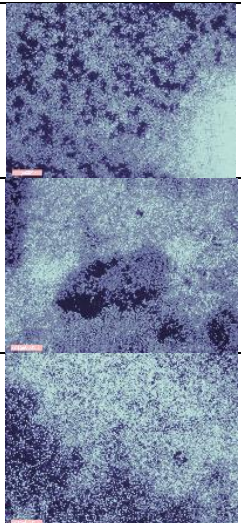
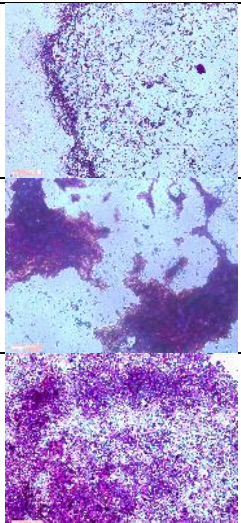
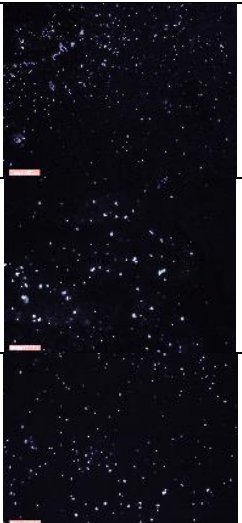
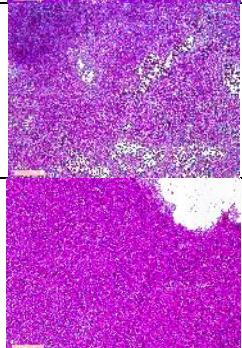
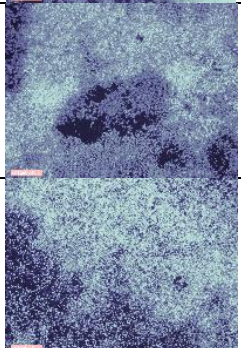
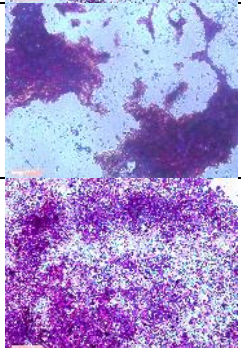


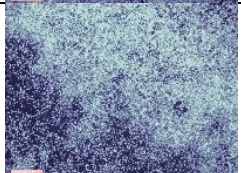
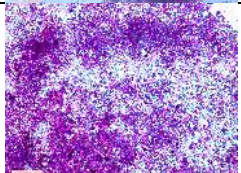

Para *C. albicans* se observó en los acrílicos coloreados, tanto Gram como Blanco de Calcoflúor que hubo formación de biofilm desde 24H. Encontramos que a las 72H se presentan zonas del acrílico sin biofilm, lo que nos indica que no se forma sobre todo el acrílico y la maduración del biofilm es en grandes zonas. Observamos que al aumentar el tiempo el biofilm es más compacto. La concentración ideal fue $1,0 \times 10^6$ UFC/ml.

Tabla 6 Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de *Candida guilliermondii*. Autores

	GRAM	Blanco Calcofluor		GRAM	Blanco Calcofluor
10 ⁶ 24H			10 ⁵ 24H		
10 ⁶ 48H			10 ⁵ 48H		
10 ⁶ 72H			10 ⁵ 72H		

Para *C. guilliermondii* $1,0 \times 10^6$ UFC/ml se observó en los acrílicos coloreados, tanto Gram como Blanco de Calcoflúor que hubo formación de biofilm desde 24H aumentando a las 72H y fueron pocas las zonas del acrílico sin formación de biofilm. En la concentración $1,0 \times 10^5$ UFC/ml fue escasa la formación detectada.

Tabla 7 Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de *Candida tropicalis*. Autores

	GRAM	Blanco Calcofluor		GRAM	Blanco Calcofluor
10 ⁶ 24H			10 ⁵ 24H		
10 ⁶ 48H			10 ⁵ 48H		
10 ⁶ 72H			10 ⁵ 72H		

Para *C. tropicalis* a $1,0 \times 10^6$ UFC/ml se observó en los acrílicos coloreados, tanto Gram como Blanco de Calcoflúor que hubo formación de biofilm desde 24H. Al trabajar la concentración de $1,0 \times 10^5$ UFC/ml no se detectó formación de biofilm bajo Blanco de Calcoflúor.

Tabla 8 Determinación de concentración y tiempo para formación de biofilm de *Candida auris*. Autores

	GRAM	Blanco Calcofluor		GRAM	Blanco Calcofluor
10 ⁶ 24H			10 ⁵ 24H		
10 ⁶ 48H			10 ⁵ 48H		
10 ⁶ 72H			10 ⁵ 72H		

Para *C.auris* se observó en los acrílicos coloreados, tanto Gram como Blanco de Calcoflúor que hubo formación de biofilm desde 24H, incrementándose a las 72H. Se presentael acrílico concrecimiento de biofilmmaduro en el 90% de la superficie. La concentración de $1,0 \times 10^5$ UFC/ml no fue adecuada para generar biofilm.

6.3 Determinación de CMI de NPsAg-47 y NPsAg-49

Se determinó CMI de NPsAg-47 y NPsAg-49 durante el proceso de formación de biofilm en dos momentos de su adición: Pre-Biofilm y Post-Biofilm (a las 24H) a una concentración de levaduras de $1,0 \times 10^6$ UFC/mL. Los resultados se evaluaron por curvas de dispersión para cada levadura y son presentados en las figuras 10 para *C. albicans*, 11 para *C. guilliermondii*,12 para *C. tropicalis* y 13 para *C. auris*. En cada gráfico la CMI es señalada con una flecha.

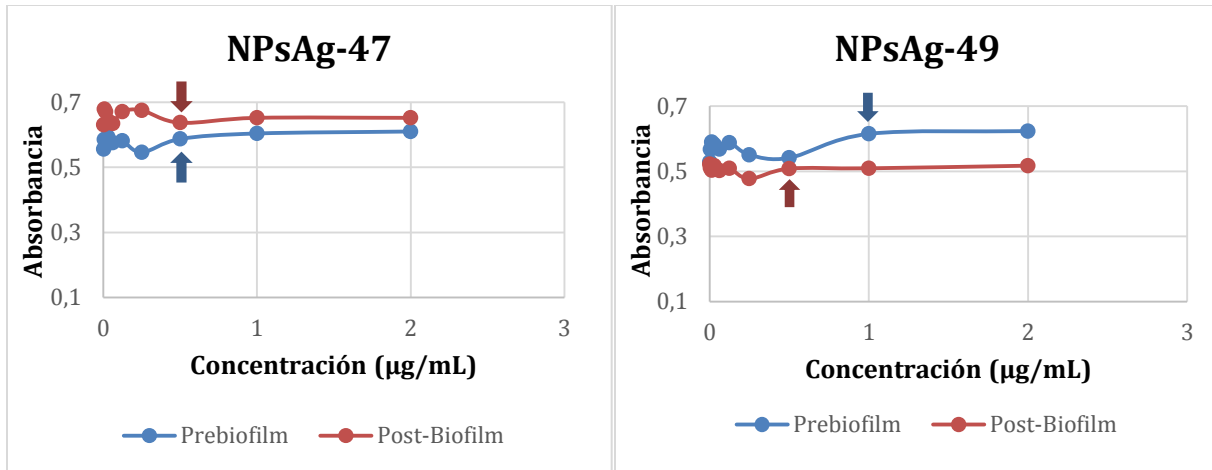


Figura 10: Gráficos de dispersión para la determinación de CMI de las NPsAg-47 y NPsAg-49 para *Candida albicans*. Autores

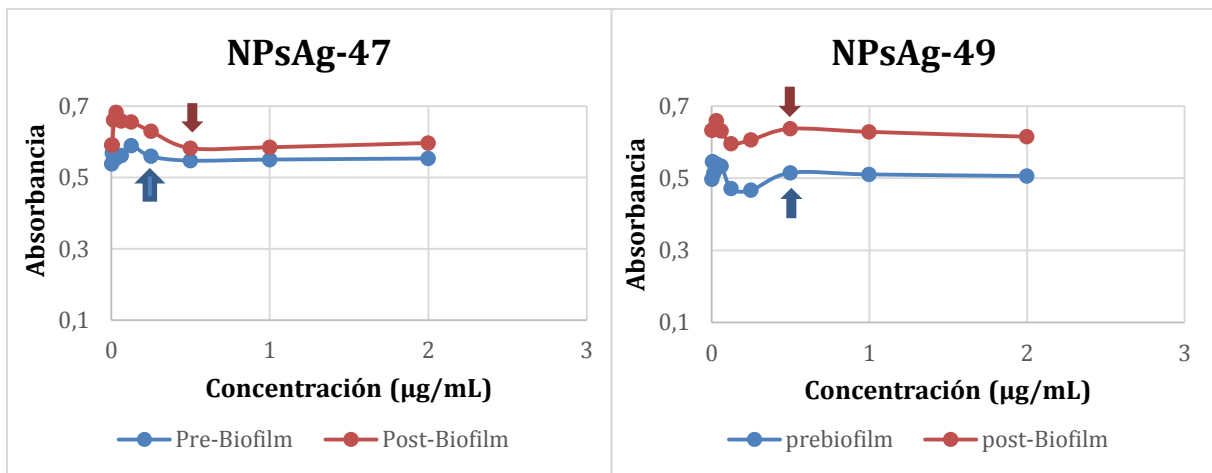


Figura 11: Gráficos de dispersión para la determinación de CMI de las NPsAg-47 y NPsAg-49 para *Candida guilliermondii*. Autores

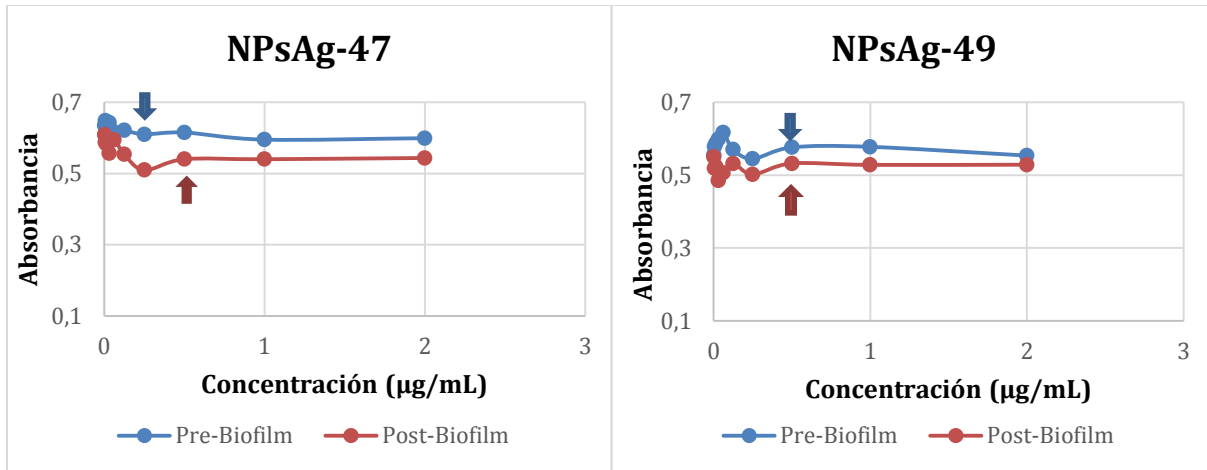


Figura 12: Gráficos de dispersión para la determinación de CMI de las NPsAg-47 y NPsAg-49 para *Candida tropicalis*. Autores

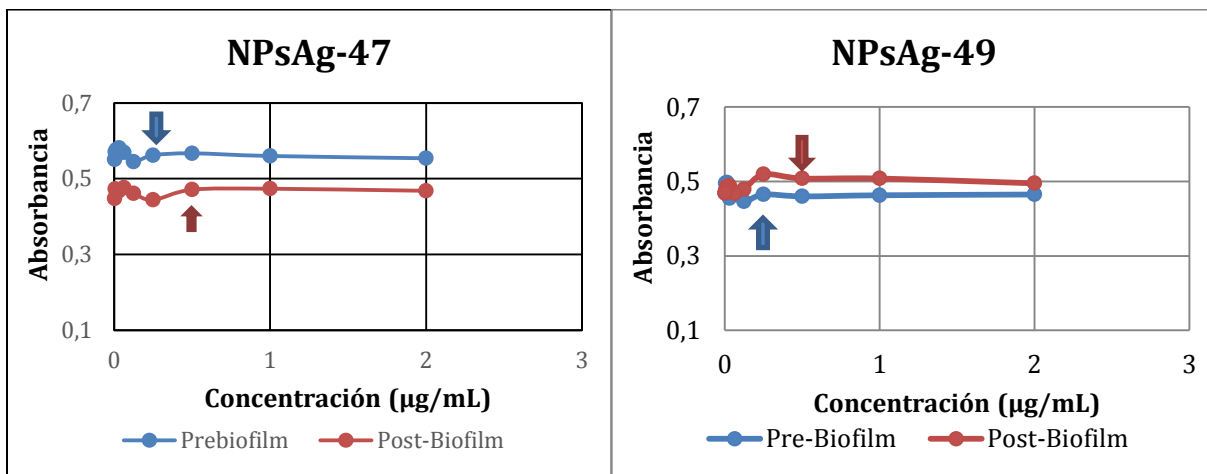


Figura 13: Gráficos de dispersión para la determinación de CMI de las NPsAg-47 y NPsAg-49 para *Candida auris*. Autores

Los resultados de CMI para NPsAg-47 y NPsAg-49 son resumidos en la tabla 9

Tabla 9 Resultado de CMI para NPsAg. Autores

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>Candidaguilliermondii</i>	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL
<i>Candidatropicalis</i>	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL	0,5 µg/mL
<i>Candidaauris</i>	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL	0,25 µg/mL	0,5 µg/mL

La eficacia de las NPsAg sobre *C.albicans*, *C.guilliermondii*, *C. tropicalis* y *C.auris* dio a concentraciones muy bajas entre 0,25 µg/mL y 1,0 µg/mL.

6.3 Evaluación del efecto de NPsAg en la síntesis de biofilm por Blanco de Calcoflúor (BC)

Los acrílicos sometidos a las diferentes concentraciones de NPsAg, fueron evaluados por BC. Los resultados son presentados en las figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 y 29.

La tinción BC demostró el efecto inhibitor de las NPsAg-47 y NPsAg-49 a diferentes concentraciones sobre biofilm de *Candida* (*C.albicans*, *C.guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C.auris*). Las concentraciones con mayor evidencia de inhibición de biofilm fueron 0.25 µg/mL a 1.0 µg/mL.

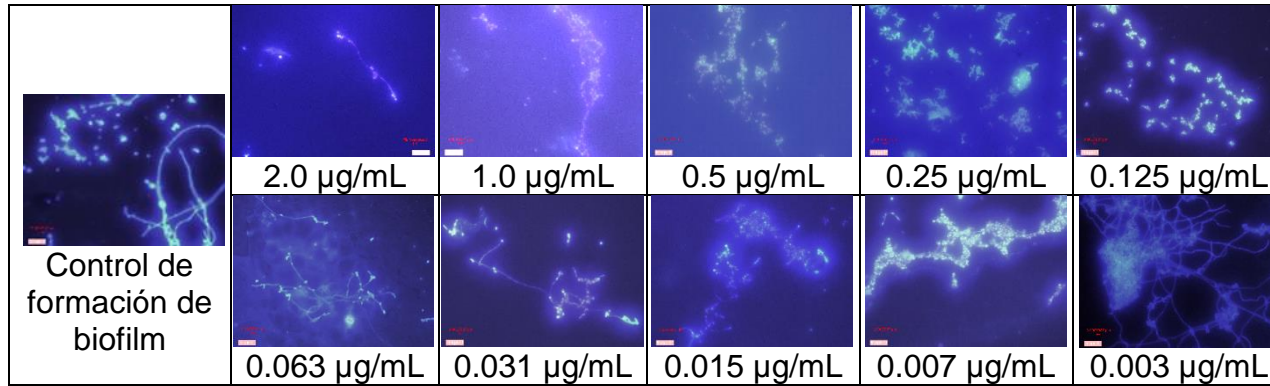


Figura 14: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Pre-biofilm de *Candida albicans*. Autores

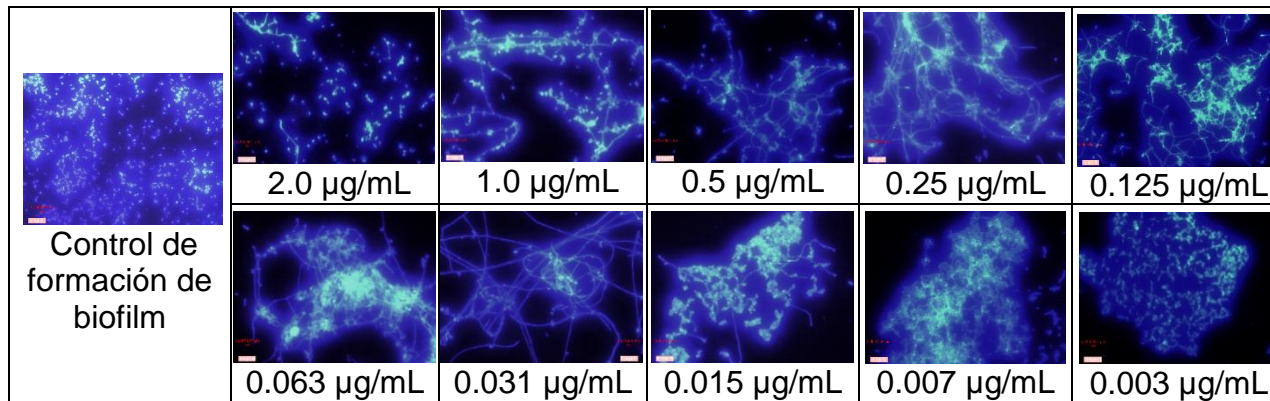


Figura 15: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Post-biofilm de *Candida albicans*. Autores

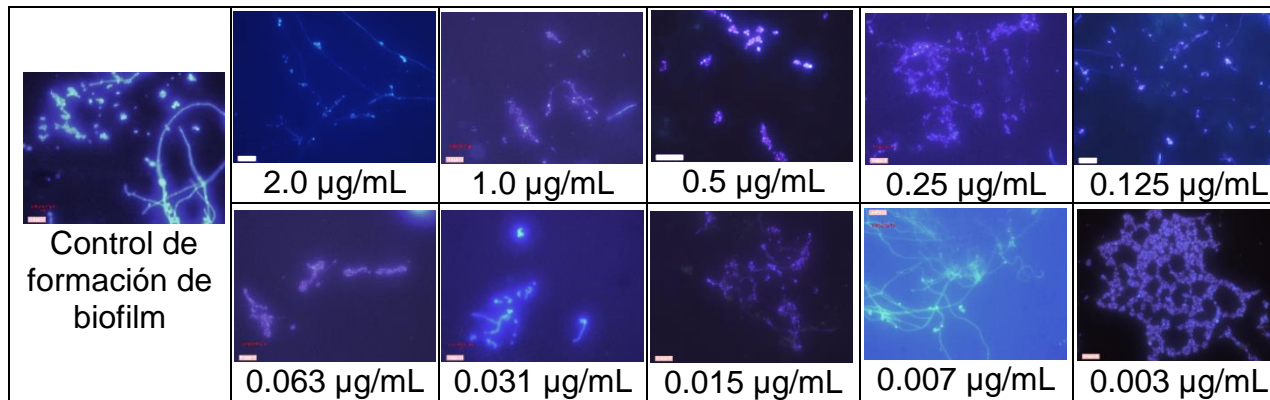


Figura 16: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Pre-biofilm de *Candida albicans*. Autores

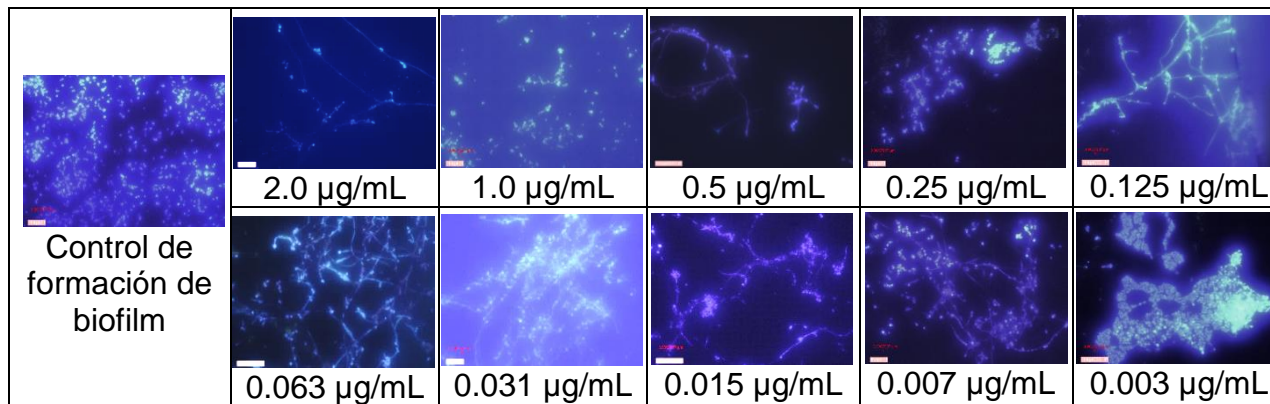


Figura 17: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Post-biofilm de *Candida albicans*. Autores

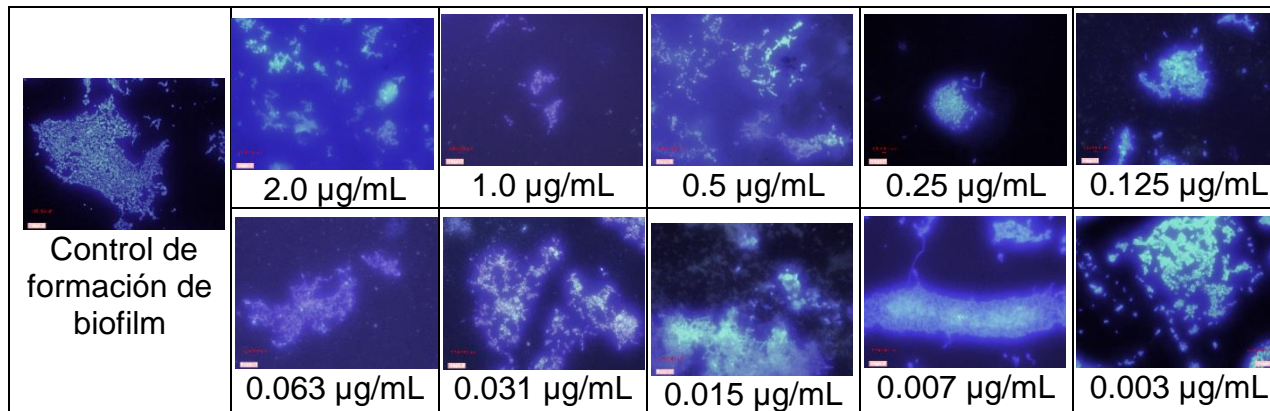


Figura 18: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Pre-biofilm de *Candida guilliermondii*. Autores

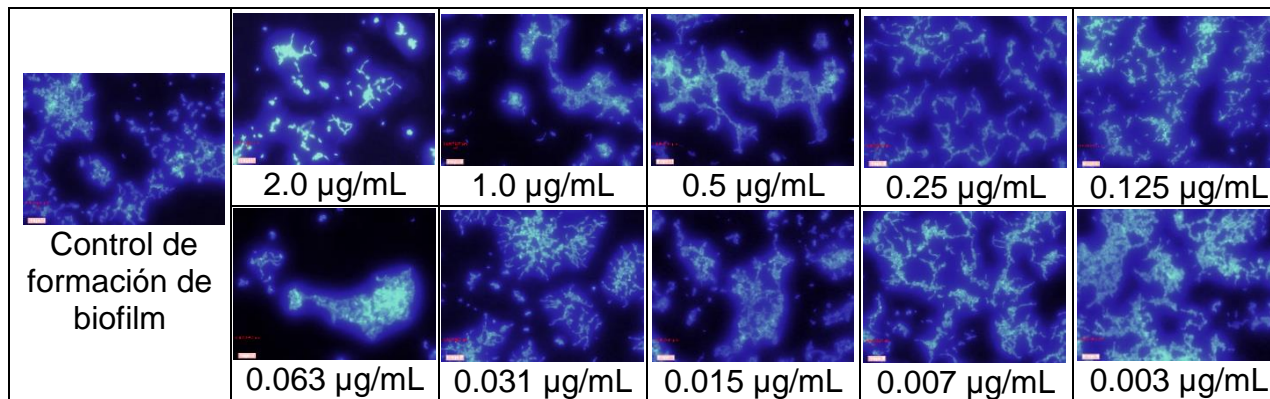


Figura 19: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Post-biofilm de *Candida guilliermondii*. Autores

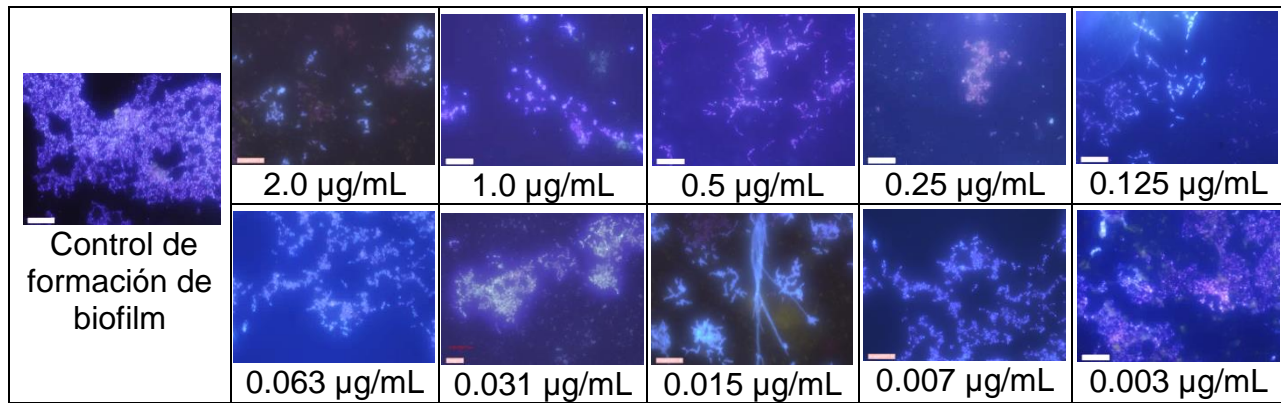


Figura 20: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Pre-biofilm de *Candida guilliermondii*. Autores

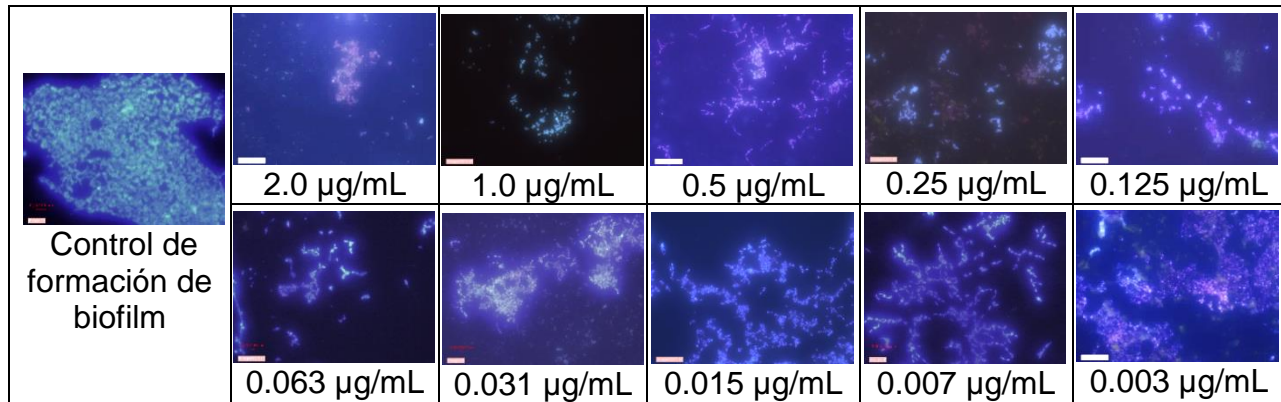


Figura 21: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Post-biofilm de *Candida guilliermondii*. Autores

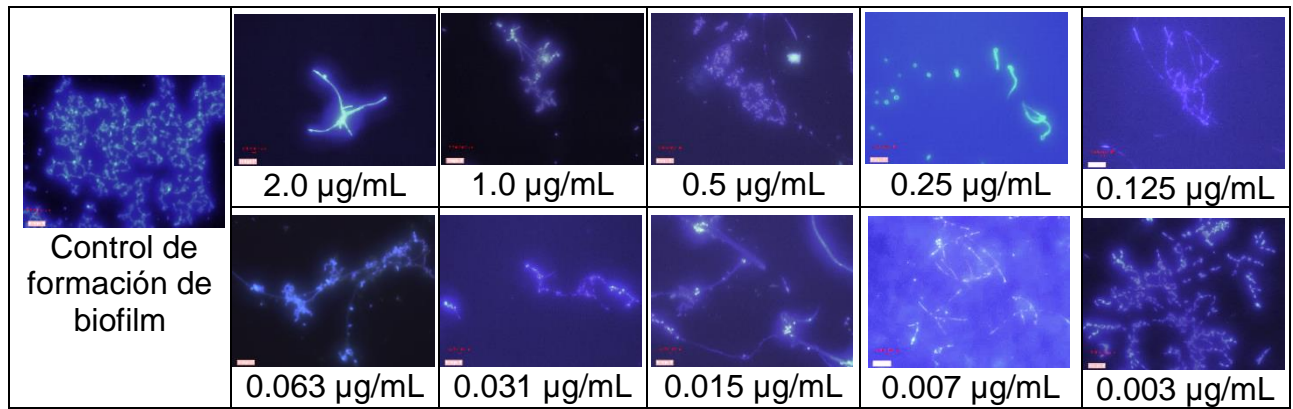


Figura 22: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Pre-biofilm de *Candida tropicalis*. Autores

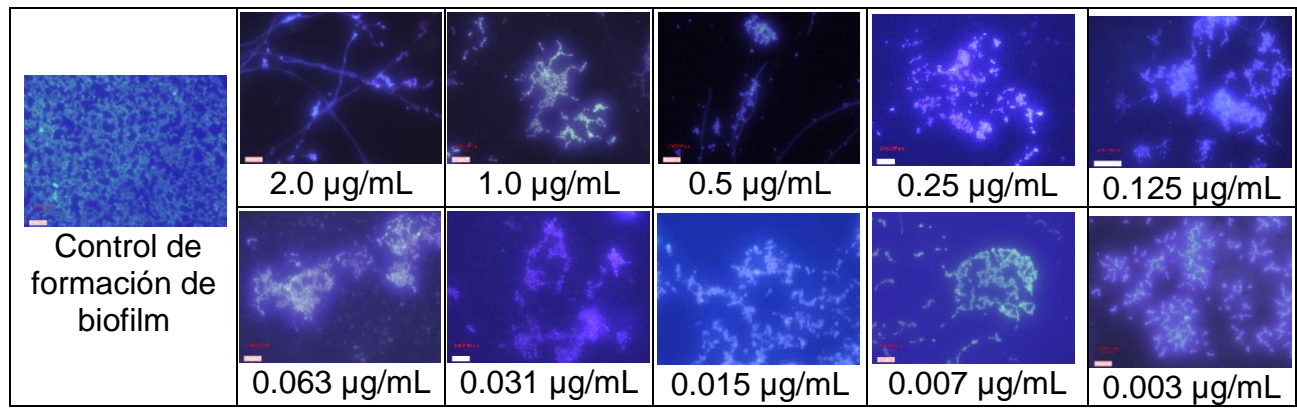


Figura 23: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Post-biofilm de *Candida tropicalis*. Autores

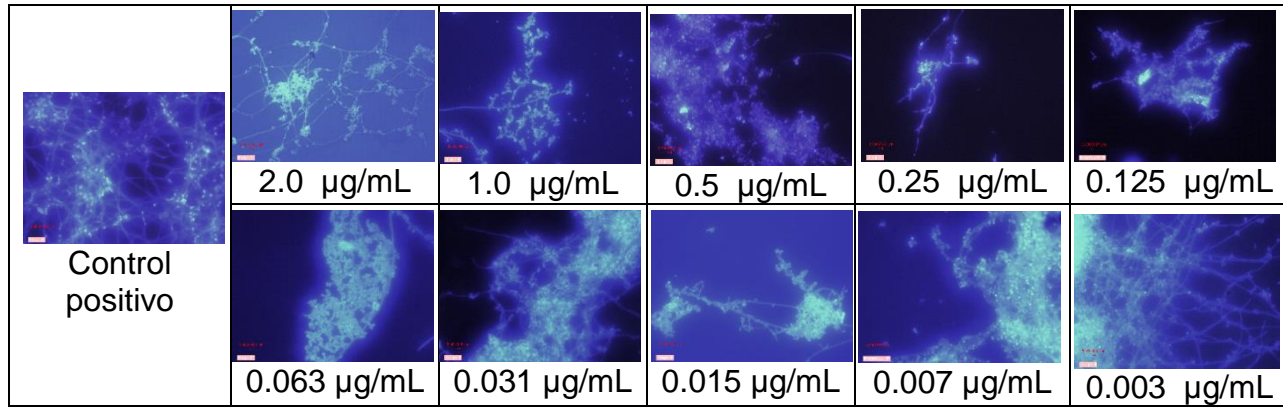


Figura 24: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Pre-biofilm de *Candida tropicalis*. Autores

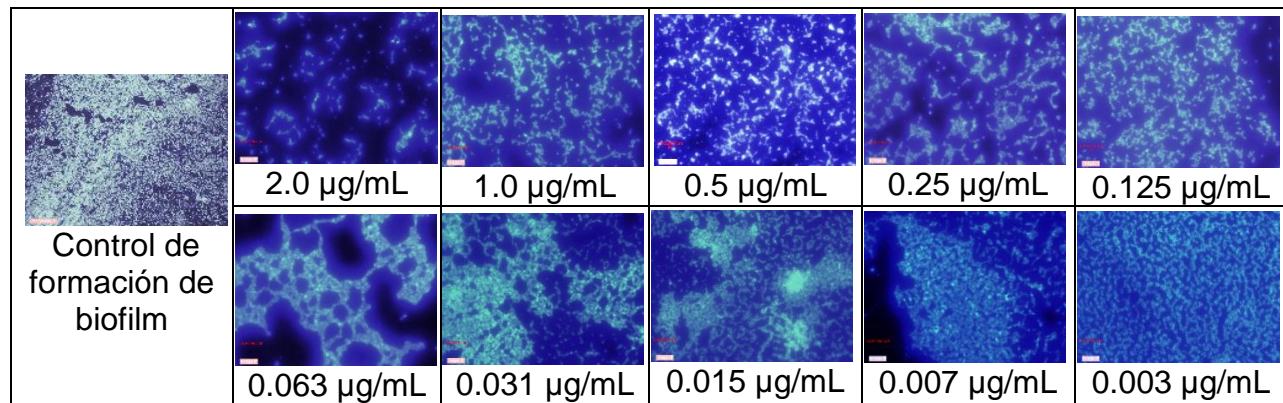


Figura 25: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Post-biofilm de *Candida tropicalis*. Autores

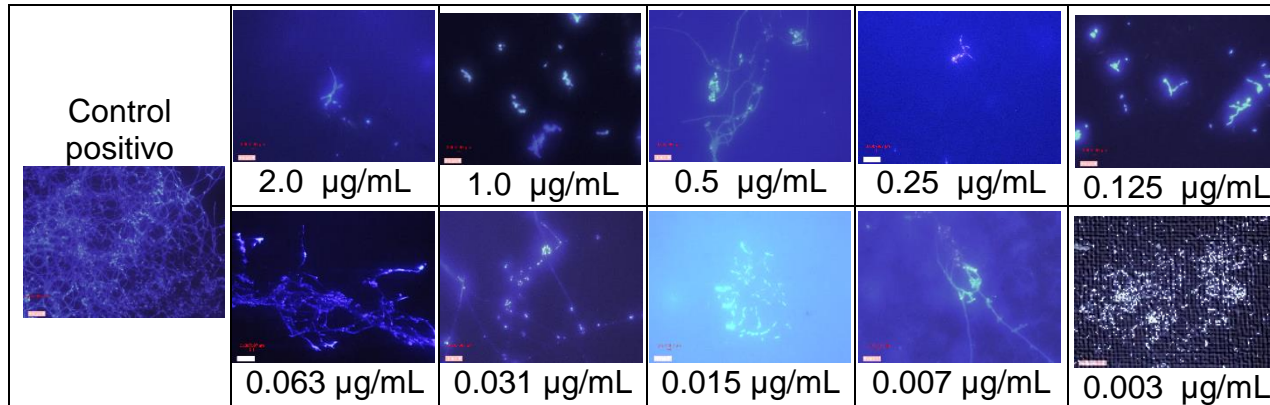


Figura 26: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Pre-biofilm de *Candida auris*. Autores

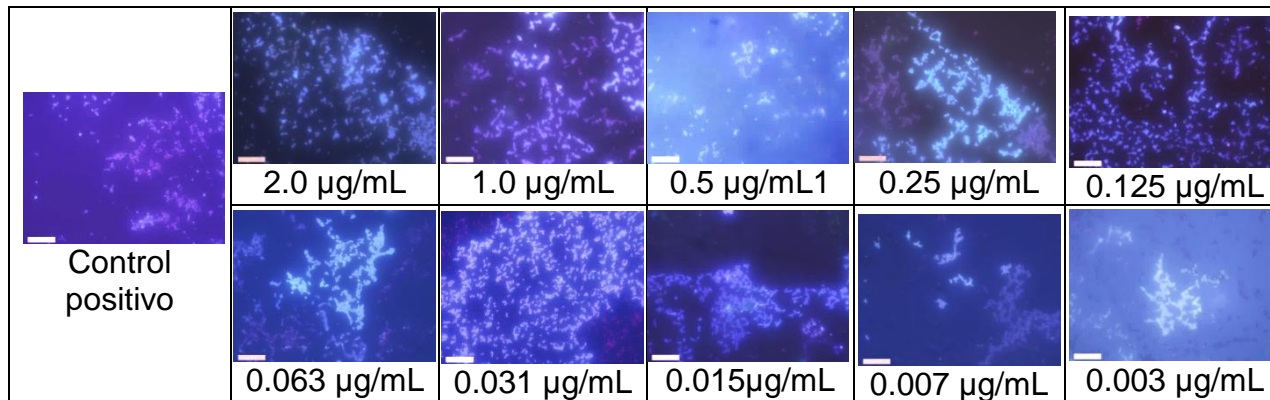


Figura 27: Evaluación del efecto de NPsAg-47 sobre Post-biofilm de *Candida auris*. Autores

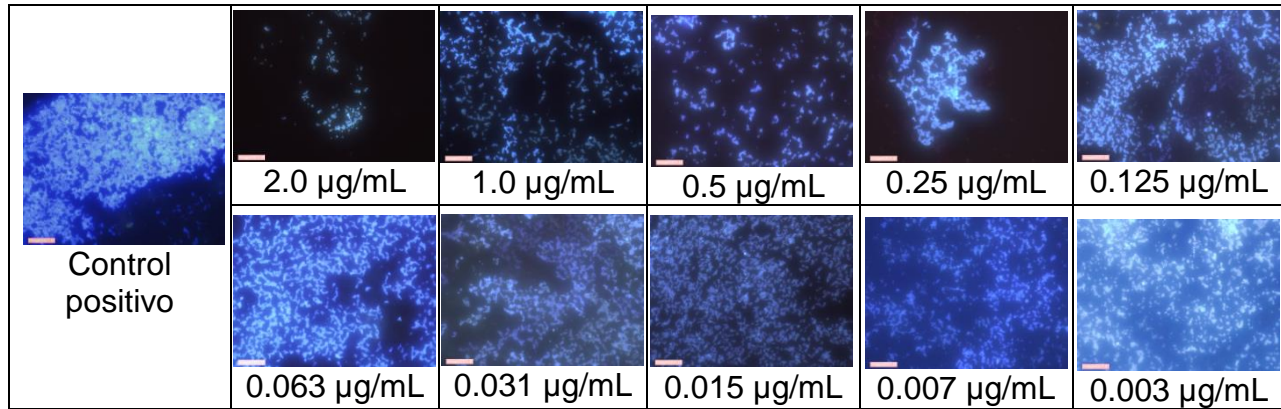


Figura 28: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Pre-biofilm de *Candida auris*. Autores

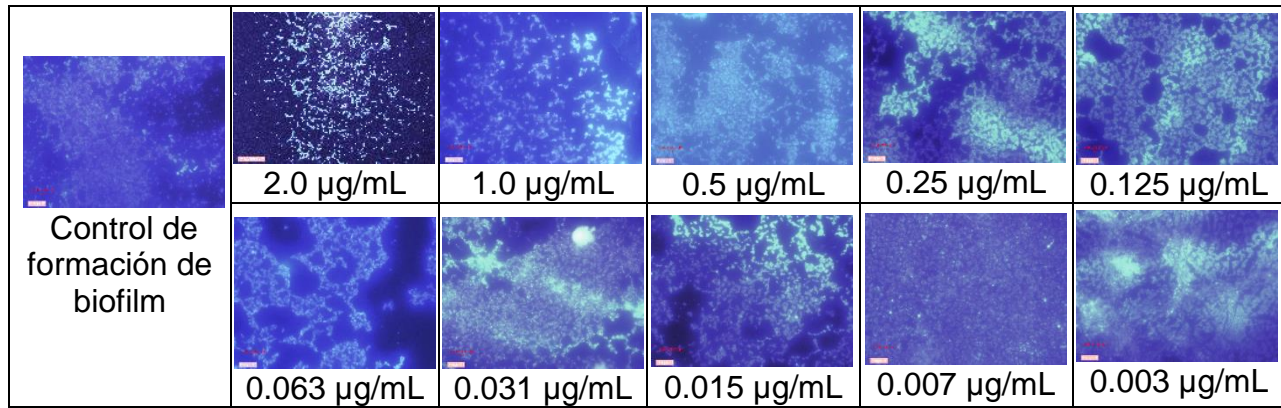


Figura 29: Evaluación del efecto de NPsAg-49 sobre Post-biofilm de *Candida auris*. Autores

6.4 Evaluación del efecto de NPsAg en la síntesis de biofilm por Microscopia electrónica de Barrido (SEM)

Los acrílicos con biofilm de levaduras de *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. auris* sometidos a las nanopartículas en las CMI seleccionados (1.0µg/mL, 0,5µg/mL, 0,25µg/mL,) fueron evaluados por SEM. Los resultados son presentados en las tablas 10, 11 y 12

Bajo la técnica de SEM se evidencio el efecto de las NPsAg-47 y NPs-49 sobre el Biofilm de *Candida spp* al compararlas con el control de formación, observando la reducción de estructuras micóticas tanto en levadura como en hifas y pseudohifas.

Tabla 10 Evaluación por SEM del efecto producido por NPsAg-47 y NPsAg-49 en biofilm de *Candida albicans*. Autores

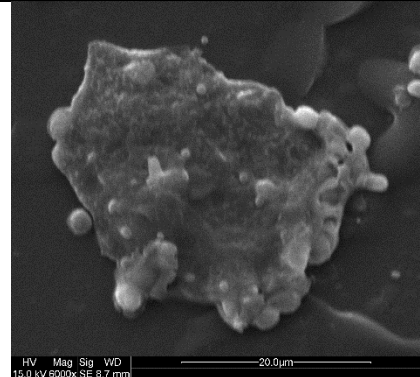
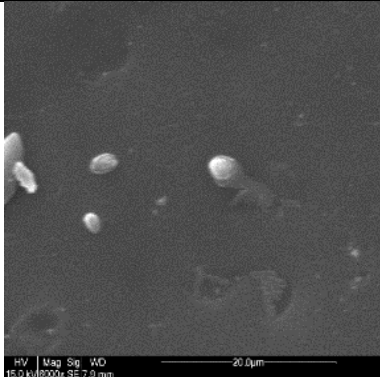
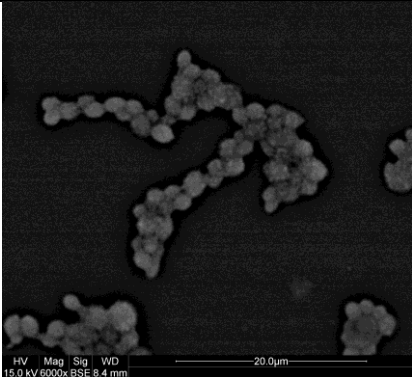
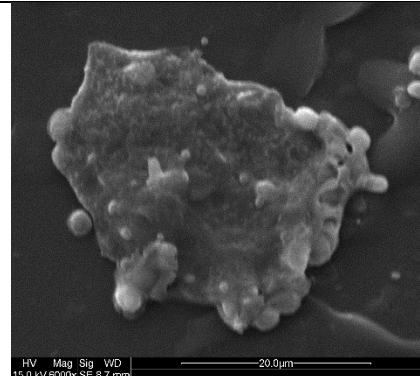
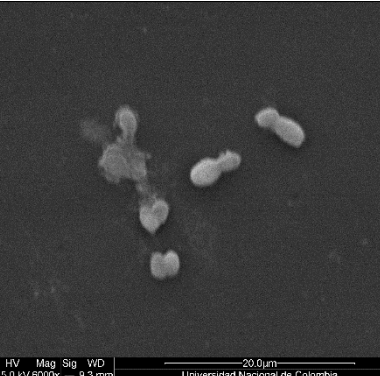
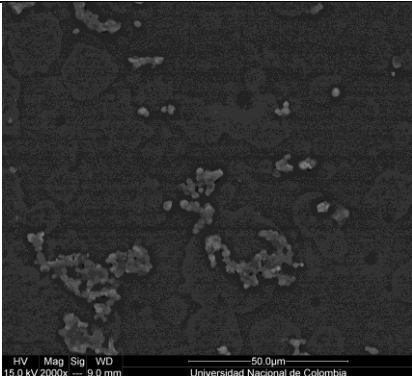
NPsAg-47 Control de crecimiento	CMI 0,5 µg/mL Pre-formación	CMI 0,5 µg/mL Post-formación
		
NPsAg-49 Control de crecimiento	CMI 1 µg/mL Pre-formación	CMI 0,5 µg/mL Post-formación
		

Tabla 11 Evaluación por SEM del efecto producido por NPsAg-47 y NPsAg-49 en biofilm de *Candida tropicalis*. Autores

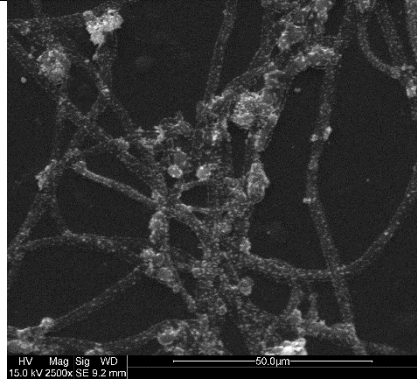
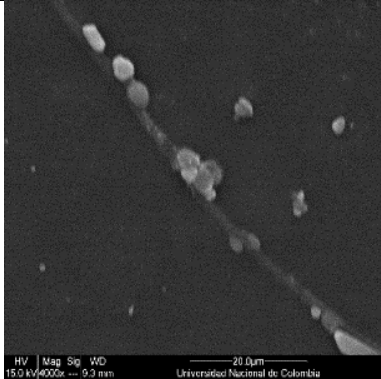
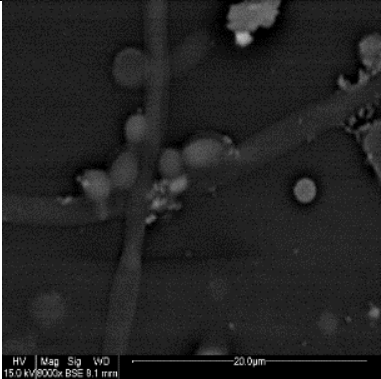
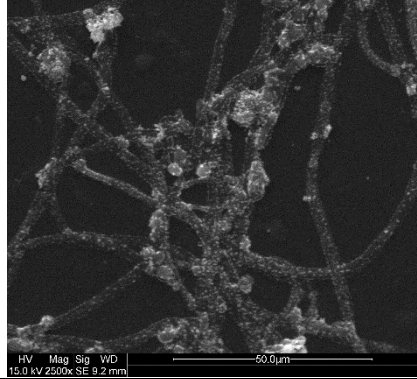
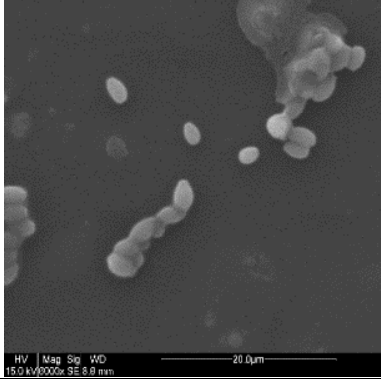

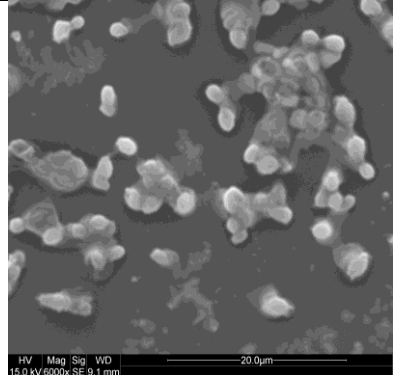
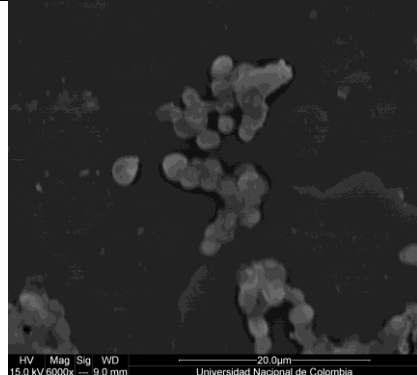
NPsAg-47	CMI 0,25 µg/mL	CMI 0,5 µg/mL
Control de crecimiento	Pre-formación	Post-formación
		
NPsAg-49	CMI 0,5 µg/mL	CMI 0,5 µg/mL
Control de crecimiento	Pre-formación	Post-formación
		

Tabla 12 Evaluación por SEM del efecto producido por NPsAg-47 en biofilm de *Candida auris*. Autores

NPsAg-47	CMI 0,5 µg/mL
Control de crecimiento	Pre-formación
	

En la observación a 10000x con 15.0 kV fue posible evidenciar la deformación a nivel de membrana causada por NPsAg-47y NPsAg-49, este resultado es mostrado en la figura 26.

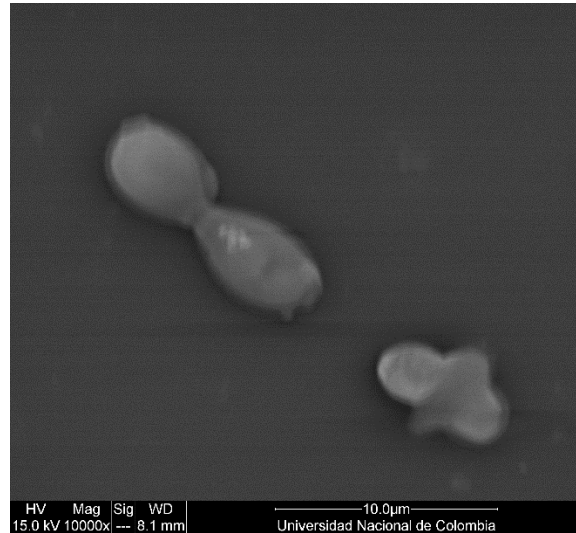


Figura 30 Deformación a nivel de membrana de levaduras de C. albicans. Autores

7. Discusión

El biofilm producido por microorganismos como resultado de la unión de células planctónicas a superficies tanto vivas como inertes, es así como la formación de biofilm se ha evidenciado en diferentes infecciones clínicas ocasionadas por hongos e inhibiendo la acción de tratamientos convencionales porque estas comunidades microbianas aportan resistencia a tratamientos que normalmente son eficientes en células planctónicas. (54) *Candida*, es la levadura con mayor importancia clínica debido a su creciente aumento en infecciones nosocomiales, por esta razón, el presente estudio se realizó para evaluar la capacidad de NPsAg para inhibir biofilm de *Candida spp.* (*Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida auris*) de forma in vitro sobre cuadrados de acrílico.

La formación de biofilm se evaluó por cinco métodos, tinción de cristal violeta (CV), ensayo MTT, blanco de Calcoflúor (BC), tinción de Gram y microscopía electrónica de barrido.

Por medio de la tinción de Gram y BC se evidencia la presencia de biofilm por medio de microscopía óptica y de fluorescencia (tabla 4, 5, 6 y 7), los resultados obtenidos a través de la comparación visual permitieron establecer que *C. albicans* fue la especie que formó menos biofilm, siendo en orden descendente *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* y *C. auris*, estos datos concuerdan con los obtenidos por Aggarwal y col, (14) quienes en su estudio concluyen que especies *Candida no albicans* son mejores formadoras de biofilm que *C. albicans*.

Con el paso de los años ha aumentado el uso de dispositivos permanentes (catéteres) en pacientes hospitalizados, lo que genera una mayor probabilidad de desarrollar una infección. En el estudio realizado por Hassan y col. (55) en 2011, mostró que el 64.7% de *Candida spp* eran productores fuertes de biofilm y el 36.3% eran formadores débiles de biofilm. En nuestros resultados del ensayo realizado mediante CV se pudo evidenciar la creación fuerte y moderada de biofilm de acuerdo a la absorbancia

presentada a las 24 horas (ANEXO 4) por diferentes especies de *Candida*. Entre las 48 cepas probadas por esta técnica, seleccionamos las cuatro mejores cepas formadoras de biofilm para evaluar sobre estas las NPsAg producidas por síntesis verde por el grupo de Procesos & Soluciones Energéticas (GP&SE). Monteiro y Col.(11) en su estudio realizaron lectura en microplaca para evaluar la formación de biofilm por medio de absorbancia luego de haber realizado técnica CV, gracias a esto lograron evidenciar que las cepas de *Candida albicans* y *Candida glabrata* eran fuertes productoras de biofilm y que al ser sometidas a las NPsAg se obtenía reducción del biofilm previamente formado, este efecto era afectado por la temperatura de fabricación de las NPsAg.

Para el experimento era importante establecer la concentración de levaduras y el tiempo requeridos en la formación del biofilm sobre acrílicos. Para esto se compararon los registros fotográficos de biofilm por tinción de Gram y BC. Encontramos que al trabajar concentración de 1.0×10^6 UFC/ml se obtenía fuerte biofilm a las 24 horas. Adicionalmente establecimos que *C. tropicalis* presentó la mayor formación de biofilm, seguida por *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, mientras que *C. auris* fue la cepa que presentó formación de biofilm disminuida.

Las infecciones causadas por biofilm de *Candida spp.* si no son tratadas oportunamente y de forma exitosa pueden generar complicaciones, como infecciones invasivas y llevar a la muerte, (56) tras el aumento en la resistencia fúngica presentada por estas levaduras, se ha estudiado el efecto de las nanopartículas como alternativa para esta problemática, gracias a que los metales han jugado un papel muy importante en el tratamiento de infecciones causadas por diferentes microorganismos, principalmente infecciones bacterianas. (57) Las nanopartículas implementadas en este estudio contaron con un tamaño promedio de 41,15 d nm para las NPsAg-47 y de 21,0 d nm para las NPsAg-49. Por medio de SEM se evidenció que las NPsAg-47 presentaban forma alargada y redondas y las NPsAg-49 fueron redondas (figura 9).

El efecto producido por NPsAg-47 y NPsAg-49 sobre el biofilm de levaduras fue evaluado por medio de ensayo MTT, gracias a que se puede medir la supervivencia y proliferación celular de las levaduras en el biofilm, al determinar la funcionalidad mitocondrial. La cantidad de levaduras vivas es proporcional a la cantidad de cristales de formazan producido, con los resultados se generaron curvas de dispersión para cada levadura, en las figuras 10, 11, 12, y 13 con las cuales determinamos las concentraciones requeridas para lograr un efecto inhibitor (CMI) sobre el biofilm de *Candida spp.* Las NPsAg se probaron a concentraciones muy pequeñas desde 0,003µg/mL hasta 2.0µg/mL y establecimos que son funcionales a las concentraciones (0.25 µg/ml y 0.5 µg/ml), seguramente gracias al tamaño promedio de 41.15nm de las NPsAg-47 y de 21.0nm de las NPsAg-49. Nuestros resultados concuerdan con los presentados por Hwnag y col.,(46) quienes determinaron la actividad antifúngica de las NPsAg de tamaño <0.8µm contra *C. albicans*. Esta sustancia exhibió una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 2.0 mg/ml en *C. albicans* demostrando la efectividad de las NPsAg contra la disfunción mitocondrial en concentración baja y sin evidencia de toxicidad.

Se observó que el efecto de las NPsAg-47 y NPsAg-49 sobre el biofilm de *Candida* fue diferente, esto se puede evidenciar al comparar las curvas de biofilm pre-formado y post-formado de cada levadura, las curvas azules indican pre-biofilm y las rojas post-biofilm, a menor absorbancia menor cantidad de células fúngicas presentes en las muestras. En la figura 10 se evidencia que para *C. albicans* las NPsAg-47 tienen mayor efecto inhibitor en tratamiento pre-biofilm que post-biofilm, mientras que las NPsAg-49 muestran un efecto contrario, en la figura 11; se evidencia que para *C. guilliermondii* ambas nanopartículas actúan mejor en pre-biofilm. La figura 12 muestra que para *C. tropicalis* el efecto inhibitorio de las NPsAg-47 y NPsAg-49 es contrario al evidenciado para *C. guilliermondii* (figura 11), en este caso el efecto es mayor en post-biofilm con ambas NPsAg. Finalmente, se logra observar que en *C. auris* (figura 13) los resultados obtenidos son contrarios a *C. albicans* (figura 11), el efecto de la NPsAg-47 es mejor en post-biofilm y de la NPsAg-49 en pre-biofilm. Con estos resultados no es posible establecer cuál de las NPsAg probadas es mejor inhibiendo la formación del biofilm.

No se observó diferencias marcadas entre las CMI de las NPsAg-47 y NPsAg-49 entre los biofilm pre-formado y post-formación (tabla 9), resultado diferente al obtenido por Lara y col., (6) quienes en su estudio con *Candida* concluyeron que la concentración requerida de NPsAg para el tratamiento de un biofilm post-formación fue de 0.0089 ppm y un biofilm pre-formación fue de 0.48 ppm, demostrando que las concentraciones para tratamiento de un biofilm post-formación no es mayor a la requerida para tratar un biofilm pre-formación.

El efecto de las NPsAg tanto en pre-biofilm y post-biofilm, también fue evaluado microscópicamente por BC, es una tinción de fluorescencia que permite visualizar elementos fúngicos de forma más rápida uniéndose a la celulosa y quitina de la pared fúngica. (58) Las estructuras se visualizan de color azul usando microscopio de fluorescencia. En las figuras 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 y 29 se evidencia la reducción del biofilm previamente formado al añadir NPsAg-47 y NPsAg-49, esto permitió confirmar el resultado obtenido por el ensayo MTT, de acuerdo al registro fotográfico la CMI de 0.25 ug/ml de NPsAg-47 fue la que mostró mayor efectividad sobre pre-biofilm contra especies de *C. guilliermondi*, *C. tropicalis* y *C. auris* (tabla 9). Estos resultados concuerdan con lo propuesto por Modiri y col. quienes demostraron que no hay diferencias significativas en la eficacia de medición de biomasa de biofilm de *Candida parapsilosis* por las técnicas de cristal violeta y MTT. (52)

Finalmente se realizó SEM con el fin de observar la diferencia entre el biofilm de las distintas levaduras estudiadas y así poder confirmar el efecto inhibitorio de las NPsAg-47 y NPsAg-49 sobre el biofilm de *Candida spp.* Se observó que el biofilm de *C. albicans* era más denso y con poca presencia de hifas, al adicionar las NPsAg se redujo la matriz de polisacáridos que formaba el biofilm (tabla 10). En el caso de *C. tropicalis* la matriz del biofilm era menos densa pero con gran cantidad de hifas, observamos que la aplicación de las NPsAg provocó su reducción (tabla 11). En el caso de *C. auris* se observó que el biofilm era menos denso y no había presencia de hifas (tabla 12) al adicionar NPsAg la reducción del biofilm fue más evidente que para *C.*

albicans y *C. tropicalis*. Selvaraj y col, (2) lograron observar bajo SEM un daño en la membrana causado por la ruptura de la barrera de permeabilidad en *Candida albicans* que ocasionan las NPsAg para poder destruir el biofilm formado. De igual forma, Lara y col, (6) en su estudio encontraron resultados que confirman la acción de la NPsAg sobre la membrana de la levadura causando una permeabilización mayor para permitir el ingreso de la NPsAg, en el presente estudio, se logró evidenciar un daño en la membrana de levaduras de *Candida spp.* por SEM (figura 30).

Las NPsAg-47 y NPsAg-49 fueron de utilidad para la reducción de biofilm formado, pero aún más importante demostraron una gran capacidad para prevenir la formación de biofilm de *Candida spp.*, lo que indica que su capacidad antifúngica es de amplio espectro y podrían considerarse como alternativa de tratamiento y su uso para prevenir la formación de biofilm de los catéteres antes de ser implantados en los pacientes mediante recubrimiento con NPsAg.

8. Conclusiones

Las nanopartículas de plata inhiben in vitro la formación de biofilm por *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* y *C. auris*

La NPsAg-47 fue la mejor alternativa de tratamiento, al actuar a 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 evidenció mediante microscopía electrónica de barrido el daño en la membrana de las levaduras.

Referencias Bibliográficas

1. Nett JE, Brooks EG, Cabezas-Olcoz J, Sanchez H, Zarnowski R, Marchillo K, et al. Rat indwelling urinary catheter model of *Candida albicans* biofilm infection. *Infection and immunity*. 2014;82(12):4931-40. Epub 2014/09/04.
2. 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.
3. Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horizonte Médico*. 2018;18:75-85.
4. Maskarinec SA, Parlak Z, Tu Q, Levering V, Zauscher S, Lopez GP, et al. On-demand release of *Candida albicans* biofilms from urinary catheters by mechanical surface deformation. *Biofouling*. 2018;34(6):595-604.
5. 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.
6. Lara HH, Romero-Urbina DG, Pierce C, Lopez-Ribot JL, Arellano-Jimenez MJ, Jose-Yacamán M. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *Journal of nanobiotechnology*. 2015;13:91.
7. 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.
8. Seidler M, Salvenmoser S, Muller FM. Liposomal amphotericin B eradicates *Candida albicans* biofilm in a continuous catheter flow model. *FEMS Yeast Res*. England2010. p. 492-5.
9. Monteiro DR, Gorup LF, Silva S, Negri M, de Camargo ER, Oliveira R, et al. Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling*. 2011;27(7):711-9. Epub 2011/07/16.
10. 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*. England2013. p. 10-24.
11. Monteiro DR, Takamiya AS, Feresin LP, Gorup LF, de Camargo ER, Delbem AC, et al. Silver colloidal nanoparticle stability: influence on *Candida* biofilms formed on denture acrylic. *Medical mycology*. 2014;52(6):627-35. Epub 2014/06/22.
12. Moota G, Muñoz 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.
13. Trevino-Rangel RJ, Pena-Lopez CD, Hernandez-Rodriguez PA, Beltran-Santiago D, Gonzalez GM. Association between *Candida* biofilm-forming bloodstream isolates and the clinical evolution in patients with candidemia: An observational nine-year single center study in Mexico. *Rev Iberoam Micol*. 2018;35(1):11-6. Epub 2017/12/31.
14. Aggarwal P, Kashyap B. Biofilm production by clinically isolated *Candida*: Comparative analysis based on specimen, methodology, and various *Candida* species. *Indian Journal of Medical Specialities*. 2018;9(2):69-72.
15. 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.
16. INS INdS. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica 31. 2019. p. 31.

17. Fortun J, Martin-Davila P, Gomez-Garcia de la Pedrosa E, Pintado V, Cobo J, Fresco G, et al. Emerging trends in candidemia: a higher incidence but a similar outcome. *The Journal of infection*. 2012;65(1):64-70. Epub 2012/03/01.
18. Shigemura K, Osawa K, Jikimoto T, Yoshida H, Hayama B, Ohji G, et al. Comparison of the clinical risk factors between *Candida albicans* and *Candida non-albicans* species for bloodstream infection. *The Journal of antibiotics*. 2014;67(4):311-4. Epub 2014/01/16.
19. Bedout C, Gómez B. *Candida* y candidiasis invasora: un reto continuo para su diagnóstico temprano. *Infectio*. 2013;31(6):159-71.
20. Chillogallo C. "ESPECIES DE *Candida* Y SU RESISTENCIA A FLUCONAZOL EN MUESTRAS DE SECRECIÓN VAGINAL DE MUJERES EMBARAZADAS ATENDIDAS EN EL CENTRO DE SALUD N°1 DE LA CIUDAD DE LOJA". Loja: UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA; 2015.
21. Sanchez E. DIAGNOSTICO DE CANDIDIASIS Y CANDIDEMIAS EN NEONATOS. Bogota, D.C: Pontificia Universidad Javeriana de Colombia; 2009.
22. NCBI. Taxonomia de *Candida* sp. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/?term=Candida>.
23. Uribe L. Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de mora. Bogotá, D.C.: Pontificia Universidad Javeriana 2007.
24. SANCHEZ S. DETERMINACIÓN DE CÁNDIDA SPP. EN PACIENTES INMUNODEPRIMIDOS EN LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS. HOSPITAL DE LA POLICÍA G-2. GUAYAQUIL, ECUADOR UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL 2014.
25. Barrero L, Rivera S, Villalobos A. Protocolo de Vigilancia en Salud Pública: Infecciones Asociadas a Dispositivos. In: Salud GETEdIAalAe, editor. 4 ed. Colombia: Instituto Nacional de Salud; 2016. p. 65.
26. Bouza E, Guinea J, Guembe M. The Role of Antifungals against *Candida* Biofilm in Catheter-Related Candidemia. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 2014;4(1):1-17. Epub 2014/01/01.
27. Coria P. Fungemias asociadas a catéter por *Candida* sp. en neonatología 2012. 479- p.
28. Cornistein W, Mora A, Orellana N, Capparelli FJ, del Castillo M. *Candida*: epidemiología y factores de riesgo para especies no *C. albicans*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2013;31(6):380-4.
29. Ruiz Gaitán AC, Moret A, López Hontangas JL, Molina JM, Aleixandre López AI, Cabezas AH, et al. Nosocomial fungemia by *Candida auris*: First four reported cases in continental Europe. *Rev Iberoam Micol*. 2017;34(1):23-7.
30. Fernández M. DETERMINACIÓN DE CÁNDIDA SPP. EN PACIENTES INMUNODEPRIMIDOS EN LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS. PAMPLONA: UNIVERSIDAD DE NAVARRA; 2017.
31. Ghannoum M, Roilides E, Katragkou A, Petraitis V, Walsh TJ. The Role of Echinocandins in *Candida* Biofilm-Related Vascular Catheter Infections: In Vitro and In Vivo Model Systems. *Clin Infect Dis*. United States: The Author 2015. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.; 2015. p. S618-21.
32. Silva S, Rodrigues CF, Araujo D, Rodrigues ME, Henriques M. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. *J Fungi (Basel)*. 2017;3(1).
33. Castrillon L, Ramos AP, Padilla Desgarenes MC. Biopelículas fúngicas. *Dermatologia Revista Mexicana*. 2013;57:350-61.
34. Jonathan S, Aaron M. Biofilm Formation in *Candida albicans*. In: Richard C, Cornelius C, editors. *Candida and Candidiasis*. 2nd ed. United States of America 2012. p. 509.
35. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and infection*. 2016;18(5):310-21. Epub 2016/01/26.

36. de Oliveira Santos GC, Vasconcelos CC, Lopes AJO, de Sousa Cartagenes MDS, Filho A, do Nascimento FRF, et al. Candida Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:1351. Epub 2018/07/19.
37. Del Pozo JL, Cantón E. Candidiasis asociada a biopelículas. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2016;33(3):176-83.
38. Varghese R, Almalki MA, Ilavenil S, Rebecca J, Choi KC. Silver nanoparticles synthesized using the seed extract of *Trigonella foenum-graecum* L. and their antimicrobial mechanism and anticancer properties. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2019;26(1):148-54.
39. Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*. 2016;17(9).
40. Delay M, Frimmel FH. Nanoparticles in aquatic systems. *Anal Bioanal Chem*. 2012;402(2):583-92. Epub 2011/11/01.
41. Gómez M. Usos terapéuticos de nanomateriales y nanopartículas. *Revista Repertorio De Medicina Y Cirugía*. 2019;28:1-5.
42. Gómez M. Nanomateriales, Nanopartículas y Síntesis verde. *Repertorio de Medicina y Cirugía*. 2018;27(2):75-80.
43. McNeil SE. Nanotechnology for the biologist. *J Leukoc Biol*. United States 2005. p. 585-94.
44. Zhao X, Zhou L, Riaz Rajoka MS, Yan L, Jiang C, Shao D, et al. Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. *Crit Rev Biotechnol*. 2018;38(6):817-35. Epub 2017/12/20.
45. Rajeshkumar S, Bharath LV. Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles - A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. *Chem Biol Interact*. Ireland: 2017 Elsevier B.V; 2017. p. 219-27.
46. Wang H, Xie B. Study on how nanosilver-based inorganic antibacterial agent functions on biofilm formation of *Candida albicans*, inside the oral cavity. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2016;44(6):1429-33. Epub 2015/05/15.
47. Arenas C. Síntesis de nanopartículas metálicas a partir de extractos de raspo de uva. Barcelona: Universidad Politécnica de Catalunya; 2017.
48. El-Wassefy NA, El-Mahdy RH, El-Kholany NR. The impact of silver nanoparticles integration on biofilm formation and mechanical properties of glass ionomer cement. *J Esthet Restor Dent*. 2018;30(2):146-52. Epub 2017/12/03.
49. Gholamrezazadeh M, Shakibaie MR, Monirzadeh F, Masoumi S, Hashemizadeh Z. Effect of nano-silver, nano-copper, deconex and benzalkonium chloride on biofilm formation and expression of transcription regulatory quorum sensing gene (rh1R) in drug-resistance *Pseudomonas aeruginosa* burn isolates. *Burns*. Netherlands: 2017 Elsevier Ltd and ISBI; 2018. p. 700-8.
50. Quintili M. Nanociencia y Nanotecnología... un mundo pequeño. *Dialnet*. 2012:30.
51. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63. Epub 1983/12/16.
52. Modiri M, Khodavaisy S, Barac A, Akbari Dana M, Nazemi L, Aala F, et al. Comparison of biofilm-producing ability of clinical isolates of *Candida parapsilosis* species complex. *Journal de mycologie medicale*. 2019;29(2):140-6. Epub 2019/03/16.
53. Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Jr., Mowat E, Ramage G, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc*. 2008;3(9):1494-500. Epub 2008/09/06.
54. Lukaszuk C, Krajewska-Kulak E, Kulak W. Retrospective observation of drug susceptibility of *Candida* strains in the years 1999, 2004, and 2015. *PeerJ*. 2017;5:e3038.

55. Varshan R, Gopinath P. Characterization and Biofilm Detection among Clinically Important Candida Species. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2016;9:1375.
56. Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of Candida biofilm drug resistance. *Future Microbiol*. 2013;8(10):1325-37.
57. Calderon-Jimenez B, Johnson ME, Montoro Bustos AR, Murphy KE, Winchester MR, Vega Baudrit JR. Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological Challenges. *Front Chem*. 2017;5:6. Epub 2017/03/09.
58. GARCIA C P, BELTRÁN M C, GUZMÁN AM, LEÓN TMP, ARREDONDO A MP, FONSECA A X. Diagnóstico rápido de dos casos de mucormicosis con tinción de blanco de calcoflúor. *Revista chilena de infectología*. 2001;18:285-90.

ANEXOS

Anexo 1:

Preparación de PDA

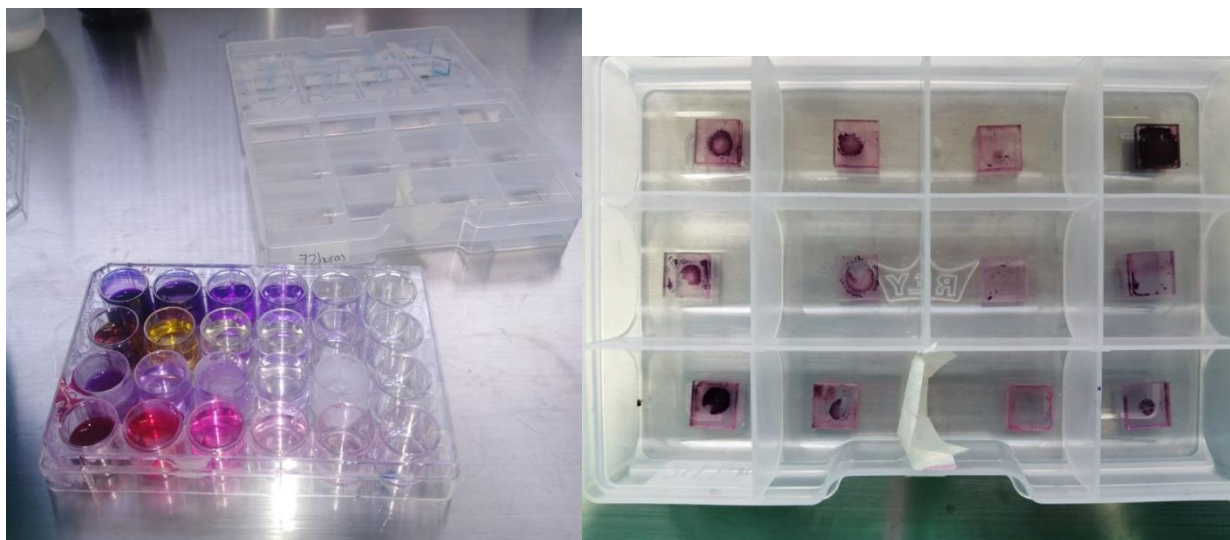
Se prepararon 1000mL de medio dividido en 2 Erlenmeyer de 500mL cada uno, para cada Erlenmeyer se rehidrataron 19.5g del medio en 500mL de agua destilada. Se calentó agitando el medio hasta disolver por completo. Finalmente se llevaron a esterilizar para luego adicionar en cajas de petri.

Anexo 2:

Tinción de Gram:

Se realiza en una placa de cultivo celular. En el pozo A1 de la placa seleccionada se agrega colorante Cristal Violeta; en el B1 se agrega Lugol de Gram; en el C1 se agrega Alcohol de Gram y en el D1 se agrega Fucsina de Gram. Se sumerge cadaacrílico en cada uno de los pozos, realizando lavados sumergiendo elacrílico entre cada colorante.

Colorante	Tiempo
Cristal Violeta	1 minuto
Lugol de Gram	1 minuto
Alcohol de Gram	15 segundo
Fucsina de Gram	30 segundos



Anexo 3:

Coloración Blanco Calcofluor:

En la placa de cultivo celular seleccionada para coloración se destina la columna 6 para esta coloración, en el pozo A6 se agrega colorante Blanco Calcofluor y se deja cada acrílico 1 minuto, luego se procede a lavar en los pozos del B6 al D6 sumergiendo el acrílico. Finalmente se dejan secar los acrílicos a temperatura ambiente.



Anexo 4:

Resultados del ensayo realizado para la selección de cepas productoras de biofilm

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
<i>C. albicans</i> 4	0.203	0.136	0.169
<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>	0.180	0.150	0.166

16			
<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. guilliermondii</i> 31	0,164	0,153	0,158
<i>C. guilliermondii</i> 32	0.158	0.144	0.151
<i>C. guilliermondii</i> 33	0.176	0.140	0.157

<i>C. guillermondii</i> 34	0.164	0.137	0.150
<i>C. guillermondii</i> 35	0.136	0.147	0.141
<i>C. guillermondii</i> 36	0.158	0.149	0.153
<i>C. guillermondii</i> 37	0.080	0.134	0.107
<i>C. guillermondii</i> 38	0.149	0.163	0.156
<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
<i>C. tropicalis</i> 46	0.214	0.135	0.174
<i>C. tropicalis</i> 47	0.162	0.150	0.156
<i>C. tropicalis</i> 48	-0.072	0.161	
<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