



SENSIBILIDAD DE *Candida albicans* CEPA ATCC 10231 A NANOPARTÍCULAS DE PLATA OBTENIDAS POR SÍNTESIS VERDE DE *Moringa oleífera*.

PROYECTO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TITULO DE BACTERIOLOGA Y LABORATORISTA CLINICO

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGIA
BOGOTA, JUNIO 2019**



SENSIBILIDAD DE *Candida albicans* CEPA ATCC 10231 A NANOPARTÍCULAS DE PLATA OBTENIDAS POR SÍNTESIS VERDE DE *Moringa oleífera*.

VIVIAN BRILLITT LIÉVANO ROMERO

ASESOR INTERNO:

**SONIA MARCELA ROSAS ARANGO, MSc
UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTA, JUNIO 2019**

AGRADECIMIENTOS

- A la profesora Sonia Marcela Rosas quien fue mi apoyo tanto académico como personal, para lograr cumplir con el plan propuesto para este documento.
- A Tecnoparque del Sena y cada uno de sus integrantes de laboratorio de nanotecnología por brindarme los medios y estrategias de los procesos que allí se llevaron a cabo para la realización de este proyecto.
- A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y el laboratorio del grupo de investigación REMA por su apoyo, guía y disposición de sus equipos de trabajo.
- Al laboratorio Servet y a sus integrantes por permitirme disponer de los medios y estrategias en cada una de las fases del desarrollo de mi proyecto.

CONTENIDO

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVOS	11
General:	11
Objetivos específicos	11
ANTECEDENTES.....	12
MARCO REFERENCIAL	15
1.1 <i>Candida albicans</i>	15
1.1.1 Clasificación taxonómica.....	16
1.1.2 Factores de virulencia	16
1.1.3 Adherencia.....	17
1.1.4 Adaptación al medio ambiente.....	17
1.1.5 Formación de biofilm.....	18
1.2 CANDIDIASIS.....	19
1.2.1 Tratamiento.....	20
1.2.2 Métodos diagnósticos	21
1.2.3 Situación epidemiológica de <i>Candida spp</i>	22
1.3 Nanopartículas de plata (AgNPs)	23
1.3.1 Generalidades de las nanopartículas	23
1.3.2. Síntesis de Nanopartículas de Plata.....	24
1.3.3 Síntesis Física	25
1.3.4 Síntesis Verde o Química Verde	26
1.3.5 Caracterización de nanopartículas	27
1.3.6 Actividad antimicótica de las nanopartículas de plata	28
1.4 <i>Moringa Oleífera</i>	29
2. DISEÑO METODOLÓGICO.....	31
2.1 Tipo de investigación	31
2.2 Variables	31
2.3 Técnicas y procedimientos.....	33
2.3.1 Muestra.....	33
2.3.2 Técnicas y procedimientos.....	33

2.3.2.1 Recolección de <i>Moringa oleífera</i>	33
2.3.2.2. Preparación del extracto acuoso de <i>Moringa oleífera</i>	33
2.3.3. Síntesis Nanopartículas de plata AgNPs	34
2.3.4 Preparación medio de cultivo y estandarización de discos	35
3. RESULTADOS	36
3.1 Valoración del espectro de absorción para el fenómeno de resonancia de plasmón superficial.....	36
3.2. Caracterización de las Nanopartículas de plata por medio del AFM (Microscopia de Fuerza Atómica)	37
3.3. Valoración de sensibilidad a las nanopartículas por medio del equipo Bioscreen C10	40
3.4. Medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA)	41
3.5. Ensayo de curva de crecimiento de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	45
4. DISCUSIÓN.....	49
5. CONCLUSIONES.....	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
6. ANEXOS.....	61
Anexo 6.1 Resultados absorbancias ensayo curva de crecimiento de <i>Candida albicans</i> cepa ATCC 10231, en 48 horas evaluada en equipo Bioscreen C100	61

SENSIBILIDAD DE *Candida albicans* CEPA ATCC 10231 A NANOPARTÍCULAS DE PLATA OBTENIDAS POR SÍNTESIS VERDE DE *Moringa oleífera*.

RESUMEN

La presencia de microorganismos resistentes a los tratamientos farmacéuticos aumenta a nivel global, procesos como la formación de biofilm y la transferencia de genes de resistencia promueven la persistencia y mayores índices de morbilidad y mortalidad en todos los grupos poblacionales, situación que genera una alerta sobre las estrategias de control de los microorganismos en escenarios ambientales y nosocomiales. Este proyecto evalúa la sensibilidad de Nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde a partir del extracto de *Moringa oleífera* sobre la cepa ATCC 10231 de *Candida albicans*, formadora de biofilm. Las nanopartículas de síntesis verde se generaron usando la técnica *one-pot-one*, posteriormente mediante microscopia AFM se caracterizaron las nanopartículas por tamaño y forma, confirmando una forma esférica con tamaños de 86nm, 107nm, 121nm y 142nm. Para la evaluación de inhibición del crecimiento se prepararon soluciones de 100, 75, 50 y 25 relación v/v de nitrato de plata y extracto acuoso de *Moringa oleífera*, las soluciones se probaron sobre la levadura por el método de difusión en agar y adicionalmente se realizó un ensayo de curva de crecimiento en el equipo *Bioscreen C100* con el fin de evaluar el número de células al finalizar el crecimiento de 48 horas. Los resultados evidencian una efectividad en la inhibición del crecimiento, con mayor sensibilidad en las concentraciones de 50 v/v y 25 v/v, además se logró determinar que el efecto de las nanopartículas de plata obtenidas en este estudio es fungistático y no fungicida sobre la cepa ATCC 10231 de *Candida albicans*.

Palabras clave: Nanopartículas metálicas, *Candida albicans*, *Moringa oleífera*

Estudiante: Vivian Liévano

Docente: Sonia Marcela Rosas Arango

INTRODUCCIÓN

Son diversos los patógenos que producen infecciones asociadas al cuidado de la salud (IAAS), un agente fúngico como *Candida spp.* se ha visto implicado como causal de enfermedades infecciosas y resistentes a los tratamientos propuestos por los profesionales tratantes. Su desarrollo clínico puede darse en la mucosa orofaríngea, tracto respiratorio, tracto digestivo y genitourinario, en casos severos, puede desarrollarse un cuadro sistémico de candidiasis invasiva o candidemia. A nivel mundial la candidemia constituye una causa común de morbilidad y mortalidad, en estudio realizado en 2018 en Estados Unidos y Suiza se analizaron casos de infecciones nosocomiales se evidenció que esta ocupa el cuarto y séptimo lugar de la causa más común presentada en el manejo de pacientes hospitalarios. En Colombia los estudios demuestran una distribución similar siendo la candidemia la quinta causa más frecuente de infección por *Candida spp.* a nivel hospitalario. (4,18)

La *Candida albicans* tiene la capacidad de generar resistencia a los compuestos con grupo azol, mediante la alteración de las enzimas relacionadas en la síntesis del ergosterol y por la alteración en las bombas de expulsión: *ATP-binding cassette (ABC)* y facilitadores mayores (MF), además de los factores de adhesión que favorecen la formación de biopelículas, lo cual le otorga resistencia a las terapias antifúngicas convencionales, siendo los más utilizados los derivados imidazólicos.

En la actualidad el uso de antifúngicos tipo fluconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol, han demostrado disminución en su efectividad debido a la resistencia generada por situaciones asociadas al uso de tratamientos profilácticos, tratamientos en dosis inadecuadas o incompletas, prescripción empírica y automedicación que promueven, la aparición de levaduras resistentes y nuevas especies patógenas. Estas levaduras logran invadir y permanecer, incluso, en dispositivos médicos implantados, como catéteres, marcapasos, prótesis dentales y articulaciones protésicas. (2,33)

Entre las alternativas para la prevención y disminución de la prevalencia de estas infecciones, se encuentran investigaciones centradas en el uso de nanopartículas de plata (AgNPs) que pueden obtenerse a partir de la sal del nitrato de plata (AgNO_3) que es un conocido agente antimicrobiano por la toxicidad del ión de plata. (50)

Para lograr contribuir con esta tendencia en la mejora de las alternativas a los tratamientos para el manejo de agentes micóticos, se estudió la posible inhibición de crecimiento de la cepa ATCC 10231 de *Candida albicans* usando nanopartículas de plata obtenidas a partir de la síntesis verde con extracto acuoso de *Moringa oleífera*.

Para evaluar la inhibición de crecimiento de la cepa frente a las Nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde de *Moringa oleífera*, se emplearon las metodologías de difusión en agar y curva de crecimiento bajo la exposición a soluciones de nanopartículas con una relación p/v conocida, los ensayos se realizaron por triplicado y se usó como control de inhibición fluconazol.

En el análisis de los resultados obtenidos se logró evidenciar que en una concentración de la solución v/v 50 y 25 de nanopartículas de plata, el ensayo de difusión en agar mostró un halo de inhibición de 14mm, frente al control con fluconazol que exhibió un halo de inhibición de 32mm. Además en el análisis del ensayo de curva de crecimiento se aprecia en las diferentes concentraciones que al igual que en el control la tendencia al final del ensayo es a continuar el crecimiento ya que se evidenció que dentro del análisis en una tabla de vida se logra establecer la cantidad de células al final del ensayo, en la concentración v/v 50 y 25 la cantidad de células es 788 y 413 respectivamente evaluada en 48 horas observado que aunque se presente un número menor de células que el inicial(100 células), esto sugiere un efecto fungistático al final del ensayo.

OBJETIVOS

General:

Evaluar la inhibición del crecimiento de la cepa ATCC de *Candida albicans* cepa ATCC 10231 frente a nanopartículas de plata (AgNPs) obtenidas por síntesis verde a partir de *Moringa oleífera*.

Objetivos específicos:

- Caracterizar las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde a partir de *Moringa oleífera*
- Determinar la concentración del extracto acuoso de *Moringa oleífera* que muestre una efectiva inhibición sobre la cepa ATCC 10231 de *Candida albicans*.
- Determinar la técnica que permita evidenciar la inhibición antimicótica de las Nanopartículas de plata (AgNPs) obtenidas por síntesis verde a partir de *Moringa oleífera* sobre la cepa ATCC 10231 de *Candida albicans*.

ANTECEDENTES

A través de los años se han buscado obtener nuevas propuestas para la aplicación de terapias antibióticas y antimicóticas que van de la mano con el avance y desarrollo de la nanotecnología, por lo tanto se ha investigado sobre diferentes métodos para la síntesis de nanopartículas de metales como la plata debido a sus propiedades antimicrobianas reconocidas desde hace varios años, por medio de diferentes alternativas como la síntesis verde, que emplea fuentes vegetales, bacterias y hongos en forma de extractos que brindan una ventaja sobre productos químicos biológicos para la síntesis de nanopartículas metálicas. (6)

Rodríguez y colaboradores en 2016 (9) evaluaron la capacidad de formación de Nanopartículas de plata a partir de extractos de la raíz de *Glycyrrhiza* y la corteza de *Amphipterygium adstringens*, demostrando además su actividad antibacterial y antifúngica, frente a *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, en donde de acuerdo a sus resultados sugieren que las Nanopartículas de plata (AgNPs) pueden controlar el crecimiento de microorganismos generadores de biofilm como *Candida albicans*.

El uso de la nanopartículas de plata es aplicado en el control de microorganismos patógenos presentes en alimentos como las frutas, algunos de estos microorganismos son *E.coli*, *S.aureus*, mohos y levaduras. Villamizar y Monroy, en 2015, (8) emplearon nanopartículas de plata (AgNPs) para el control de crecimiento de estos microorganismos en alimentos y en empaque de poliméricos donde son almacenados los mismos, evidenciando la capacidad de las nanopartículas de plata obtenidas biotecnológicamente para inhibir el crecimiento de microorganismos, coadyuvado por condiciones de temperatura bajas y desinfección previa a los alimentos.

En 2014, Jasuja y colaboradores (7) realizaron la evaluación de la inhibición de crecimiento de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y bacterias Gram negativas como *E.coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando actividad significativa en comparación con la estreptomicina. Es importante reconocer que el uso de metales puede ser perjudicial para el medio ambiente, los nanomateriales utilizados para el consumo de nanopartículas de plata (AgNPs) son las que tiene un mayor grado

de comercialización, para esto Ávalos y colaboradores (24) realizaron una investigación que muestra una visión global de las principales aplicaciones de las nanopartículas de plata (AgNPs) sus vías de exposición y sus efectos tóxicos y sugieren que para ello se requieren estudios integrales para entender mejor la toxicidad asociada con la exposición de las AgNPs.

En relación con la obtención de Nanopartículas de Plata (AgNPs) por síntesis se han probado diferentes plantas capaces de vehiculizar las Nanopartículas de Plata. En el trabajo realizado por Vibhute en 2014 (11) se evaluó la actividad antifúngica del extracto acuoso de *Moringa oleífera* y de las Nanopartículas de Plata (AgNPs) obtenidas por síntesis verde a partir de *Moringa oleífera* sobre *Candida albicans*, con el modelo de irritación de piel en conejos albinos. Este estudio demostró que al obtener una crema o ungüento con nanopartículas de plata obtenidas por la síntesis de *Moringa oleífera* se obtenía una actividad antifúngica significativa y que además, al realizar esta prueba en un animal como el conejo albino, demuestra la inocuidad de la composición empleada con el contenido de AgNPs, aunque sugieren un estudio a profundidad sobre el nivel de toxicidad de las Nanopartículas de Plata (AgNPs) en animales y humanos.

Vazquez-Muñoz *et al*, (10) evaluaron en 2013 la actividad fungicida de Nanopartículas de plata obtenidas por síntesis química frente a la solución de Nitrato de Plata a una concentración de 0.11M sobre *Candida albicans*, para así determinar una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), el estudio demostró buen efecto farmacológico, evaluado por micrografías electrónicas, evidenciando la presencia intra y extracelular de las nanopartículas de plata.

Dentro de los dispositivos médicos, ha sido evidenciada la presencia de *Candida albicans* como agente patológico de acuerdo a su capacidad de adhesión en dispositivos e implantes odontológicos. Un estudio realizado por Contreras *et al* en 2012(5) muestra una evaluación en el efecto citotóxico y la actividad inhibitoria de nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde de *Geranium maculatum* sobre *Candida albicans* presente en los materiales de impresión dental, obteniendo como resultados una importante inhibición de crecimiento fúngico. (5)

La síntesis verde sugiere la elección de plantas con alta capacidad oxidativa, que permita la unión de nitrato de plata (AgNO_3) y le permita la viabilidad y estabilidad para su acción como agente antimicrobiano y antimicótico. La capacidad oxidativa se ha evidenciado en el uso y evaluación de la toxicidad de la raíz, hojas y tallos de *Moringa oleífera*, con el fin de evaluar que parte de la planta cuenta con mayor capacidad oxidativa para lograr la estabilidad y formación de las nanopartículas de plata, además de contar con esta técnica para utilizarse como una alternativa de tratamiento generando el menor impacto a nivel sistémico en el organismo humano y hacia el ambiente (15). Permitiendo la aplicación de Nanopartículas de plata AgNPs obtenidas por síntesis verde para la inhibición de *Candida spp*, donde es evaluada la actividad fungistática o fungicida sobre cepas conocidas, evaluando así la cantidad mínima inhibitoria (MIC) de crecimiento y la visualización de la presencia de AgNPs en la pared celular que permiten comprobar la actividad de inhibición y toxicidad sobre la célula para evaluar su actividad fungistática o fungicida (3,14,15).

MARCO REFERENCIAL

1.1 *Candida albicans*

El género *Candida* es perteneciente a la familia *Saccharomycetaceae* y dentro de sus especies esta la *Candida albicans* conocida como un hongo dimórfico no térmico, capaz de producir hifas verdaderas que se pueden diferenciar de los pseudomicelios, con características microscópicas tales como la presencia de pseudohifas, hifas y blastoconidias de diferentes tamaños, de forma redonda u ovalada, con un diámetro de 4 – 6 μm , que se pueden observar en un examen directo en KOH y utilizando coloraciones como la tinción de Gram, hematoxilina eosina o PAS; en cuanto a las características macroscópicas de un cultivo se observa un crecimiento rápido (24 a 48 horas) obtenido a temperatura de 37°C, con colonias lisas, cremosas, blancas y brillantes, las colonias más antiguas muestran una estructura similar a filamentos en el margen y pueden tener surcos. Para la diferenciación de las especies del complejo *Candida albicans* de las *Candida no albicans* es posible mediante la realización de la prueba de tubo germinal o de fermentación (14,15)



Figura 1. Cultivo de *Candida albicans* agar PDA a 37 °C por 24 horas. Colonias blancas, lisas y brillantes. Foto: Vivian Liévano

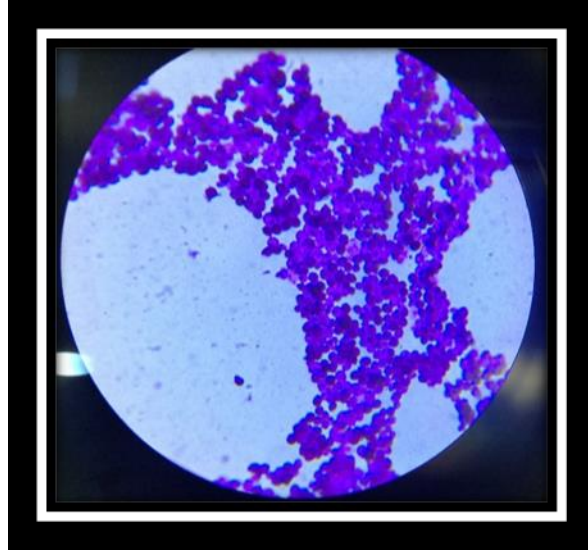


Figura 2. Coloración de Gram, Objetivo 100x, Cepa 9002 *Candida albicans*. Morfología de blastoconidias ovaladas y de tamaño aproximado 4-6 μm . Foto: Vivian Liévano

1.1.1 Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Subfilo: Saccharomycotina

Clase: Saccharomyceatales

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetaceae

Género: *Candida*

El género *Candida* incluye aproximadamente a 154 especies, entre ellas, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* y *C. dublinensis*, son frecuentemente aisladas de infecciones en humanos, siendo *C. albicans* la más relevante en términos de patogenicidad (Pfallwer y Diekema, 2007) (12,36)

1.1.2 Factores de virulencia

De acuerdo con las capacidades de transición entre las células de levadura unicelulares y las formas de crecimiento filamentosos del género *Candida albicans*, es evidente la capacidad de adaptación necesaria para su crecimiento y persistencia para lo cual ha sido sugerido que el cambio de la forma de levadura a hifa es importante para la virulencia, incluyendo entonces hallazgos como la formación de filamentos

estimulada por una temperatura de 37°C (temperatura corporal) con un pH neutro, los filamentos recién formados o tubos germinativos se adhieren mejor a la células mamíferas y le confieren la adherencia siendo requisito para la penetración tisular, también las levaduras que son capturadas por los macrófagos producen filamentos que los lisan, siendo un mecanismo de defensa, conforme a la capacidad para adaptarse rápidamente a los microambientes en el huésped y adherirse a dispositivos, se mencionaran a continuación estas características: (17,18)

1.1.3 Adherencia

Las biomoléculas de reconocimiento del huésped o adhesinas pertenecientes a la familia de genes de secuencia de tipo aglutina (ALS), que se caracterizan por la presencia de repeticiones tándem conservadas en la región central de las proteínas, algunas de estas ALS están reguladas por condiciones fisiológicas como cambios en el medio de cultivo regulada por Als1, morfología y en la fase de crecimiento se ha evidenciado la expresión de Als3 y Als8, detectadas por inmunohistoquímica en las proteínas de superficie de *Candida albicans* lo que la colonización de esta levadura a las células del tejido epitelial (17,19,37)

Otra interacción entre la célula del huésped y virulencia podría estar dada por la producción de proteinasas aspárticas secretadas (SAP) por parte de *Candida albicans*, demostrando que pueden llegar a degradar la superficie de las células del tejido del huésped y así generar infecciones que pueden diseminarse fácilmente, considerando la interacción de estas proteínas como factores que pueden llegar a afectar las respuestas del sistema inmunológico (17,37).

1.1.4 Adaptación al medio ambiente

Es importante reconocer que *Candida albicans* es capaz de adaptarse y responder ante los diversos rangos de pH que se encuentran en los diferentes tejidos en donde se ha evidenciado invasión del microorganismo, por lo tanto esta capacidad de ser capaz de sobrevivir en los diferentes pH que le ofrece un huésped, esta dada por una red conservada de genes que están regulados por un factor de transcripción de zinc

RIM101, que le permite responder al pH ambiental y así es posible una diseminación pronta en el huésped. (16, 17)

Es importante reconocer el dimorfismo del hongo como un factor de virulencia ya que gracias a su crecimiento y adaptabilidad de acuerdo a su morfología como hifa, pseudohifa o levadura, permite reconocer la capacidad de invasión de *Candida albicans* y de esta manera puede invadir diferentes tipos de tejido en un huésped que además permite adaptarse a los entornos naturales cambiantes. (16,17)

1.1.5 Formación de biofilm

La formación de biofilm se asocia con la capacidad de determinados microorganismos para formar, una matriz extracelular alrededor de una colonia celular que facilite la presencia, el contacto y la persistencia en el medio y sus nutrientes.

Para comprender el proceso de formación de biofilm y su importancia a nivel clínico y ambiental se conocen según Nobile, Mitchell (2006) los siguientes pasos Figura 3

1. Adherencia de células en forma de levadura a una superficie
2. Iniciación de proliferación celular, formando una capa basal de células ancladas.
3. Maduración, incluyendo crecimiento de hifas concomitante con la producción de material de matriz extracelular.
4. Dispersión de células en forma de levadura del Biofilm para colonizar nuevos sitios. (16,17,36)

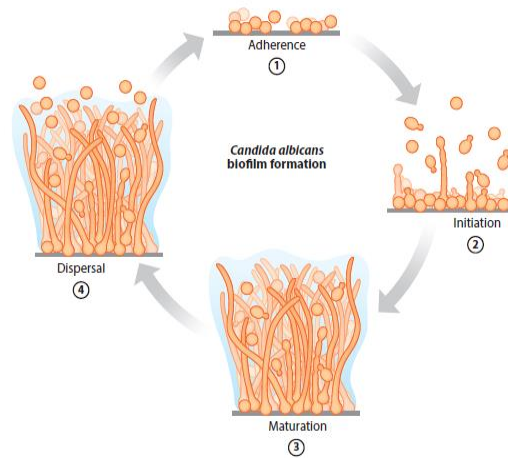


Figura 3 Tomado de :Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbio* [Internet]. 2015;69 (1):71–92. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-091014-104330>

1.2 CANDIDIASIS

Debido a la capacidad de sobrevivencia y proliferación de *Candida sp* conocida como un agente comensal o como un patógeno, su versatilidad permite la expresión de genes de acuerdo a las diferentes condiciones que permiten la adaptación ambiental, por ende se le denomina candidiasis a la enfermedad causada por *Candida spp*, de acuerdo al sitio de invasión se han aislado diferentes cepas de prevalencia intrahospitalaria según el complejo de *Candida* como lo reportan Lazo *et al* en 2018 (19): *Candida albicans*, *Candida* no albicans como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C parapsilosis*, *C.krusei*, *C. haemulonii*, *C guillermondii* y *C lusitanie*, especies con mayor incidencia generando candidiasis.

La candidemia es la infección que se establece en el torrente sanguíneo, proceso que puede diseminarse por los diferentes órganos y así generar una sepsis (candidiasis invasora) aislada de hemocultivos y cultivos de líquido peritoneal. La *Candida spp* puede ser un agente comensal aunque existen diferentes factores de riesgo que permiten que este se considere como un agente patógeno generando infección, estos factores suelen ser de acuerdo al estado inmunológico del huésped, pacientes con deficiencia inmunológica, pacientes con largas estadías hospitalarias, pacientes en

unidades de cuidado intensivo, exposiciones a largos periodos de tratamiento con antibiótico de amplio espectro, asociándose a las IAAS, pacientes con tratamiento de radioterapia o quimioterapia, tratamiento con glucocorticoides e inmunosupresores, pacientes con dispositivos de reemplazo artificial como prótesis invasivas o dispositivos médicos en general, dándose así algunos de los factores de riesgo asociados a estas patologías causadas por *Candida spp.* (4,18,39,42)

Las formas de presentación de las candidiasis más comunes en estos pacientes corresponden a la esofagitis por *Candida spp.*, candidiasis peritoneal, candidiasis ocular, endocarditis por implantación de dispositivos cardiacos, infección urinaria, candidiasis crónica diseminada o hepatoesplénica y candidiasis vulvovaginal. (16,19,39)

1.2.1 Tratamiento

Dentro de los tratamientos utilizados prevalece el uso de Anfotericina B, Fluconazol, Clotrimazol, Itraconazol, Voriconazol de los cuales se han determinado concentraciones que pueden ser hepatotóxicas debido a la resistencia adquirida de *Candida spp.* por tratamientos inadecuados de antibióticos de amplio espectro con exposiciones prolongadas y también por el uso prolongados de azoles sin justificación terapéutica. (18,20,41). Se ha reportado a nivel mundial un aumento en la resistencia a fluconazol en *C.albicans*, *C.lusitaniae*, *C.tropicalis* por el uso en forma terapéutica preventiva. Debido a la evolución en los mecanismos de resistencia antifúngica estudios indican la resistencia adquirida a azoles, inducidas por bombas de eflujo modificadas por los genes *MDR* o *CDR* y la mutación adquirida en el gen *ERG11* gen que codifica para la enzima blanco de los fármacos como voriconozal y fluconazol. (39,41)

En la actualidad se referencian estándares para la determinación de resistencia y sensibilidad antifúngica como los son *Clinical and Laboratory Satnadards Institute* CLSI Estados unidos y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibiity Testing* (EUCAST) en Europa, quienes debido a la estandarización de los fármacos utilizados como tratamiento antifúngico permite la determinación de la sensibilidad y resistencia,

de acuerdo a sus técnicas de microdilución en caldo y la medición de susceptibilidad por difusión en disco que permiten la interpretación de la susceptibilidad de *Candida spp*(41)

Grupo	Mecanismo de acción
Polienos	Altera la permeabilidad de la membrana lo que permite la pérdida de proteínas, azúcares y cationes(46)
Azoles	Presentan actividad fungistática por inhibición de la demetilación del lanosterol de la membrana citoplasmática del hongo al unirse a una enzima esterol 14 α -desmetilasa del citocromo P-450 ocasionando la acumulación de metil esteroides y la reducción de la concentración del ergosterol (componente esteroideo principal de la membrana fúngica).(46)
Alinaminas y bencilaminas	Presentan capacidad inhibitoria de la enzima escualeno epoxidasa de modo que el escualeno no se transforma en lanosterol, con la consiguiente acumulación de éste, ruptura de la membrana y muerte celular. (46)
Lipopéptidos	Inhiben la síntesis de glucanos por inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa la cual polimeriza la glucosa formando polisacáridos importantes para la estructura de la pared de los hongos. (46)
Pirimidinas	Las pirimidinas fluoradas son antimetabolitos que actúan sobre el núcleo celular convirtiéndose en 5 FU que es fosforilado e incorporado al ARN inhibiendo a la timidilato sintetasa y por tanto la síntesis proteica(46)

1.2.2 Métodos diagnósticos

Para la detección de *Candida spp* se implementan diferentes técnicas como:

- Cultivo directo de líquido peritoneal u otros fluidos, hemocultivos, utilización de coloraciones como tinción de Gram, KOH y/o lactofenol.
- PNA FISH Yeast Traffic, que utiliza sondas específicas de especies de ácido nucleico péptido (PNA) que hibridan in situ con el ADN de varias especies de

Candida, identificando especies como *C. albicans*, *C.parapsilosis*, *C.tropicalis*, *C.krusei*, teniendo una sensibilidad del 99 % y una especificidad del 98%, además de identificar

- Serología: detección y cuantificación de anticuerpos del tubo germinal en suero, detección del antígeno y anticuerpo de manano, detección y cuantificación de ácido nucleico antifúngico, sensibilidad del 84.4 % y una especificidad del 96%.
- Detección de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), real PCR o microarrays que pueden detectar Candida en sangre total o fluidos estériles.

1.2.3 Situación epidemiológica de *Candida spp*

A nivel mundial la candidemia constituye una común de morbilidad y mortalidad, varios estudios a nivel mundial han determinado la presencia de *Candida spp* como agente causante de candidiasis invasiva en donde se evidencia por ejemplo en Estados Unidos es la cuarta causa más común de ingresos hospitalario, siendo la candidiasis invasiva el 9 % de las infecciones presentes en el torrente sanguíneo, en Suiza un estudio demostró que *Candida* fue al séptima causa más común de infección intrahospitalaria,, aunque cabe resaltar que en América Latina y específicamente en Colombia hay escasa información en estudios que señalen cifras de morbilidad y mortalidad, sin embargo en los reportes generados en estudios de pacientes en unidades cuidado intensivo se ha reportado candidemia en el quinto lugar de enfermedades sistémicas por agentes asociados al cuidado de la salud.(18)

En estudios realizados durante los últimos cinco años se logra determinar la prevalencia de las diferentes especies de *Candida albicans* y no albicans capaces de generar patogenicidad dentro de las cuales se presentan: *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.krusei*; en Latinoamérica *C.albicans* se presenta con una frecuencia del 34,4%, seguida de *C.parapsilosis* con una frecuencia del 21% y *C.tropicalis* 17%.(18,42). En un estudio reciente hecho por Quindos G, 2018, permite ver un panorama mundial con respecto a la epidemiología de las micosis causadas por especies de *Candida spp*, evidenciando factores predisponentes de una infección

fúngica como los son la exposición ambiental, cirugías, catéteres, quimioterapias, hemodiálisis, alteración o supresión de la microbiota por tratamiento antimicrobiano, neutropenia y deficiencias fagocíticas. (43)

Además se consideran algunas causas por las cuales es difícil mantener un registro y control epidemiológico en cuando a micosis y candidiasis invasoras, debido a la no obligatoriedad en el reporte de los casos presentados en cualquiera de los servicios prestados por la salud, causando una deficiencia en la consulta para el control, análisis y seguimiento regional de dicha patología. Cabe resaltar la presencia de *Candida* no albicans también causantes de candidemias, con una importancia a nivel mundial, ya que la distribución geográfica y características regionales permiten la proliferación y presentación de las mismas, a continuación se muestra una imagen de la distribución mundial de candida no albicans causantes de candidemia.

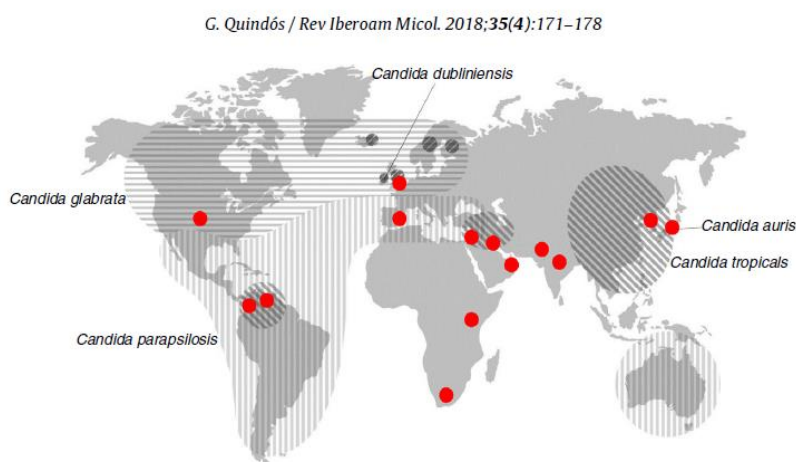


Figura 4. Tomado de Quindós G. Epidemiología de las micosis invasoras: un paisaje en continuo cambio. Rev Iberoam Micol. 2018;35(4):171-8.

1.3 Nanopartículas de plata (AgNPs)

1.3.1 Generalidades de las nanopartículas

La Nanotecnología es considerada un área con aplicación multidisciplinar aplicada en distintos escenarios, con una importancia en el área de investigación de acuerdo a sus

diferentes aplicaciones como la industria, el proceso y almacenaje de alimentos, conservación y transporte de medicamentos, biomedicina, cosméticos y salud; ya que maneja una escala nanométrica de aproximadamente 1 a 100 nm de tamaño. (8,21,22,43).

La nanotecnología aplicada de nanopartículas metálicas que tienen en su núcleo oro, zinc o plata. Las nanopartículas de plata AgNPs, han generado interés por investigadores, debido a sus propiedades en cuanto a estabilidad química, conductividad, efecto catalizador y sus efectos sobre microorganismos bacterianos y fúngicos, siendo un motivo de interés en el área de la investigación para el control de enfermedades infecciosas. (6)

Es importante reconocer que durante siglos se ha empleado el nitrato de plata como tratamiento para úlceras, quemaduras, encontrando también una importante actividad antimicrobiana, en el siglo XVII Y XVIII se empleó el nitrato de plata como tratamiento para las úlceras, por lo tanto sigue siendo objeto de estudio para determinar el funcionamiento del uso como agente antimicrobiano buscando nuevas alternativas de reducción del nitrato de plata, que incluyen el uso de microondas, electrolisis de sales de plata, fotoreducción de iones de Ag + y síntesis fotoquímica (6,21).

1.3.2. Síntesis de Nanopartículas de Plata

Actualmente, se han informado muchos métodos para la síntesis de AgNPs mediante el uso de rutas químicas, físicas, fotoquímicas y biológicas. Cada método tiene ventajas y desventajas, siendo los problemas comunes los costos, el tamaño de las partículas y la disposición para la síntesis y aplicación de la misma. (21,23).

En general, hay dos enfoques que están involucrados en la síntesis de nanopartículas y nanomateriales dado por dos procesos de fabricación: descendientes o ascendentes. La división de material macroscópico o materiales sólidos en grupo hasta llegar al tamaño nanométrico es dado por la técnica "*Top down*" utilizada por ejemplo en molienda, trituración, pulverización y ablación térmica/láser; por lo tanto la técnica ascendente conocida como "*Bottom to up*", consiste en la fabricación de nanopartículas con capacidad de autoensamble o autorregulación a través de la

condensación de los átomos o entidades moleculares, las nanopartículas se pueden sintetizar gracias a la reducción de iones en el caso del ión plata desde su estado de oxidación a su estado elemental, lo que desencadena procesos de nucleación o agregación(6,44)

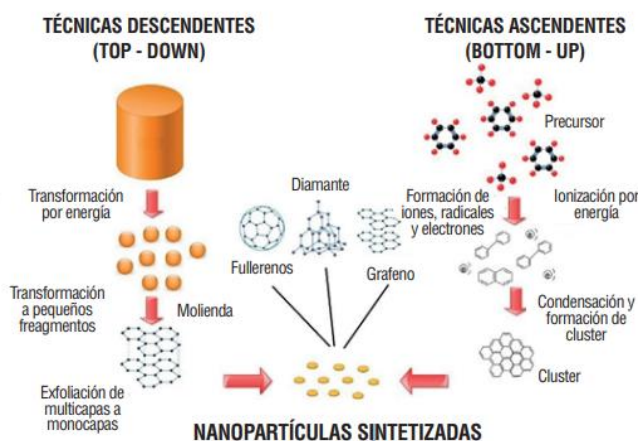


Figura 5. Tomado de :Nobile CJ, Johnson AD. Candida albicans Biofilms and Human Disease. Annu Rev Microbio [Internet]. 2015;69 (1):71–92. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-091014-104330>

1.3.3 Síntesis Física

Las nanopartículas metálicas pueden sintetizarse generalmente por evaporación y condensación, utiliza las energías físicas como la energía térmica, potencia de CA y arco eléctrico, para producir Nanopartículas de plata (AgNPs) con una distribución de tamaño casi estrecha. Lo que podría llevarse a cabo utilizando un horno tubular a presión atmosférica. Sin embargo, en el caso de usar un horno tubular a presión atmosférica existen varios inconvenientes tales como un gran espacio de horno tubular, gran energía de consumo para elevar la temperatura ambiental alrededor del material fuente y mucho tiempo para lograr la estabilidad térmica. El enfoque físico puede permitir la producción de grandes cantidades de muestras de Nanopartículas de Plata en un solo proceso. Sin embargo, se deben considerar los costos para la inversión en la síntesis. Es importante reconocer que el diámetro de las nanopartículas obtenidas

por este medio puede oscilar entre 6.2 – 21.5 nm y 1.23 – 1.88 nm , puede reconocerse para la interacción con la célula a combatir (23).

1.3.4 Síntesis Verde o Química Verde

La química verde es una técnica alternativa de bioproducción de material nanoparticulado junto con material metálico como oro, plata, hierro y óxidos metálicos, el cual consiste en el diseño de procesos para reducir o eliminar el uso y la generación de sustancias peligrosas para el ambiente, basándose en la reducción de metales con especies con capacidad antioxidante. Las nanopartículas metálicas se sintetizan comúnmente por métodos químicos y físicos tradicionales. Sin embargo, los problemas de sostenibilidad actuales han llevado a exploraciones de síntesis ecológica y síntesis verde, donde los agentes reductores químicos se eliminan y las entidades biológicas se utilizan para convertir los iones de plata en nanopartículas de plata, requiere el uso de agua como un solvente ambientalmente amigable, destacando el hecho de que el agua es más biocompatible que los solventes orgánicos (8,21,44).

Todas las partes de una planta como las hojas, frutos, raíces, semillas y tallos, son capaces de reducir los iones inorgánicos formando nanopartículas dando así una aplicación importante en el proceso de síntesis, reemplazando productos químicos potencialmente peligrosos como el borohidruro de sodio (NaBH_4). El uso de extractos de plantas permite sintetizar nanopartículas rápidamente por la presencia los antioxidantes que actúan como agentes reductores y como agentes de protección. En el estudio de Hebbalalu et al. (6,25) se describe el uso simple de vitaminas como la vitamina B2, 66 B1 y 67 C, pueden generar nanopartículas en medio acuoso y a temperatura ambiente, Adicionalmente, menciona que las proteínas con grupos amino reducen los iones de plata y actúan como control durante la síntesis, pues después de interactuar con los iones de plata, se encontró que la estructura secundaria de la proteína estaba alterada (29).

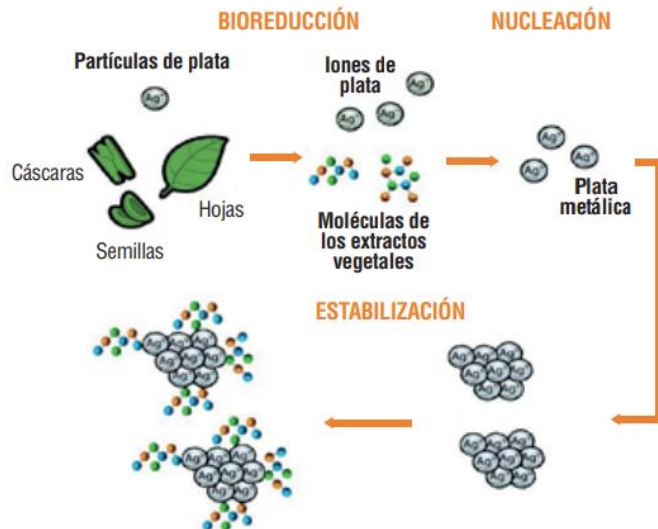


Figura 6. Esquema de la síntesis verde de nanopartículas de plata usando extractos de plantas como agentes reductores

Park en su estudio describe las ventajas de la síntesis verde sobre los métodos químicos (24).

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

1.3.5 Caracterización de nanopartículas

La formación de AgNPs se caracteriza generalmente con métodos espectroscópicos y microscópicos, que incluyen espectrofotometría UV-visible, espectroscopía infrarroja de

transformada de Fourier (FT-IR), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de fuerza atómica (AFM) , Difracción de rayos X (XRD) y mediciones del potencial zeta, en donde es posible evidenciar formas como esferas, cubos, esferoides, barras, entre otros, siendo la forma esférica ideal para la interacción con la células, evidenciando que el tamaño ideal para su acción se encuentra en un tamaño aprox. 50 a 70nm lo que caracteriza la viabilidad de las nanopartículas. (24,43,45).

1.3.6 Actividad antimicótica de las nanopartículas de plata

Castrillón en 2016, reconoce el mecanismo de acción antimicótico de las nanopartículas debido a la unión en la membrana de un hongo para modificar la permeabilidad y así alterar la viabilidad celular, también puede penetrar y modificar la capacidad respiratoria, deteniendo la división celular ocasionando la muerte celular. Además se ha reportado que las AgNPs pueden liberar iones de plata que interactúan con los grupos tiol de enzimas inactivándolas o bien generando radicales libres. (45)

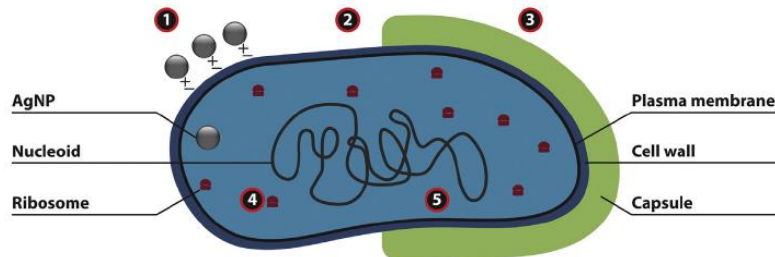


Figura 7. Mecanismo de acción sobre el microorganismo de las nanopartículas de plata. 1. Atracción electrostática. 2. Producción de radicales libres, cambios en la permeabilidad., alteración de la respiración, fuga de contenido intracelular. 3. Modulación de los perfiles de fosfotirosina de las proteínas, implicada en la progresión del ciclo celular y en la síntesis de polisacáridos capsulares. 4 .Inhibición de la síntesis y función de proteínas. 5. Interacción con moléculas que contiene fósforo. Tomado de: Durán N *et al.* Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine: Nanotechnology, biology and medicine.* 2015- 11 (58)

1.4 *Moringa Oleífera*

La *Moringa oleífera* es un árbol o arbusto perennifolio de crecimiento rápido, también llamado el árbol de la vida, con copas abiertas y follaje pináceo que forma parte de la familia de las *Moringaceae* junto a otras 12 variedades típicas de los climas áridos del trópico (26), Crece fácilmente por reproducción asexual por estacas aun en condiciones de sequía y puede alcanzar hasta los cuatro metros de alto en un año bajo pobres atenciones hortícolas (26).

Se presenta como una planta con un alto potencial biotecnológico debido a su composición química y por lo tanto con importantes aplicaciones en el estudio de la nutrición infantil, en su uso como biofortificante y en su aplicación como factor fungitóxico (27). Varios ensayos clínicos realizados en los últimos años demuestran las propiedades medicinales de la moringa como antioxidante, en las enfermedades respiratorias, cardiovasculares, gastrointestinales, endocrinas, en el sistema nervioso central, en el sistema inmunológico (31).

Moringa oleífera evidencia estudios fitoquímicos, demuestran la presencia de un alto contenido de vitaminas (A, B1, B2, B3, y C), minerales (calcio, cromo, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio y zinc), aminoácidos esenciales (metionina, arginina, triptófano, fenilalanina, isoleucina, leucina, histidina, lisina, cisteína, prolina, valina y tirosina), antioxidantes (alfa y beta carotenos, quercetina, ácido clorogénico, beta-sisterol, zeatina vitamina C y E), carbohidratos, ácidos grasos omega, moringina, moringinina y fitoestrogenos (9), estos compuestos han sido reconocidos en el análisis por tamizaje fitoquímico mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (31).



Figura 8. Partes de planta. Tomado de Alonso T, Verde L, Calgary) D (University of. Ensayo de elicitación de suspensiones celulares utilizando como elicitador un extracto de hojas de *Moringa oleifera*. Fin Grado. 2014;32

Las hojas de *Moringa* tienen un alto contenido en antioxidantes naturales, tales como vitamina C, tocoferoles (familia de vitamina E), flavonoides y compuestos fenólicos como ácido gálico, quercetina y kaempferol. Los compuestos fenólicos son esenciales en la dieta humana y poseen un interés considerable debido a sus propiedades antioxidantes. (28,29)

Un antioxidante es cualquier sustancia que en presencia de un sustrato oxidable retrasa o inhibe la formación del mismo. Se caracterizan por ser muy heterogéneos, pueden ser hidrosolubles y liposolubles, localizarse intra o extracelularmente y procede de diferentes fuentes ya que algunos son nutrientes o proceden de estos y otros son productos del metabolismo (32).

Dado sus múltiples beneficios sobre la salud y de intereses económicos, se destaca el poder antioxidante de acuerdo a la capacidad de absorción de radicales de oxígeno-ORAC, la *moringa* alcanza un valor que oscila entre 50.000 unidades por cada 100 gr, aprovechándose como protector de células frente a los radicales libres y también es importante ya que es un floculante natural útil en métodos de química verde. (32)

La *Moringa* en su metabolismo normal y bajo condiciones de estrés puede liberar especies reactivas de oxígeno (ROS) como pueden ser los radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical superóxido (O_2^-). Esto influye en la cantidad de compuestos fenólicos expresados, sin embargo, los fenoles presentes en los extractos de *Moringa* son buenos donadores de electrones y pueden terminar la reacción en cadena de los radicales convirtiendo radicales libres en productos estables (29,48)

Los compuestos fenólicos o polifenoles incluyen un amplio rango de sustancias vegetales que poseen un anillo aromático que contiene uno o más sustituyentes hidroxilo. Algunos son solubles en agua ya que se encuentran combinados con azúcares en forma de glucósidos, y normalmente están localizados en la vacuola. (48,49)

2. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1 Tipo de investigación

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

2.2 Variables

NOMBRE DE LA VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DESCRIPCION
Solución de prueba	Independiente	<p>Solución A =solución acuosa de <i>Moringa oleífera</i></p> <p>Solución B= nanopartículas de plata obtenidas de la solución acuosa de <i>Moringa oleífera</i>.</p>

Tiempo de incubación	Independiente	Tiempo transcurrido entre las 0 y las 72 horas cada 12 horas del contacto entre las soluciones de prueba y el microorganismo <i>Candida albicans</i> . Categorías: a) 0 y 12 horas b) 13 y 24 horas c) 25 y 36 horas d) 37 y 48 horas e) 49 y 60 horas f) 61 y 72 horas
• Volumen de la solución	Independiente	Volumen de la solución en relación v/v al 100% -75% - 50% -25% (10,11)

Nombre de la variable	Tipo de Variable	Técnica 1	Técnica 2
Inhibición del crecimiento	Dependiente	Técnica difusión en agar con medición del halo de inhibición sobre sensidiscos impregnados con el Extracto A y Extracto B	Valoración de curva de crecimiento mediante el equipo Bioscreen C100, para determinar el crecimiento en diferentes

		(10,11)	concentraciones de la solución A y B
--	--	---------	--------------------------------------

2.3 Técnicas y procedimientos

2.3.1 Muestra

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

2.3.2 Técnicas y procedimientos

2.3.2.1 Recolección de *Moringa oleífera*

Se adquirió en un establecimiento comercial *Moringa oleífera* en hojas secas, las cuales fueron lavadas con agua destilada para eliminar el exceso de posibles contaminante y fueron expuestas para su secado por 24 horas.

2.3.2.2. Preparación del extracto acuoso de *Moringa oleífera*

Para llevar a cabo la preparación del extracto acuoso, se utilizaron 100 ml de agua destilada con 10 gr de las hojas de *Moringa oleífera* previamente secadas, esto se llevó a una temperatura de 60 °C controlados por termómetro para el control continuo de la temperatura durante 10 minutos, luego de esta preparación se filtró con papel Whatman # 1 para obtener el extracto acuoso. Este extracto fue alicuotado y

almacenado en nevera de 4°C para su posterior uso.



Figura 9.

Izquierda, hojas del vegetal con agua destilada, control de temperatura de 60°C. Derecha Filtración de material vegetal para obtención de solución acuosa. Foto Vivian Liévano

2.3.3. Síntesis Nanopartículas de plata AgNPs

Para la preparación de nanopartículas de plata AgNPs: fueron dispensados 9 ml de AgNO₃ 0,1M y 1ml del extracto de *Moringa oleífera* previamente preparado.

- (9 ml AgNO₃ 0,1M D de extracto 10:100 de hojas de *Moringa Oleífera*)
- Se observó el fenómeno de resonancia de plasmón mediante la valoración del cambio colorimétrico.

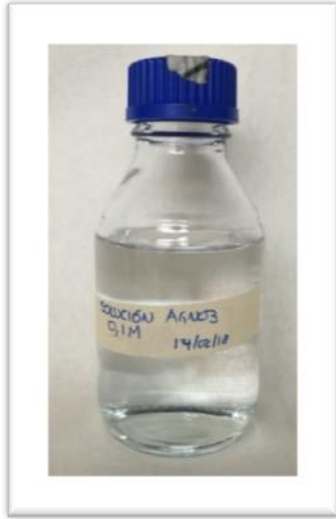


Figura 10. Nitrato de plata 0,1M



Figura 11. Extracto de Hoja *Moringa oleifera*



Figura 12. Cambio colorimétrico de la solución (AgNO_3 + Extracto de *Moringa Oleifera*) (Fenómeno de resonancia de Plasmones)

2.3.4 Preparación medio de cultivo y estandarización de discos

Se preparó Agar PDA (potato dextrosa agar) según inserto y fue dispensado en cajas de Petri.

De acuerdo a la metodología propuesta por N Vinnetha *et al* (2015)(34), en el método de difusión en disco, fueron impregnados los discos previamente estériles con 20uL de

las soluciones (nitrato de plata y extracto de moringa oleífera) en diferente proporción de volumen a un porcentaje del 25, 50, 75 y 100 por ciento, se dejaron secar por 24 horas en horno secador. Se preparó el inóculo de la levadura en solución salina hasta obtener una turbidez equivalente a 0.5 en la escala Mcfarland.

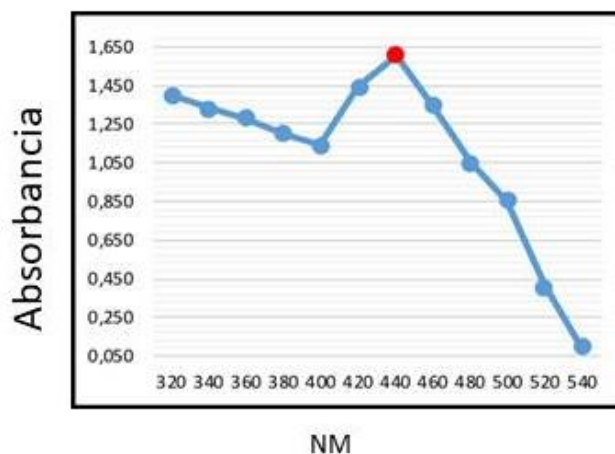
Para la determinación de la sensibilidad o resistencia de *Candida albicans* 10231, se realizó un control positivo (siembra de Cepa *Candida albicans*) y un control negativo en agar PDA; de acuerdo a la técnica Kirby Bauer se realizó una siembra masiva de la levadura en el agar PDA y luego fueron dispensados los discos con las concentraciones v/v a evaluar (Extracto de Moringa, Nitrato de plata, AgNPs al 100,75,50,25), se llevaron a incubación a temperatura 35 °C.

3. RESULTADOS

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

Por medio de la Espectrofotometría de Luz-UV se realizó la medición de absorbancias de la solución de nanopartículas de plata, en un rango de 320 a 540nm, para comprobar de acuerdo a lo sugerido por Avalos en 2013, que la excitación del ion de plata se logra entre 420 y 440nm. En el **gráfico 1** se observa el pico más alto en el rango de absorción UV-visible a 440nm que demuestra la correlación del cambio colorimétrico de la solución y la formación de Nanopartículas de plata de tamaño adecuado.

Gráfico 1 Absorbancias de la solución de nanopartículas de plata AgNPs obtenidas a partir del extracto de *Moringa oleífera*



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

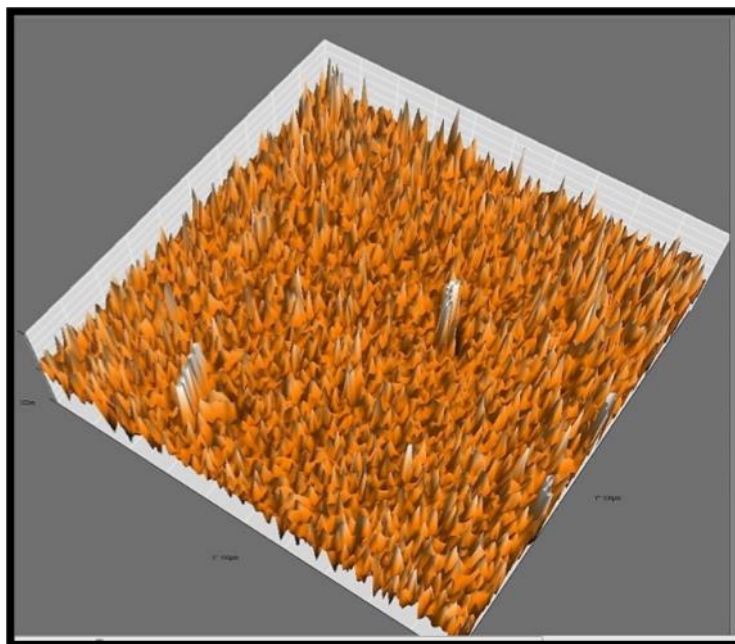
Para la identificación se realizó un previo montaje de las Nanopartículas en el sustrato Mica-Au y se dejó secar la solución a temperatura ambiente dos días, con el fin de cumplir con las condiciones del equipo con respecto a la muestra analizar. El método utilizado para dicha técnica fue el de contacto por el tipo de material analizado, y la punta empleada fue CONTR con una constante de resorte de 20,00 N/m, imagen de 256 líneas de resolución cada 0.8 segundos, una fuerza inicial de 20 Nn, y las fuerzas complementarias correspondieron a P-Gain de 1200 e I-Gain de 1000. El análisis consistió en recorrer y estudiar las características morfológicas esperadas (nanoesferas) del menor tamaño posible de una escala de 100 μm a una mínima de 7,8 μm .

En las siguientes imágenes se logra caracterizar la morfología, tamaño y dispersión de las nanopartículas de plata. En la figura 13 se evidencia un plano topográfico en 3D 100 μm y un mapa de color en escala 27,8 μm , de las nanopartículas de plata con distribución homogénea en el campo, tamaño relativamente similar y aparente tamaño esférico. En la Figura 14 se muestra un plano topográfico en 3D y mapa de color de acercamiento a una escala de 7.8 μm evidenciando nanopartículas de Ag poli

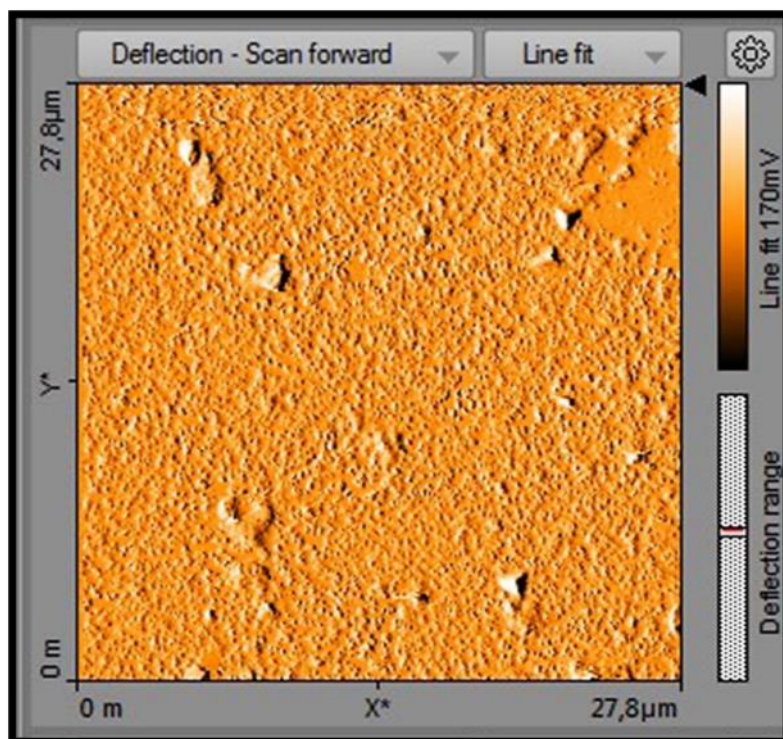
dispersas, tamaño aprox. 50 a 70nm y forma esférica, lo que caracteriza la viabilidad de las nanopartículas.

Figura 13. Visualización microscopia AFM de Nanopartículas de plata. A) Topografía 3D a escala 100 μm B) Mapa de color y (C) Topografía 3D a escala 27.8 μm

A)



B)



C)

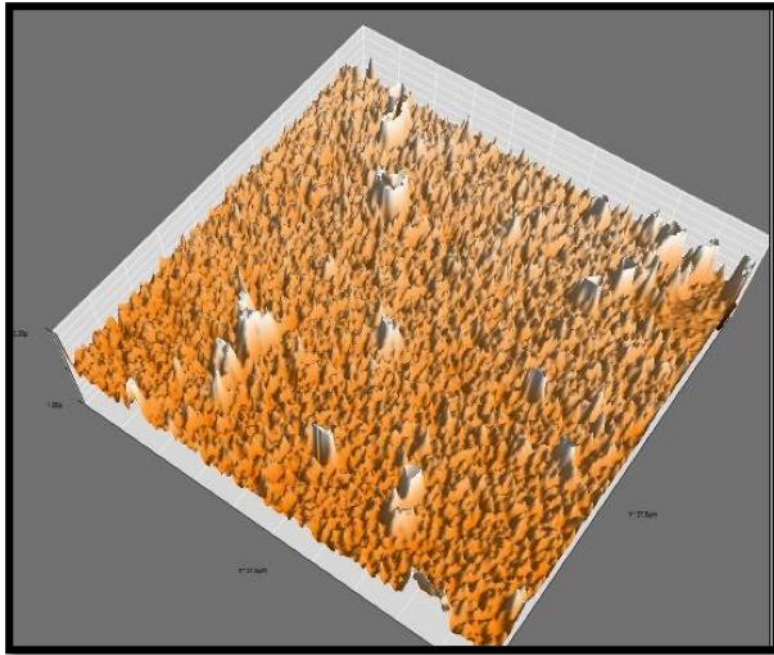
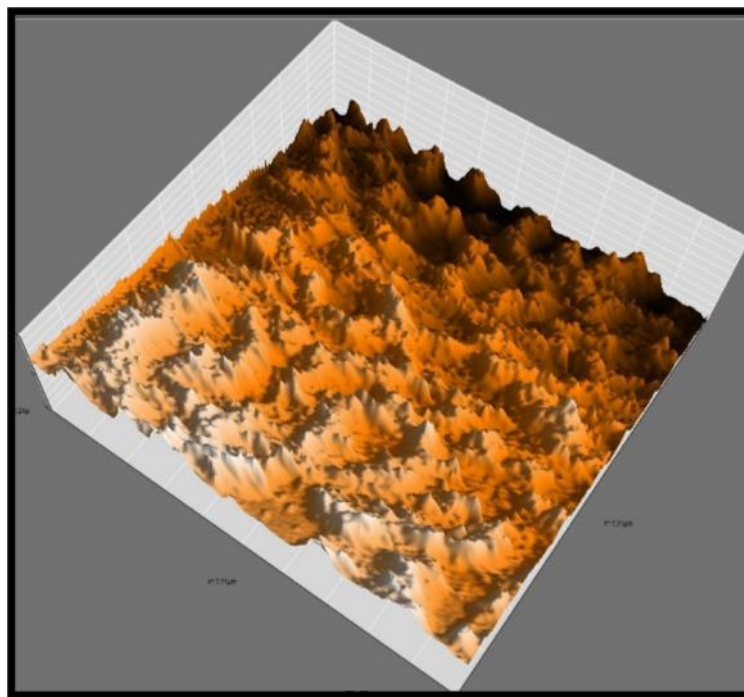
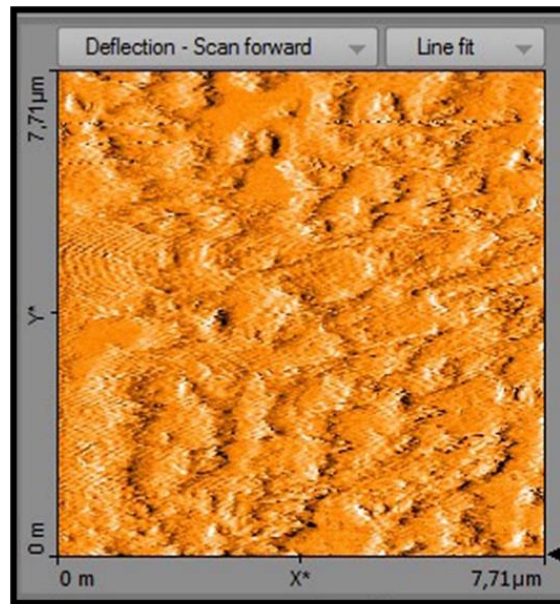


Figura 14. Visualización microscopía AFM de Nanopartículas de plata. A) Topografía 3D y B) Mapa de color Escala 7,8 μm

A)



B)



3.3. Valoración de sensibilidad a las nanopartículas por medio del equipo Bioscreen C10

Para la evaluación de curva de crecimiento se prepararon 250 ml de caldo Luria Bertani según inserto; luego se realizó un inoculo de colonias de cepa ATCC 10231 de *Candida albicans* cepa ATCC 10231 en 5ml de caldo anteriormente preparado. Se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 625 nm hasta alcanzar una absorbancia de 0.45 a 0.55 equivalente a 10000 cel/ml, indicando así el inoculo adecuado como punto de partida para la lectura posterior de curva de crecimiento.

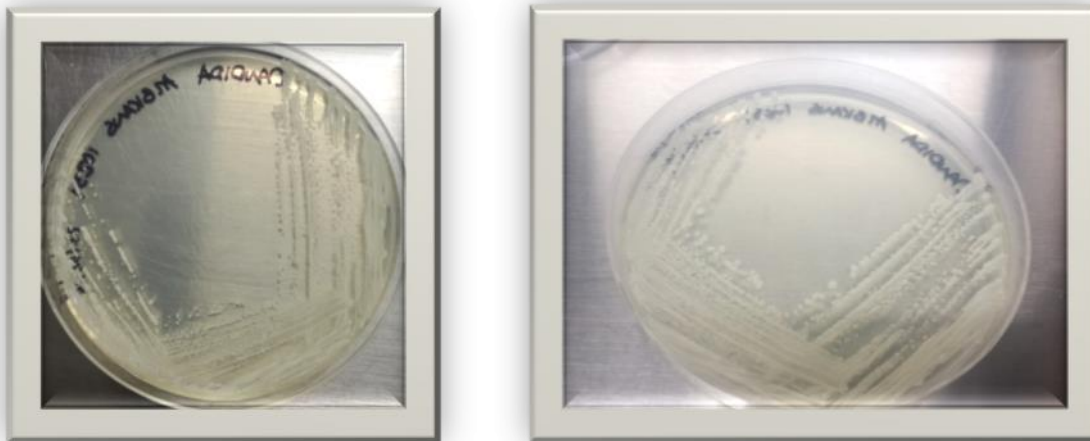
Equipo BioScreen C100 suministrado por la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, semillero REMA.

A) Montaje de la placa análisis tablas de vida

Montaje por triplicado en equipo de densidades ópticas Bioscreen C100 con lecturas a 600 nm cada hora por un tiempo total de 48 horas con agitación constante.

	Volumen de Nanopartículas de Plata (AgNps)	Volumen Medio Luria Bertani	Volumen del inóculo
Control de crecimiento		270uL	30uL
Solución # 1 100%	270uL		30uL
Solución # 2 75%	202,5	67,5	30uL
Solución # 3 50 %	135uL	135uL	30uL
Solución # 4 25%	67,5uL	202,5uL	30uL
Solucion # 5 Extracto Moringa	Extracto de Moringa 270 UL		30 uL

3.4. Medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA)



Se observa cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231 evidenciando colonias blancas lisas y brillantes.

Para la evaluación de la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* cepa ATCC 10231, se evaluó frente a un control positivo Fluconazol, para así obtener un punto de comparación en evaluación de la inhibición de crecimiento.

Figura 15. Evaluación inhibición de crecimiento con discos impregnados con Nitrato de Plata AgNO_3 . No se evidencia inhibición de crecimiento alrededor del disco.

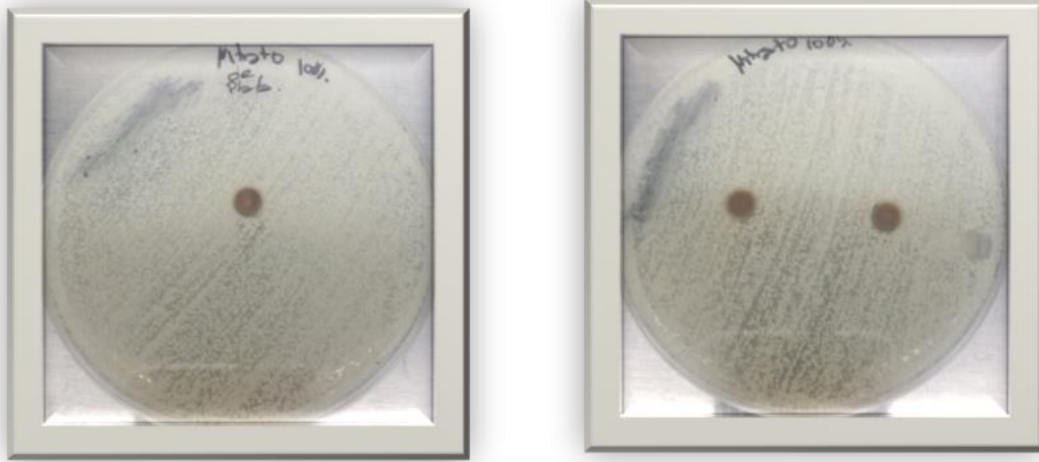


Figura 16. Evaluación inhibición de crecimiento con discos impregnados con Extracto de Moringa. No se observa halo de inhibición significativo.



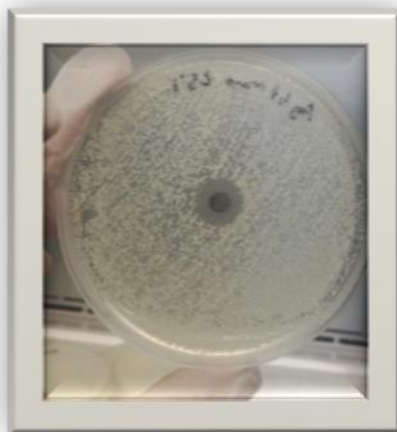
Figura 17. Evaluación inhibición de crecimiento con discos impregnados con Nanopartículas a una proporción de volumen del 75 %. Se evidencia un halo de inhibición de 12 mm.



Figura 18. Evaluación inhibición de crecimiento con discos impregnados con Nanopartículas a una proporción de volumen al 50 %. Se evidencia un halo inhibición de 14mm



Figura 19. Evaluación inhibición de crecimiento con discos impregnados con Nanopartículas a una proporción de volumen al 25 %. Se evidencia un halo inhibición de 14mm.



	Halo de inhibición 24 horas	Halo de inhibición 48 horas
Control (+) Fluconazol 20 μ l	32mm	33mm
Control negativo (-) Agua destiada 20 μ l	6mm	6mm
Solución #1	6mm	6mm
Solución# 2	12mm	12mm
Solución #3	14mm	14mm
Solución #4	14mm	14mm

Solución #1 (Extracto de Moringa) Solución #2 Nanopartículas de plata Solución proporción a 75% #3 Solución #3 proporción equivalente a 50% Solución #4 proporción equivalente a 25%. Hecho por Vivian Liévano

De acuerdo a lo evidenciado en las distintas investigaciones donde se busca comprobar la efectividad en cuanto a la oxidación y reducción de extracto de plata y generación de nanopartículas, que sean capaces de bloquear las señales de las células: reportan que la técnica convencional de difusión en agar permite el reconocimiento de inhibición (45, 46, 48)

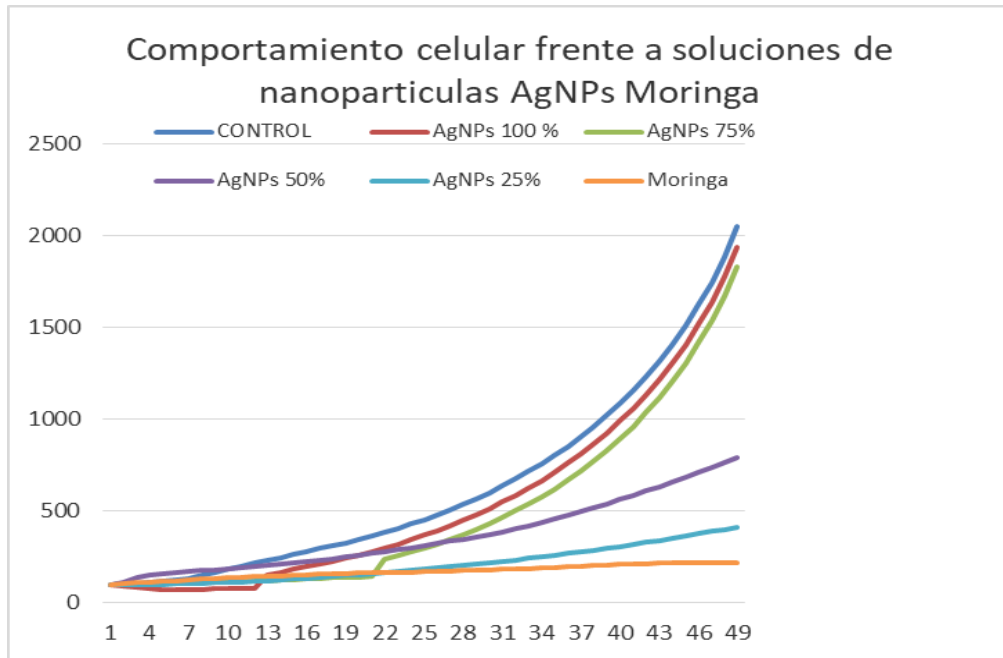
3.5. Ensayo de curva de crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231

Adicionalmente se realizó la evaluación del crecimiento de las células de *Candida albicans* frente a Nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde, mediante el uso del equipo Bioscreen C100. El ensayo utilizó un protocolo de mediciones por triplicado, con un control de crecimiento normal de *Candida albicans* ATCC 10231, se utilizó un volumen inicial de células suspendido en caldo LB en comparación de 0.5 en la escala Macfarland.

Después de 48 horas de evaluación en el equipo, el control obtuvo un valor máximo del número de células por cada concentración de:

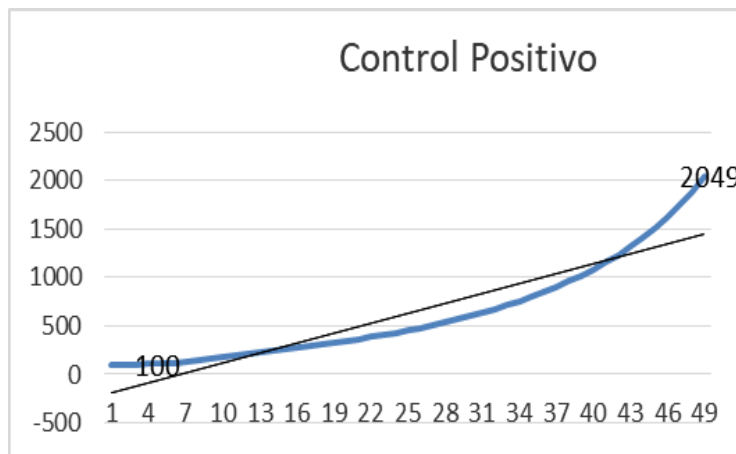
Concentración	Número de células
Control <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	2049
AgNPs 100%	1936
AgNPs 75%	762
AgNPs 50%	401

En la **gráfica 2** se observa el comportamiento de las células frente al control y la solución de moringa.

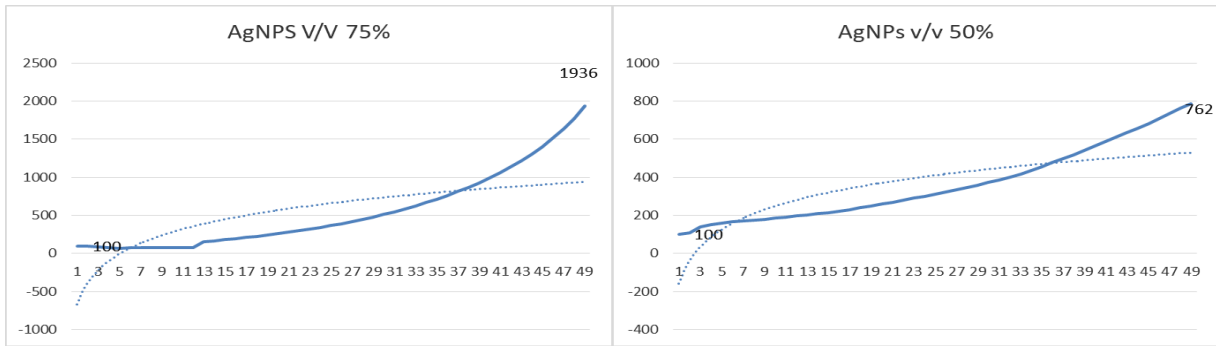


Gráfica 2.

Para evidenciar mejor el comportamiento frente a la tendencia logaritmica de los resultados en el ensayo, se elaboraron las siguientes graficas (gráficas 3, 4, 5 y 6). En general se aprecia que al igual que en el control (Gráfica 3) la tendencia al final del ensayo es a continuar el crecimiento aunque se presente un número menor de células que el inicial, esto sugiere un efecto fungistatico al final del ensayo.

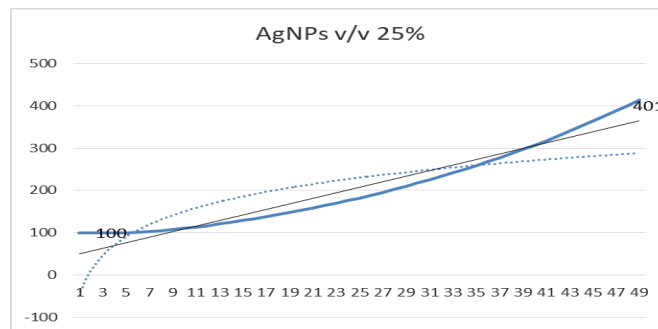


Gráfica 3



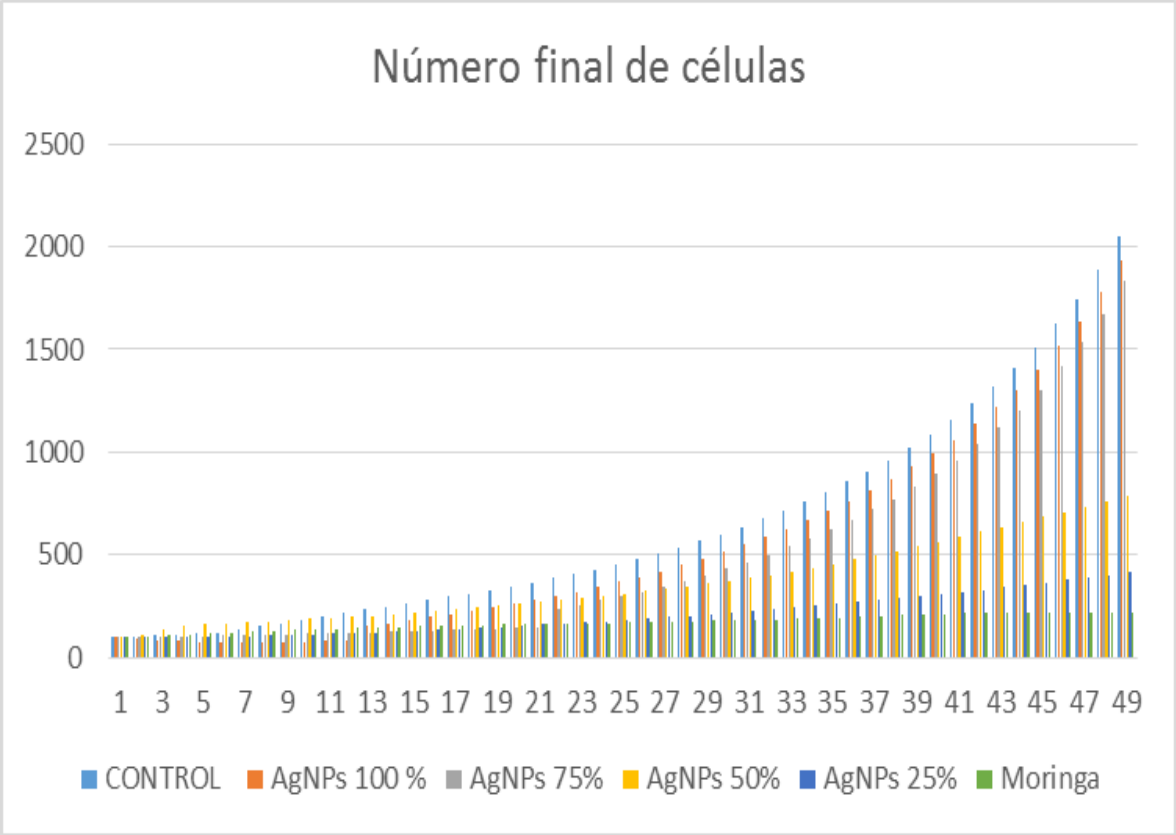
Gráfica 4.

Gráfica 5.



Gráfica 6.

Teniendo en cuenta la tendencia logarítmica, se realizó un análisis de expectativa de viabilidad mediante la aplicación de fórmulas en una tabla de vida de esta manera se puede calcular el número de células al final del ensayo manifestando variables asociadas al índice de mortalidad, el promedio de vida en el intervalo de tiempo y la expectativa de vida. En donde se logró evidenciar la tendencia de la continuidad de crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231, observado en el análisis del número inicial (100 células) y el número final de células al final del ensayo en 48 horas de control.



4. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* cepa ATCC 10231 con nanopartículas de plata (AgNPs) obtenidas por síntesis verde a partir de *Moringa oleífera*.

Muchos investigadores han centrado sus estudios en la modificación de las estrategias para la síntesis de Nanopartículas, evidenciando la síntesis verde como un objetivo amigable con el ambiente, así que la aplicación de Nanopartículas de plata extraídas por síntesis verde es una estrategia que supera los métodos convencionales sobre la síntesis de nanopartículas evidenciadas como la síntesis química y física, permitiendo así la aplicación de esta técnica en el uso de la inhibición en el crecimiento de microorganismos.(51)

Shakeel *et al* en 2016, realizaron un estudio en donde se utilizaron diferentes especies y partes de plantas, con el fin de evaluar su capacidad antioxidante, mostrando que el uso de la hoja de plantas como *Aloe vera*, *Allium sativum*, *Moringa oleífera*, entre otras, tienen una actividad antioxidante significativa, permitiendo la formación de nanopartículas, por su actuación frente a los radicales libres. Compuestos como fenoles y flavonoides presentes en las hojas demostraron una mayor capacidad antioxidante detectada por la técnica donde se evalúa la capacidad captadora radical de ABTS, FRAP y DPPH, comparado con los alcaloides y mucilagos presentes en el tallo y raíz en menor concentración, permitiendo la formación y estabilidad de las nanopartículas de plata en mayor medida (47, 48, 50).

Echavarria, *et al* en 2016, evaluaron los metabolitos secundarios detectados en los extractos alcohólicos de plantas medicinales y demostraron en ellas la presencia de flavonoides, flavonoles, antocianinas, polifenoles, alcaloides y taninos. Entre estas, se demostró mediante análisis fitoquímico que el uso de extracto de *Moringa* spp. posee una gran capacidad antioxidante lo que permite el retraso o prevención de la formación de radicales libres, evaluado en la capacidad de captación de DPPH (1,1 –difencil-2-pricidazil). Por lo tanto la capacidad de inhibición de crecimiento de microorganismos,

permite reconocer que el contenido de sus compuestos, hace que estas características permitan el uso de sus componentes como un estabilizante para su amplia utilización ya que permiten la formación de estrategias con actividad antimicrobiana y antifúngica, poniendo en práctica la aplicación de nanopartículas de plata AgNPs extraídas por síntesis verde a través de *Moringa oleífera*. (47,48,50).

Estudios preliminares han demostrado que *Candida albicans* frente a extractos de diferentes plantas como hoja de *Mentha spicata*, flor de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla), hoja de *Solanum nigrum* (Hierba mora), *Thymus vulgaris* y *Moringa oleífera* ha presentado una inhibición a concentraciones hidroalcohólicas con un halo de inhibición como en el caso de *Matricaria chamomilla*, donde resta un halo >10mm y de *Thymus vulgaris* con una halo de inhibición 15,5 y 0.93 (52,53,54) resultados similares a los obtenidos con este estudio en donde se evidencia un halo de inhibición de 14 mm, para la inhibición de crecimiento de *Candida albicans* con una solución de nanopartículas de plata obtenidas por síntesis de *Moringa oleífera* ; la técnica utilizada para estos estudios han demostrado que en algunas concentraciones existe una inhibición que sugiere una acción fungistática de acuerdo a la comparación con los controles de inhibición de los fármacos más utilizados como Fluconazol y Nistatina , que generan un espectro más amplio de inhibición

Para evidenciar la oxidación-reducción en la formación de nanopartículas por síntesis verde a partir de *Moringa oleífera* , se presencia un cambio colorimétrico en la sustancia a color marrón debido al fenómeno de resonancia de plasmones, indicando la formación de la suspensión coloidal de las partículas, a través del espectrofotómetro, se confirma la excitación del ion plata en una longitud de onda de 450nm, las técnicas de caracterización de las Nanopartículas de plata que frecuentemente se utilizan son la técnica para nanopartículas secas en el escáner de microscopía electrónica SEM, análisis de rayos X de dispersión de energía (EDX), para las muestras reconstituidas transmisión microscópica electrónica (TEM) y Microscopía de fuerza atómica, las cuales evidencian la formación de nano esferas que caracterizan la viabilidad de las nanopartículas. (50,56)

La aplicación de la técnica de concentración en la solución de nanopartículas de plata AgNPs dispuestas en discos para el análisis por medio de difusión en agar, con seguimiento a las 24 y 48 horas de incubación, se evidenció un halo de inhibición de 14 mm de diámetro en una concentración de la solución de nanopartículas de plata a partir de *Moringa oleífera* en una proporción de volumen al 50% y 25%, que corresponde a una media con respecto al control de Fluconazol el cual según el documento M27 y M47- CLSI (38,41), esta estandarizado en un halo de inhibición de 28 a 39 mm, se evidencia además que los discos impregnados con extracto de Moringa no generaron inhibición ampliamente visible, lo que permite reconocer que la actividad de inhibición sobre *Candida albicans* por parte de la aplicación del extracto solo de *Moringa oleífera* no le permite evidenciar una alta capacidad de inhibición significativa para este estudio.

Esta técnica ha sido evaluada en estudios antifúngicos donde buscan la Concentración Mínima Inhibitoria utilizando extractos hidroalcohólicos y extractos con Nanopartículas de plata, permitiendo así conocer la concentración a la cual se inhibe el crecimiento de *Candida albicans* (50), pero las diferentes concentraciones del extracto y sus aplicaciones en diferentes soluciones obedecen al funcionamiento de las mismas de acuerdo a su capacidad antioxidante y sus metabolitos secundarios residuales presentes en el resto de la solución la cual indica la estabilidad y la actividad inhibitoria debido a la interacción de los radicales libres del elemento plata y los flavonoides del extracto de *Moringa oleífera*, como en el estudio hecho por Jarrin J, en 2018 en donde evaluó la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de hojas *Moringa oleífera* evaluando los halos de inhibición comparados con el control Nistatina, en donde la concentración al 100% de extracto hidroalcohólico presenta un halo de inhibición de 23mm frente a halo de inhibición de Nistatina que fue de 31.5mm, por lo cual le llevó a demostrar la actividad antifúngica del extracto frente al crecimiento de *Candida albicans*.

A partir de esto es importante destacar que las soluciones propuestas disminuyen el número de células independientemente de su concentración sin embargo las inhibiciones más relevantes se encuentran en los volúmenes 25, 50 y 75. No se evidenció inhibición en la difusión en disco, pero en el ensayo de la curva de

crecimiento se evidenció una cantidad de células presentes al final que muestra diferencias aparentemente significativas entre las soluciones dada en diferente cantidad en comparación con las demás concentraciones.

De acuerdo a las técnicas ya aplicadas en el presente estudio se realizó un ensayo de curva de crecimiento sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231 frente a Nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde, con el propósito de lograr evidenciar mejor el comportamiento celular frente a diferentes concentraciones volumétricas aplicadas de igual manera que en el ensayo de difusión en disco, para así correlacionar los resultados obtenidos en las dos técnicas. Esto permitió evidenciar que la inhibición de crecimiento de la cepa ATCC 10231 de *Candida albicans* también es dada frente al extracto de Moringa oleífera como se logra observar en los resultados absorbancias ensayo curva de crecimiento de *Candida albicans* cepa ATCC 10231, en 48 horas evaluada en equipo Bioscreen C100 (Anexo 6.1), dicha evidencia que no fue demostrada visiblemente en el ensayo de difusión en agar sugiere sea estudiada la evaluación de inhibición a concentraciones diferentes del extracto acuoso de *Moringa oleifera*.

Las gráficas para la verificación de la actividad derivada del análisis de tablas de vida donde se logra apreciar un comportamiento con tendencia logarítmica de acuerdo a la cantidad inicial de células y la cantidad final de células, frente a la exposición de las Nanopartículas de plata, esto permite reconocer que el efecto de inhibición es fungistático al final del ensayo, ya que se genera una curva de crecimiento a las 48 horas con tendencia a la disminución de células, pero evidencia la continuación de su crecimiento permitiendo inferir una actividad fungistática y no fungicida.

Cabe resaltar que este tipo de ensayo no ha sido reportada hasta el momento en la literatura y permite justificar la actividad fungistática de la solución de Nanopartículas de plata extraídas por síntesis verde a partir de Moringa oleífera sobre *Candida albicans* cepa 10231 frente a los resultados de estudio limitados al ensayo de inhibición.

Es importante reconocer que la capacidad de formación de biopelícula por parte de *Candida albicans* se ha asociado con un incremento en su resistencia a medicamentos antiufúngicos. De hecho, se ha demostrado que conforme avanza su maduración, la resistencia aumenta. Si bien la formación de biopelícula de *Candida albicans* comparte fases de crecimiento con otros microorganismos, difieren de otras especies fúngicas por su capacidad de desarrollo de una fase madura, con un importante componente extracelular, altamente resistente y con alta heterogenicidad en su arquitectura. (59)

Se ha demostrado que las nanopartículas de plata tienen un efecto inhibitorio en la formación de la biopelícula formada por *Candida albicans* (y en biopelículas ya preformadas), debido a su disrupción en la membrana celular y su inhibición en la filamentación. (60)

La resistencia a nanopartículas de plata por parte de microorganismos ha sido demostrada en bacterias, donde generaciones que crecen en ambientes con presencia de iones de plata pueden aumentar la expresión de genes que confieren resistencia al efecto bactericida de los mismos. Esto, debido posiblemente a material genético que puede transmitirse de forma horizontal, como los plásmidos. Sin embargo, estos mecanismos no han sido descritos como factores de resistencia a nanopartículas de plata en cepas de *Candida albicans*.(58)

En el contexto actual, la búsqueda de alternativas terapéuticas bacteriostáticas y bactericidas que representen una baja toxicidad o resistencia bacteriana ha venido en aumento. La medicina homeopática, por ejemplo, se basa en el principio del uso de microdosis de moléculas activas derivadas de compuestos naturales que buscan activar diferentes vías metabólicas (comparadas con tratamientos halopáticos) para su aprovechamiento, que permitirían el uso de nanociencia y nanotecnología a partir de síntesis verde. Se ha sugerido que el efecto antimicrobiano y antifúngico de algunas de estas moléculas se logra deteniendo directamente el desarrollo microbiano, desactivando su crecimiento, y retirando su capacidad de supervivencia (55,56).

5. CONCLUSIONES

- El extracto acuoso de *Moringa oleífera* fue ideal para la obtención de componentes antioxidantes abundantes en las hojas, actuando como agentes reductores iones de plata y estabilizantes en la biosíntesis de nanopartículas plata.
- Se hallaron las características morfológicas esperadas mediante microscopia de fuerza atómica (AFM), donde la nanoesferas tienen un tamaño entre 80 a 120nm, lo cual les permite una mejor interacción y penetración en las membranas celulares. Debido a su desempeño se genera así un mayor estudio para la sustentación de sus efectos a nivel ambiental en el marco de la química verde y la justificación de la mitigación de los efectos tóxicos generados por técnicas propuestas generadoras de residuos tóxicos.
- En los ensayos de crecimiento fúngico realizados en *Candida albicans* ATCC 10231 se evidenció una inhibición en la concentración celular comparando el control positivo a partir de las concentraciones establecidas.
- Se evidenció un crecimiento evaluado por el ensayo de curva de crecimiento lo que permite reconocer su efecto fungistático y no fungicida, haciendo necesario un posterior estudio sobre la evaluación de dicho efecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Vallejo Salazar M, Actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de la planta *Cassia reticulata* sobre *Candida albicans*. Estudio In vitro. Quito. Universidad central del Ecuador, Facultad de Odontología. 2018
2. Ensenada DE, Alejandro J, Robledo K. Centro De Investigación Científica Y De Educación Superior. 2012;128–35.
3. Joya M, Gil M, Bastidas-Pacheco G. Actividad fungistática y fungicida de extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento in vitro de cepas del género *Candida*. Rev Tecnol en Marcha. 2017;30(3):3.
4. Secretaría Distrital de Salud de Bogotá. Sistema de vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias. 2002;35. Disponible en: [http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Protocolos de Vigilancia en Salud Publica/Vigilancia Infecciones Intrahospitalarias.pdf](http://www.saludcapital.gov.co/sitios/VigilanciaSaludPublica/Protocolos%20de%20Vigilancia%20en%20Salud%20Publica/Vigilancia%20Infecciones%20Intrahospitalarias.pdf)
5. Acevedo A, Acosta L, Morales C, Castaño V. Citotoxicidad y efecto antifúngico de nanopartículas de plata para uso odontológico. 2012;5(9):68–76.
6. Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. J Adv Res [Internet]. 2016;7(1):17–28. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>
7. Jasuja ND, Gupta DK, Reza M, Joshi SC. Green synthesis of AgNPs stabilized with biowaste and their antimicrobial activities. Brazilian J Microbiol. 2014;45(4):1325–32.
8. Villamizar R, Monroy L. Uso de Nanopartículas de plata en el control de microorganismos patógenos presentes en alimentos. LIMENTECH-Ciencia y Tecnol Aliment. 2015;13(1):54–9.
9. Rodríguez-Luis, O. E., Hernandez-Delgadillo, R., Sánchez-Nájera, R. I., Martínez-Castañón, G. A., Niño-Martínez, N., Sánchez Navarro, M. D. C., ... Cabral-Romero, C. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles and their bactericidal and antimycotic activities against oral microbes. Journal of Nanomaterials, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9204573>
10. Vazquez-Muñoz, R. (2013). Efectos de las nanopartículas de plata en el hongo patógeno *Candida albicans*.
11. Vibhute SK, K. V. K. P. W. G. (2014). Synthesis of Silver Nanoparticles From *Moringa Oleifera*: Formulation and Evaluation Against *Candida Albicans*. Indo American Journal of Pharmaceutical Research, 4(3), 1581–1587.

12. Taxonomy browser. *Candida albicans*. Consultado 2018 Agos 18. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5476>
13. Intramed. Candidiasis invasiva. Consultado 2018 Jul 15. Disponible en: <https://www.intramed.net/contenidover.asp?contenidoID=88165>
14. Gil M, Luis G, Vanessa M, Maureen O, Smirna C, Julieta S, et al. Artículo Original Capacidad de formación de biopelículas en especies del género *Candida* de procedencia clínica Materiales y métodos. 2017;23(1):4–9
15. Beyra A, León MC, Iglesias E, Ferrándiz D, Herrera R, Volpato G, et al. Ethnobotanical studies on medicinal plants in the province of Camagüey (Cuba). *Ann Gard*. [Internet]. 2004;61(61):185–204. Disponible en: <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/39667>
16. Jr RAC, Perfect JR. Opportunistic Fungal Pathogenesis Mechanisms [Internet]. Second Edi. *Clinical Mycology*. Elsevier Inc.; 2017. 15 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4160-5680-5.10002-7>
17. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2001;9(7):327–35.
18. Lazo V, Hernández G, Méndez R. Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horiz Med (Barcelona)*. 2018;18(1):75–85.
19. Álvarez TR, Lancha IMP, Gerardo II, Machín M, Rentería YB, Clara III, et al. Candidiasis invasiva en una unidad de cuidados intensivos neonatales de La Habana Invasive candidiasis observed in an intensive neonatal care unit in Havana. 2017;89(3):319–29.
20. Miro M, Rodríguez E, Vigezzi C, Icely P. Candidiasis vulvovaginal: una antigua enfermedad con nuevos desafíos. *Universidad Nacional de Córdoba, Argentina*. 2017;34(2):65-71.
21. Monge Oroz M. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *An la Real Soc Española Química* [Internet]. 2009;(1):33–41. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2931286&info=resumen&idioma=ENG>
22. Gil F, Breitbar W. Psicoterapia Centrada En El Sentido: “Vivir Con Sentido.” *Psicooncología*. 2015;12(1):19–38.
23. Tran QH, Nguyen VQ, Le A. Corrigendum: Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology. *Perspectives (Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.* 4 033001). *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 2018;9(4), 049501.

24. Park Y. A new paradigm shift for the green synthesis of antibacterial silver nanoparticles utilizing plant extracts. *Toxicol Res* [Internet]. 2014;30(3):169–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.5487/TR.2014.30.3.169>
25. Hebbalalu D, Lalley J, Nadagouda MN, Varma RS. Greener techniques for the synthesis of silver nanoparticles using plant extracts, enzymes, bacteria, biodegradable polymers, and microwaves. *ACS Sustain Chem Eng*. 2013;1(7):703–12.
26. Canett-Romero R, Arvayo-Mata KL, Vanessa R-GN. ASPECTOS TÓXICOS MÁS RELEVANTES DE *Moringa oleifera* Y SUS POSIBLES DAÑOS MOST RELEVANT TOXIC ASPECTS OF *Moringa oleifera* AND ITS POSSIBLE DAMAGES. 2014 [Internet]. 2013;37–43. Disponible en: www.biotechia.uson.mx
27. García H. R. Estudio sobre la capacidad antioxidante de extractos de hoja de *Moringa oleifera* de diferente origen geográfico. 2017;27. Disponible en: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19625/GarcíaHernández_Rafael_TFG_2017.pdf?sequence=2
28. Jahan IA, Hossain MH, Ahmed KS, Sultana Z, Biswas PK, Nada K. Antioxidant activity of *Moringa oleifera* seed extracts. *Orient Pharm Exp Med*. 2018;18(4):299–307.
29. Echavarría A, D'Armas Regnault H, Lisbeth N, Matute L, Jaramillo C, Rojas de Astudillo L, et al. Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales / Evaluation of antioxidant capacity and secondary metabolites of sixteen medicinal plants extracts. *Cienc Unemi*. 2018;9(20):29
30. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal*. 2006;19(6–7):669–7
31. Pérez NG, Pérez NG, Jaramillo CJ, Buele SC, León JT, Hernández IM. Estudios farmacognósticos y toxicológicos preliminares de hojas, tallo y raíz de moringa (*moringa oleifera* Lam.). *Cienc Unemi* [Internet]. 2017;10(22):60–8. Disponible en: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/459>
32. García H. R. Estudio sobre la capacidad antioxidante de extractos de hoja de *Moringa oleifera* de diferente origen geográfico. 2017;27. Disponible en: https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/19625/GarcíaHernández_Rafael_TFG_2017.pdf?sequence=2
33. López-Ávila K, Dzul-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León JJ, Zavala-Castro JE. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Biomédica*. 2018;27(3):127–36.

34. Vineetha N, Sridhar D, Vignesh RA. Preparation, Standardization of Antibiotic Discs and Study of Resistance Pattern for First-Line Antibiotics in Isolates from Clinical Samples. *Int J Appl Res* [Internet]. 2015;1(11):624–31. Available from: www.allresearchjournal.com
35. Roy S, Das TK. Plant Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles-A Review. *Int J Plant Biol*. 2015;3(3):1044–54
36. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbio* [Internet]. 2015;69 (1):71–92. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
37. Ramos AP, Desgarennes CP. *HeinOnline -- 121 U. Pa. L. Rev.* 120 1972-1973. 1973;120–51
38. Espinel-ingroff A. *Microdilucion1*. 2004
39. Telechea H, Decia M, Fernandez N, Colab Y. Incidencia y etiología de la candidiasis invasiva en la Unidad de Cuidados Intensivos de Niños del Centro Hospitalario Pereira Rossell. *Arch Pediatr Urug* [Internet]. 2017;88(2):72–7. Disponible en: http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-12492017000200002&lang=pt
40. Martínez-Fernández L, Díaz-Torres HM. Infección Asociada a la Atención de Salud. *Acta Medica Cuba* [Internet]. 2015;16:15. Available from: http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol16_1_15/act06115.htm%0Ahttp://www.medigraphi.com/pdfs/actamedica/acm-2015/acm151f.pdf
41. Zurita S. Situation of Anti-Fungal Resistance of Species. 2018;35(1):126–31
42. Candel FJ, Pazos Pacheco C, Ruiz-Camps I, Maseda E, Sánchez-Benito MR, Montero A, et al. Update on management of invasive candidiasis. *Rev Esp Quim* [Internet]. 2017;30(6):397–406. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-15146-6>
43. Quindós G. Epidemiología de las micosis invasoras: un paisaje en continuo cambio. *Rev Iberoam Micol*. 2018;35(4):171–8.
44. Gómez-Garzón M. Nanomateriales, Nanopartículas y Síntesis verde. *Rev Repert Med y Cirugía*. 2018;27(2):75–80
45. Gopinath K, Gowri S, Arumugam A. Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Pterocarpus santalinus* leaf extract and their antibacterial properties. *J Nanostructure Chem*. 2013;3(1):68.
46. Rivera LEC, Ramos AP. Actividad antimicótica de nanopartículas. 2014;7(12).

47. Coz X. y Guzman S, Composición fenólica y capacidad antioxidante de infusiones de hoja de moringa y su actividad antiinflamatoria sobre células raw 264.7. Su MY,
48. Alonso T, Verde L, Calgary) D (University of. Ensayo de elicitación de suspensiones celulares utilizando como elicitor un extracto de hojas de Moringa oleifera. Fin Grado. 2014;32
49. Armas D. Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales Evaluation of antioxidant capacity and secondary metabolites of sixteen medicinal plants extracts. 2016;9:29–35.
50. Moodley JS, Krishna SBN, Pillay K, Serphen, Govender P. Green synthesis of silver nanoparticles from Moringa oleifera leaf extracts and its antimicrobial potential. Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol. 2018;9(1).
51. Camones H, Gladiz Vásquez Vásquez E, Emérita F. Facultad De Ciencias De La Salud. 2016;92. Available from: <http://repositorio.uch.edu.pe/bitstream/handle/uch/49/huaman-camones-ester.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
52. Rubio A, Corzo M, Pino O. Nanopartículas de plata obtenidas a partir del extracto residual de la hidroddestilación de *Thymus vulgaris* L . y su efecto sobre *Xanthomonas phaseoli* the hydro distillation of *Thymus vulgaris* L . and its effect on. 2018;33(3):1–7.
53. Efecto antimicótico in vitro de diferentes concentraciones del aceite esencial de la flor de matricaria chamomilla (manzanilla) en cultivo de *Candida albicans* cepa ATCC 10231. 2018
54. Vitro EIN. Autora : Jhenny Alexandra Jarrín Bedoya Tutor : Dr . Juan Pablo Jaramillo Burneo Quito , Mayo 2018.
55. Avello LM, Avendaño OC, Sigrid MC. Aspectos generales de la homeopatía. Rev Med Chil. 2009;137(1):115–20
56. Sanz AB, Franco MJS, Galan E, Sanz AB, Franco MJS, Galan E. A ctualizaciones Homeopatía . Fundamentos científicos CONTINUAR A ctualizaciones Homeopatía . Fundamentos científicos. 1999
57. Su MY, Antiinflamatoria A, Células S. Composición fenólica y capacidad antioxidante de infusiones de hoja de moringa y su actividad antinflamatoria sobre células raw 264.7 Ximena Coz Bolaños. :1–5
58. Duran N, et al. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspect on antimicrobial activiy. 2015

59. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, Cormick TMC, Ghannoum MA. Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development , Architecture , and Drug Resistance. 2001;183(18):5385–94
60. Lara HH, Urbina DGR, Pierce C, Ribot JLL, Jiménez MJA, Yacaman MJ. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. J Nanobiotechnology. 2015;1–12

6. ANEXOS

Anexo 6.1 Resultados absorbancias ensayo curva de crecimiento de *Candida albicans* cepa ATCC 10231, en 48 horas evaluada en equipo Bioscreen C100

Tiempo	Control	AgNps 100%	AgNps 75%	AgNps 50%	AgNps 25%	Extracto moringa
00:00:57	100	100	100	100	100	100
01:00:06	102	91	101	109	99	102
02:00:06	105	84	102	138	99	109
03:00:06	108	77	103	151	100	112
04:00:06	114	71	104	159	100	116
05:00:06	122	66	105	165	101	121
06:00:06	133	58	107	170	103	124
07:00:06	149	61	109	175	105	128
08:00:06	165	65	111	180	108	132
09:00:06	182	68	113	186	111	136
10:00:06	198	72	116	191	114	139
11:00:06	215	75	118	197	117	143
12:00:06	231	74	121	203	121	145
13:00:06	247	76	124	209	125	147
14:00:06	263	89	126	215	129	151
15:00:06	279	105	129	222	133	153
16:00:06	294	122	132	231	138	155
17:00:06	310	144	135	240	143	157
18:00:06	326	171	138	249	148	160
19:00:06	344	200	141	259	153	162
20:00:06	364	235	144	269	158	163
21:00:06	385	273	238	279	164	166
22:00:06	405	323	256	290	170	166
23:00:06	429	377	276	300	176	167
24:00:06	453	433	298	311	182	169
25:00:06	477	516	319	323	189	172
26:00:06	505	613	344	335	195	174
27:00:06	535	715	372	347	203	174
28:00:06	566	836	400	359	210	177
29:00:06	600	952	432	373	218	179
30:00:06	635	1132	464	387	225	183
31:00:06	675	1320	501	402	233	184
32:00:06	715	1550	539	418	241	185
33:00:06	757	1799	578	436	250	189
34:00:06	802	2110	621	456	259	193
35:00:06	854	2445	671	477	268	195
36:00:06	905	2819	718	497	277	199
37:00:06	960	3250	771	517	286	203
38:00:06	1022	3790	830	540	296	207
39:00:06	1087	4417	893	564	307	209

40:00:06	1155	5124	959	587	317	214
41:00:06	1233	6019	1035	610	328	214
42:00:06	1318	6852	1117	634	340	215
43:00:06	1406	7993	1204	658	351	217
44:00:06	1509	9287	1304	683	364	216
45:00:06	1624	10755	1416	709	376	216
46:00:06	1746	12258	1537	735	388	216
47:00:06	1887	13954	1675	762	401	217
48:00:06	2049	16307	1835	788	413	216