

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA  
FRENTE A ESPECIES PATÓGENAS DE *Candida***

**JHON JHAMILTON ARTUNDUAGA BONILLA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DE LA ESCUELA DE MEDICINA  
BUCARAMANGA**

**2014**

**ESTUDIO DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA  
FRENTE A ESPECIES PATÓGENAS DE *Candida***

**JHON JHAMILTON ARTUNDUAGA BONILLA**

**Tesis presentada como requisito para optar al título de  
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas**

**Directora**

**CLARA INÉS SÁNCHEZ SUAREZ, MSc**

**Codirectora**

**CLAUDIA CRISTINA ORTIZ LÓPEZ, PhD**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER**

**FACULTAD DE SALUD**

**ESCUELA DE MICROBIOLOGÍA Y DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS**

**DE LA ESCUELA DE MEDICINA**

**BUCARAMANGA**

**2014**

## **Agradecimientos**

A Dios, quien me regalo a mí familia, quien me regala cada amanecer y por sobre todo quien me regala el entendimiento para realizar cada meta de vida.

A mi familia, quienes con su apoyo incondicional, esfuerzo y comprensión son mi motivo para mejorar cada día.

A los profesores Claudia Ortiz, Clara Sánchez y Rodrigo Torres, por sus valiosos aportes, enseñanzas y confianza depositada en mí y porque en muchas oportunidades el tiempo transcurre muy rápidamente, pero descubres que no solo hay conocimiento, sino personas de gran calidad humana.

A mis compañeros del Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología (GIBIM), en especial al Grupo de nanopartículas con quienes se formaron fuertes lazos de amistad especialmente con Daissy Paredes, gran compañera y cómplice.

A la profesora Kelly Ishida y su equipo de trabajo, por aceptarme como pasante en su laboratorio, por su amable acogida, orientación y contribución a mi formación académica y personal.

A la profesora Patricia Escobar y su equipo de trabajo, por la colaboración en los ensayos de citotoxicidad que contribuyeron en el cumplimiento de los objetivos planteados en esta investigación.

En todas las etapas de vida, como proyectos de investigación, existen personas que desinteresadamente aportaron su granito de arena, son ellos: Marlon, Yuly, Alba, Oveimar, Johanny, Victor, Andrés y así podría mencionar a muchos más que en este momento se me escapan pero a quienes les doy un gracias infinitas.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	
1 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	15
1.1 GENERALIDADES: <i>Candida</i> .....	15
1.1.1 Pared celular .....	17
1.1.2 Atributos de virulencia .....	19
1.1.3 Patogénesis de la Candidiasis .....	20
1.1.4 Tratamiento y resistencia Antifúngica .....	21
1.2 NANOTECNOLOGÍA .....	24
1.3 ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE LA PLATA .....	25
1.4 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs) .....	26
1.5 ENCAPSULACIÓN DE AgNPs UTILIZANDO BIOPOLÍMEROS .....	29
1.6 CITOTOXICIDAD .....	31
2 OBJETIVOS .....	32
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
3.1 REACTIVOS Y CEPAS FÚNGICAS .....	33
3.1.1 Reactivos.....	33
3.1.2 Cepas Fúngicas y medios de cultivo .....	34
3.2 METODOLOGÍA .....	35
3.2.1 SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs) .....	35
3.2.1.1 Síntesis mediante reducción con cisteína .....	36
3.2.1.2 Síntesis mediante reducción con citrato de sodio .....	36
3.2.1.3 Síntesis mediante reducción con hidracina .....	36
3.3 ENCAPSULACIÓN DE AgNPs UTILIZANDO BIOPOLÍMEROS .....	37
3.4 CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS NANOPARTÍCULAS .....	38
3.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI <sub>50</sub> ) .....	40
3.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA FUNGICIDA (CMF) .....	41
3.7 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD .....	41
3.7.1 Línea celular de mamífero .....	41

3.7.2 Ensayo MTT .....	42
3.8 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS AgNPs SOBRE LA PARED CELULAR....	43
3.9 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PROTEASAS .....	43
3.9.1 Ensayo cualitativo de inhibición de proteasas .....	43
3.9.2 Ensayo cuantitativo de inhibición de proteasas .....	44
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
4.1 SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Candida</i> .....	45
4.2 CARACTERIZACIÓN DE AgNPs .....	47
4.3 EFECTO ANTIFÚNGICO DE AgNPs .....	54
4.3.1 Determinación de la CMI <sub>50</sub> Y CMF .....	54
4.4 ENCAPSULACIÓN DE AgNPs EN BIOPOLÍMEROS .....	61
4.5 CITOTOXICIDAD .....	67
4.6 EFECTO DE LAS AgNPs SOBRE LA PARED CELULAR FÚNGICA .....	71
4.6.1 Fluorescencia con Blanco de Calcoflúor .....	72
4.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y de Transmisión (TEM) .....	73
4.7 Fluorescencia con DAPI .....	78
4.8 EFECTO DE AgNPs (Cisteína) SOBRE LA SECRECIÓN DE PROTEASAS .....	79
4.8.1 Ensayo cualitativo sobre proteasas fúngicas .....	79
4.8.2 Ensayo cuantitativo sobre proteasas fúngicas .....	82
5 CONCLUSIONES .....	85
6 RECOMENDACIONES .....	87
DIVULGACIÓN .....	88
BIBLIOGRAFÍA .....	89
ANEXOS .....	102

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Ciclo celular de <i>Candida</i> .....	17
<b>Figura 2.</b> Estructura celular de levaduras .....	18
<b>Figura 3.</b> Patogénesis de la Candidiasis .....	21
<b>Figura 4.</b> Formación de nanopartículas de plata .....	27
<b>Figura 5.</b> Organización estructural de las Nanoesferas y Nanocápsulas .....	30
<b>Figura 6.</b> Espectro UV-Vis de las AgNPs sintetizadas .....	48
<b>Figura 7.</b> Carga superficial neta de las AgNPs obtenidas con diferente agente Reductor .....	50
<b>Figura 8.</b> Caracterización mediante DLS y TEM de las AgNPs sintetizadas con los diferentes agentes reductores .....	52
<b>Figura 9.</b> Determinación de CMI <sub>50</sub> de AgNPs (Cisteína) mediante la norma CLSI para levaduras .....	45
<b>Figura 10.</b> Determinación de CMF de las AgNPs (Cisteína) frente a las cepas de <i>Candida</i> .....	57
<b>Figura 11.</b> Microfotografías S-TEM de encapsulados de AgNPs .....	64
<b>Figura 12.</b> Efecto de AgNPs sobre <i>C. parapsilosis</i> evidenciado mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) .....	74
<b>Figura 13.</b> Efecto de las AgNPs sobre <i>Candida albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i> evidenciado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) .....	77
<b>Figura 14.</b> Etapas de la división celular en <i>Candida</i> y la respectiva transferencia de material genético marcado con DAPI .....	78
<b>Figura 15.</b> Ensayo cualitativo de secreción de proteasas .....	81

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
<b>Tabla 1.</b> Determinación de la CMI <sub>50</sub> de fluconazol frente a las cepas de <i>Candida</i> preseleccionadas para el estudio .....	46
<b>Tabla 2.</b> Puntos de corte recomendados por el CLSI (M27 – A3) para levaduras frente a Fluconazol .....	47
<b>Tabla 3.</b> Resumen de la Caracterización de AgNPs .....	53
<b>Tabla 4.</b> CMI <sub>50</sub> y CMF de AgNPs sobre las cepas de <i>Candida</i> .....	58
<b>Tabla 5.</b> Condiciones experimentales para encapsulación en polímeros (PLA y PLGA) .....	62
<b>Tabla 6.</b> Caracterización de encapsulados de AgNPs en polímeros .....	64
<b>Tabla 7.</b> Determinación de CMI <sub>50</sub> y CMF de los compuestos encapsulados .....	65
<b>Tabla 8.</b> Caracterización de compuestos para ensayo MTT .....	68
<b>Tabla 9.</b> Citotoxicidad de nanocompuestos sobre fibroblastos de murino .....	68
<b>Tabla 10.</b> Citotoxicidad de los polímeros utilizados en la encapsulación de AgNPs .....	70
<b>Tabla 11.</b> Efecto de AgNPs sobre el ciclo celular de <i>Candida</i> .....	79
<b>Tabla 12.</b> Ensayo cualitativo del efecto de AgNPs sobre la secreción de proteasas .....	80
<b>Tabla 13.</b> Efecto de las AgNPs sobre la actividad proteolítica de Sap .....	83

## LISTA DE ESQUEMAS

	<b>Pág.</b>
<b>Esquema 1.</b> Metodología general empleada en el desarrollo del proyecto de investigación .....	35
<b>Esquema 2.</b> Ensayo cuantitativo para determinar actividad proteolítica de Sap. ....	45

## LISTA DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Variables de análisis para el ensayo de citotoxicidad .....	42
<b>Cuadro 2.</b> Fluorescencia con Blanco Calcoflúor de <i>C. albicans</i> y <i>C. parapsilosis</i> expuestas a AgNPs .....	71

## RESUMEN

**TITULO: ESTUDIO DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA FRENTE A ESPECIES PATÓGENAS DE *Candida*\***

**AUTOR: JHON JHAMILTON ARTUNDUAGA BONILLA\*\***

**PALABRAS CLAVE:** Nanopartículas de plata, Antifúngico, *Candida*, Microdilución, CLSI, Citotoxicidad

### DESCRIPCIÓN

En esta tesis, se realizó la síntesis y caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs) obtenidas mediante reducción química con tres tipos de agentes reductores: cisteína, citrato de sodio e hidracina. Se seleccionó la síntesis de AgNPs con mejor actividad antifúngica sobre especies de *Candida* con diferente perfil de sensibilidad al antifúngico convencional fluconazol. Las AgNPs seleccionadas, fueron encapsuladas de forma independiente en tres biopolímeros y se determinó la actividad anticandidiásica. Posteriormente, se evaluó la citotoxicidad de las nanopartículas sobre fibroblastos de murino.

Las nanopartículas fueron caracterizadas mediante espectrofotometría UV-VIS, Microscopía Electrónica de Transmisión y de Barrido (TEM/SEM), Dispersión de Luz en Modo Dinámico (DLS) y mediante potencial zeta. Las AgNPs fueron en general esféricas, con tamaño promedio entre 14 a 36 nm. Por otro lado, el efecto inhibitorio de las AgNPs se evaluó mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI<sub>50</sub>) de acuerdo con el protocolo M27-A3 del Clinical and Laboratory Standards Institute y mediante la determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF). El estudio se llevó a cabo en las cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 10231 y tres especies de *Candida* aisladas de pacientes con Candidiasis muco-cutánea.

La CMI<sub>50</sub> de todas las AgNPs obtenidas se encontró entre 0.1 a 0.5 µg/mL para las cepas evaluadas, evidenciando mejor efecto antifúngico de las AgNPs sintetizadas mediante reducción con cisteína. La encapsulación en biopolímeros potencializó entre 25 a 50 veces el efecto antifúngico de las AgNPs libres y redujo en un orden de 5 veces la citotoxicidad. La actividad antifúngica exhibida por las AgNPs libres y encapsuladas frente a especies de *Candida* y el mínimo efecto citotóxico, permiten considerar los nanocompuestos de plata como una potencial alternativa en el desarrollo de nuevos agentes anticandidiásicos.

---

\* Tesis

\*\* Universidad Industrial de Santander. Facultad de Salud. Escuela de Microbiología y Departamento de Ciencias Básicas de la Escuela de Medicina. Directora: Clara Inés Sánchez Suárez. Codirectora: Claudia Cristina Ortiz López.

## ABSTRACT

**TITLE: STUDY OF THE ANTIFUNGAL EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES AGAINST PATHOGENIC SPECIES OF *Candida*\***

**AUTHOR: JHON JHAMILTON ARTUNDUAGA BONILLA\*\***

**KEYWORDS:** Silver nanoparticles, antifungal, *Candida*, microdilution, CLSI, Cytotoxicity

### DESCRIPTION

In this thesis, silver nanoparticles synthesis (AgNPs) was carried out by chemical reduction using three kinds of reducing agents: cysteine, sodium citrate and hydrazine. The AgNPs synthesis with better antifungal activity against *Candida* species with different susceptibility profile to fluconazole was selected. Subsequently, the selected AgNPs were separately encapsulated in three different biopolymers, and then were assessed for anticandidal activity and cytotoxicity on murine fibroblast.

The nanoparticles characterization was carried out using UV-VIS spectrophotometry; Transmission Electron Microscopy and Scanning (TEM / SEM); Dynamic Light Scattering (DLS) and by Zeta potential measurements. In general, the AgNPs were in spherical shape with varying size from 14 to 36 nm. On the other hand, AgNPs inhibitory effect was measured by using the minimum inhibitory concentration (MIC<sub>50</sub>) according to recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), protocol M27-A3, and by determining the minimum fungicidal concentration (MFC). These analyses were performed on *C. parapsilosis* ATCC 22019, *Candida albicans* ATCC 10231 and on three *Candida* species isolated from patients with mucocutaneous candidiasis.

The experimental evidence showed that the MIC<sub>50</sub> for all acquired AgNPs and tested on the different *Candida* strains was between 0.1 and 0.5 µg/mL; the best antifungal effect was observed for AgNPs synthesized using cysteine. In addition, the polymer encapsulation increased the antifungal activity of the free AgNPs between 25- and 50-fold, whereas the cytotoxicity was reduced up to 5-fold. Based on these findings, silver nanoparticles should be considered as a potential alternative for developing new anticandidal agents.

---

\* Thesis

\*\* Universidad Industrial de Santander. Facultad de Salud. Escuela de Microbiología y Departamento de Ciencias Básicas de la Escuela de Medicina. Directora: Clara Inés Sánchez Suárez. Codirectora: Claudia Cristina Ortiz López.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las enfermedades fúngicas han contribuido de manera significativa al aumento de la morbilidad y la mortalidad de los pacientes inmunosuprimidos; en particular, los pacientes con VIH, usuarios de medicamentos inmunosupresores empleados contra el cáncer y trasplante de órganos, y aquellos individuos con uso prolongado e irracional de antibióticos de amplio espectro (Panacek *et al.*, 2009; Allevato *et al.*, 2007). La implementación de dispositivos médicos como los catéteres venosos periféricos y centrales, empleados para tratamientos como quimioterapia, hemodiálisis y nutrición parenteral, contribuyen de forma importante a la colonización e invasión fúngica, principalmente del género *Candida* (Schommer *et al.*, 2013; Sanglard, 2002).

Las micosis de piel y mucosas constituyen un problema sanitario no sólo en pacientes inmunosuprimidos, sino en la población mundial de todas las edades y se calcula que generan al menos entre el 5 al 10% de las consultas dermatológicas (Allevato *et al.*, 2007). Asimismo, alrededor del 60% de todas las mujeres sanas experimentan al menos una vaginitis por *Candida albicans* y aproximadamente el 5% soportan episodios recurrentes de la patología (Sanglard, 2002; Sardi *et al.*, 2013). Actualmente, el género *Candida* es considerado por el National Nosocomial Infections Surveillance System (NNISS, USA) como el cuarto patógeno sanguíneo a nivel nosocomial, con una tasa de mortalidad estimada de hasta el 45 % (Wisplinghoff *et al.*, 2004; Lusvardi *et al.*, 2007; Hauman *et al.* 1993; Huffnagle *et al.*, 2013).

Entre las principales especies de *Candida* aisladas en micosis humanas, se encuentran *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. krusei*. Las especies antes mencionadas comprenden más del 90% de las micosis, siendo relativas a la localización geográfica, la población de pacientes y la

condición clínica. Es preocupante la incidencia por cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. krusei* que expresan sensibilidad disminuida o resistencia a antifúngicos, principalmente fluconazol. Este antifúngico azólico, es frecuentemente empleado como tratamiento de micosis muco-cutáneas y sistémicas (Naglik *et al.*, 2011; Cortés *et al.*, 2011; Huffnagle *et al.*, 2013; Schommer *et al.*, 2013).

El surgimiento de nuevos medicamentos para enfermedades micóticas ha sido muy modesto si se compara con el desarrollo de los agentes antibacterianos. En la actualidad, las micosis causadas por levaduras se tratan con agentes antifúngicos que incluyen polienos (anfotericina B), azoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol) y equinocandinas (caspofungina, micafungina y anidulafungina) (Allevato *et al.* 2007; Sanglard, 2002; Pfaller, 2006). Sin embargo, la administración de los antimicóticos antes mencionados, es acompañada ocasionalmente de efectos secundarios como cefalea, náuseas, hipokalemia, edema y efectos citotóxicos, entendiéndose éstos últimos como el daño generado en las células no microbianas (Sanglard, 2002; Schekerov *et al.*, 2010; Pfaller, 2006).

El uso inadecuado de antimicóticos constituye una de las razones que conlleva al desarrollo de cepas patógenas menos sensibles que requieren tratamientos más eficaces que los actualmente implementados. Levaduras como *Candida* exhiben resistencia frente a casi todos los antifúngicos disponibles (Sanglard, 2002; Pfaller, 2006; Cortés *et al.*, 2011). Se ha encontrado resistencia al fluconazol en *Candida albicans* cercana al 3%, con variaciones regionales y locales muy notorias. En Colombia la variabilidad de resistencia o sensibilidad disminuida se encuentra desde 0 al 20.8%, resultados dependientes del tipo de pacientes, el lugar de evaluación y la técnica implementada (Gutiérrez *et al.*, 2007; Rivas *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2009; Zuluaga *et al.*, 2010).

El actual panorama de sensibilidad disminuida y resistencia quimioterapéutica de levaduras como *Candida* frente a los antifúngicos convencionales, genera la

necesidad de desarrollar nuevos agentes que presenten actividad antifúngica y con efectos citotóxicos mínimos (Gutiérrez, 2007; Enwuru *et al.*, 2008; Nadeem *et al.*, 2011). La mayoría de los agentes utilizados comercialmente presentan toxicidad o un espectro de acción limitado. Una alternativa que ha tenido resultados promisorios es el uso de nanomateriales como las nanopartículas de plata (AgNPs). El tamaño nanométrico permite una interacción eficiente con el microorganismo al encontrarse en la misma escala dimensional. Los estudios en su mayoría han sido dirigidos a la actividad antibacteriana de las AgNPs, no obstante, al revisar sus posibles mecanismos de acción se presentan como una buena opción para el control fúngico (Panacek *et al.*, 2009; Nasrollahi *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2009; Monteiro *et al.*, 2014).

Por lo anterior, este trabajo de investigación se orientó hacia la síntesis y caracterización de AgNPs obtenidas mediante reducción química y su encapsulación en biopolímeros. Se determinó el efecto antifúngico de AgNPs libres y encapsuladas frente a varias especies de *Candida* con diferente perfil de sensibilidad al antifúngico convencional fluconazol. Finalmente, fue determinada la citotoxicidad de las nanopartículas sobre fibroblastos de murino. El desarrollo del proyecto no presentó impacto negativo sobre el medio ambiente, ya que se trabajó con protocolos de bioseguridad y manejo de residuos biológicos y químicos.

## **1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE**

### **1.1. GENERALIDADES: *Candida***

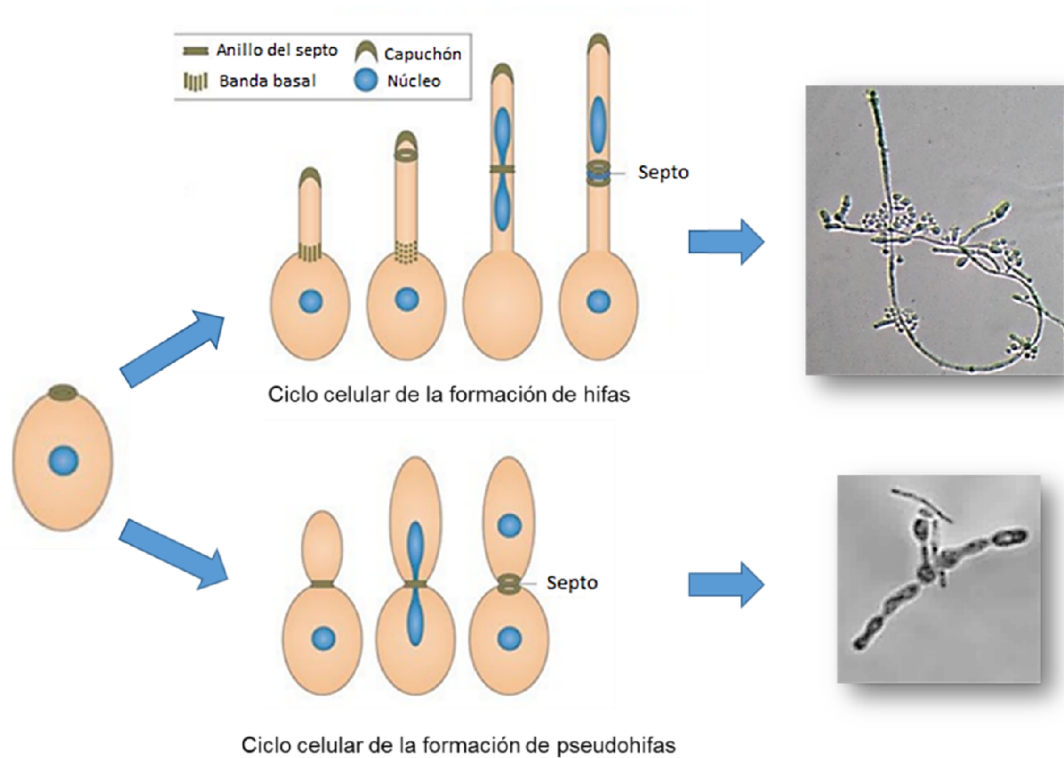
*Candida* es un hongo levaduriforme, pertenece a la división *Ascomycota*, Subdivisión *Ascomycotina*, Clase *Ascomycetes*, Orden *Saccharomycetales*, Familia *Saccharomycetaceae*. Las especies del género son comensales del ser humano, están presentes en las mucosas y habitualmente son aisladas de la cavidad oral,

conjuntival, el tracto gastrointestinal y urogenital. Sin embargo, cuando hay deficiencia de las funciones inmunológicas, pueden invadir y causar enfermedad a nivel cutáneo, de mucosas y/o sistémico, por lo cual se conoce como patógeno oportunista (Panacek *et al.*, 2009; Pfaller *et al.*, 2007; Castrillón *et al.*, 2005). *Candida* es considerada una levadura polimórfica no térmica, con variaciones en su morfología desde levaduras redondeadas u ovals, hasta formas alargadas denominadas hifas y pseudohifas; presenta reproducción asexual mediante gemación o brotación, en la cual las células hijas se encuentran físicamente separadas de la célula madre después de la citocinesis (Pfaller *et al.*, 2007; Allevato, 2007; Lusvarghi *et al.*, 2008). Hasta el momento se ha evidenciado que las especies *C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis* son las únicas que producen hifas verdaderas, en este sentido serían las únicas especies dimórficas (Panacek *et al.*, 2009; Pfaller *et al.*, 2007).

El dimorfismo para *Candida* está dado por cambios en condiciones nutricionales del medio y consiste en el paso de la forma levaduriforme a la filamentosa. En general, la morfología levaduriforme predomina durante la colonización de la mucosa en el hospedero sano, y la inhibición del sistema inmune del individuo favorece la morfología filamentosa. Por lo tanto, ambas formas de crecimiento pueden desempeñar un rol importante en la patogénesis y encontrarse en muchos microambientes diferentes en el hospedero (Lusvarghi *et al.*, 2008; Felk *et al.*, 2002; Leng *et al.*, 2001; Aaron, 1998).

El pseudomicelio resulta a partir de células encadenadas originadas por gemación que permanecen unidas a la célula madre y se prolongan con varios grados de elongación. Los pseudomicelios presentan un cuello entre compartimientos celulares adyacentes y pueden tener la forma de un rosario o la apariencia de un filamento. Ahora bien, las hifas verdaderas o micelios se generan a partir de una célula de levadura o como ramificaciones de una hifa ya formada. Los tubos germinativos se inician como evaginaciones que se desarrollan en proyecciones

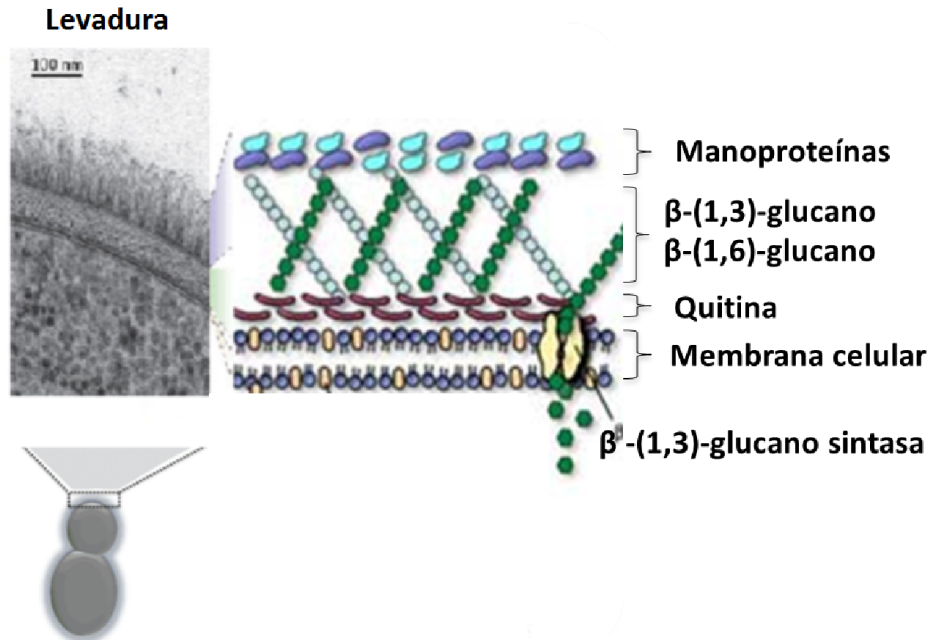
filamentosas. Durante el proceso de formación del tubo germinativo (que al desarrollarse en longitud dará origen al micelio), el núcleo migra de la célula basal hacia el tubo germinativo en formación como se puede observar en la **Figura 1** (Castrillón *et al.*, 2005; Aaron, 1998; Richard *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Ciclo celular de *Candida*. (Sudbery P. 2011; Fotos: Fuente Autor)

**1.1.1 Pared celular.** Las levaduras poseen una pared esencial para la integridad y morfología celular. La rigidez de la pared no solo protege a la célula de condiciones externas adversas sino que también resiste la presión de turgencia del protoplasto y evita la lisis de la célula cuando ocurren descensos en la osmolaridad del medio. De igual forma, actúa como barrera frente a sustancias potencialmente nocivas del medio ambiente y evita que proteínas periplasmáticas sean secretadas al exterior (Chaffin *et al.*, 1998; Chaffin *et al.*, 2008).

La pared celular, que constituye aproximadamente un 30% del peso seco de la célula, está compuesta principalmente por tres clases de polímeros de naturaleza polisacáridica: polímeros de manosa (manano) covalentemente unidos a péptidos (manoproteínas), polímeros de glucosa (glucanos) y un polímero de N-acetilglucosamina (quitina) (**Ver Figura 2**). El glucano de la pared celular está constituido por la unión de moléculas de D-glucosa en configuración beta ( $\beta$ ). Según el tipo de enlace predominante, se puede clasificar al  $\beta$ -glucano en dos tipos de polímeros: el  $\beta$ -1,3-glucano y el  $\beta$ -1,6-glucano. El  $\beta$ -1,3-glucano, es el componente más abundante (80% del total del  $\beta$ -glucano), está constituido aproximadamente por 1500 residuos de glucosa por molécula, y forma una cadena lineal con uniones  $\beta$ -1,3 en su mayor proporción y aproximadamente 3% de ramificaciones unidas mediante enlaces  $\beta$ -1,6. En cuanto a las funciones celulares, la fracción de  $\beta$ -1,3-glucano unida a quitina tiene un papel directo en el mantenimiento de la rigidez y morfología de la pared celular (Chaffin, 2008).



**Figura 2.** Estructura celular de levaduras (Chaffin *et al.*, 2008; Sardi *et al.*, 2013)

**1.1.2 Atributos de virulencia.** Las especies de *Candida* han desarrollado una variedad de atributos de virulencia efectivos y de estrategias específicas que las capacitan para superar las barreras de defensa y causar enfermedad (Castrillón, 2005; Leng, 2001; Yang, 2003). Diversos atributos de virulencia han sido considerados para *C. albicans*: formación de micelio, moléculas de reconocimiento superficiales, cambio fenotípico y la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares (Castrillón, 2005; Yang, 2003). Estas últimas, tienen la capacidad de degradar polímeros que proporcionan nutrientes para el crecimiento de los hongos, así como de inactivar las moléculas útiles en la defensa del organismo. La producción de enzimas hidrolíticas tales como fosfolipasas, hialuronidasas, condroitín-sulfatasa y proteasas de aspartil son atributos de virulencia que favorecen la invasión de tejidos en la Candidiasis (Challacombe *et al.*, 2003; Naglik, 2003; Schaller *et al.*, 2003; Albrecht *et al.*, 2004).

Las aspartil proteasas secretadas (Sap) tienen un papel principal en la patogénesis de *Candida* y han sido ampliamente estudiadas como determinantes clave en su virulencia. La habilidad de causar enfermedad es probablemente un proceso complejo que involucra múltiples interacciones entre *Candida* y el hospedero; la mayoría de los estudios se enfocan en el papel de las Sap, codificadas por la familia de genes SAP1-10 (De Bernardis *et al.*, 1999; Sardi *et al.*, 2013; Yang, 2003).

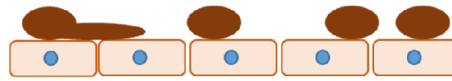
La relación directa entre virulencia y niveles de expresión de las proteasas ha sido descrita por diferentes autores (Chaffin *et al.*, 2008; Naglik *et al.*, 2003; Castrillón *et al.*, 2005; Dostál *et al.*, 2003) y refieren las siguientes observaciones: las pruebas de laboratorio con cepas mutadas de *Candida* incapaces de secretar proteasas demostraron ser menos virulentas o avirulentas; los hospederos infectados con *Candida* presentan proteínas Sap y anticuerpos de Sap en su sitio de infección y además, se ha comprobado que las Sap pueden degradar un amplio rango de substratos, incluyendo proteínas relacionadas con defensas inmunológicas y

estructurales, tales como cadenas pesadas de Inmunoglobulinas, queratina, colágeno acidificado y proteínas de matriz extracelular.

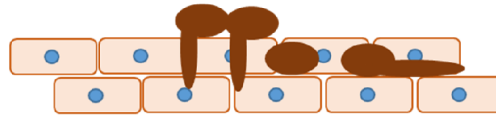
**1.1.3 Patogénesis de la Candidiasis.** Uno de los principales factores que rigen la etiología de la Candidiasis es el estado inmunológico del individuo. En consecuencia, cuando hay alteración en la respuesta inmune, las levaduras normalmente comensales desencadenan la enfermedad infecciosa como una entidad patógena. De hecho, la delgada línea entre la transición comensal-patógeno es atribuida a un extenso repertorio de atributos de virulencia expresados en determinadas condiciones predisponentes (Dostal *et al.* 2003; Monteiro *et al.* 2014). Los diferentes atributos de virulencia se han convertido en estrategias importantes que permiten y facilitan la capacidad de colonizar tejidos, causar enfermedad y superar las defensas del hospedero. Estos atributos son expresados de acuerdo con el tipo de infección (muco-cutánea o sistémica), el sitio, la etapa de infección y la naturaleza de la respuesta inmune del individuo afectado (Naglik *et al.* 2003; Yang 2003).

Según Naglik *et al.*, 2003 las etapas de infección reconocidas en *Candida* son cuatro y dependen de la respuesta inmune del hospedero: etapa 1, colonización de la superficie epitelial; etapa 2, infección a este mismo nivel; etapa 3, infecciones profundas penetrando con mayor severidad en el tejido epitelial, y la etapa 4, genera una infección diseminada por el torrente sanguíneo, continuando la infección en otros tejidos del hospedero (Ver **Figura 3**). De esta manera, se pueden generar casos clínicos letales por este agente infeccioso.

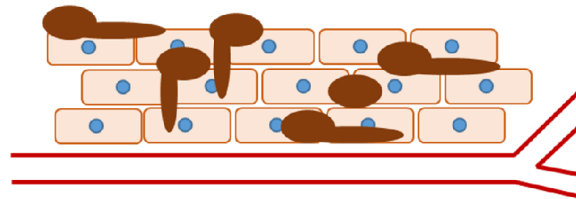
**1. Colonización**  
Adhesión epitelial  
Adquisición de nutrientes



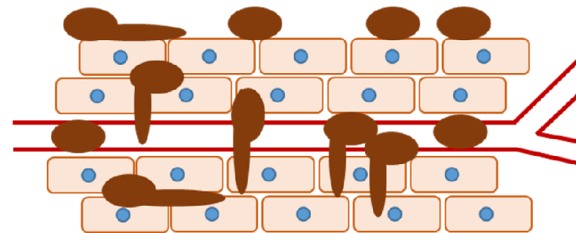
**2. Infección Superficial**  
Penetración epitelial  
Degradación de proteínas



**3. Infección Invasiva**  
Penetración de tejido  
Evasión inmune



**4. Infección Diseminada**  
Adhesión endotelial  
Invasión vascular  
Infección de otros tejidos  
Activación de cascada de coagulación



**Figura 3.** Etapas en la patogénesis de la Candidiasis (Naglik J, *et al.* 2003).

**1.1.4 Tratamiento y resistencia antifúngica.** La decisión de tratar las micosis, con un preparado tópico o sistémico debe ser individualizada y depende del tipo de enfermedad micótica, la extensión de las lesiones y el hongo causal.

Existen diferentes tipos de antifúngicos, entre ellos, los polienos que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, desencadenantes de la muerte celular. La anfotericina B es el agente más conocido de esta familia; es extraído de la bacteria *Streptomyces nodosus* puede comportarse como fungistático o fungicida dependiendo de la sensibilidad del hongo y de la concentración alcanzada en el lugar de la infección, se fija a los esteroides de la membrana de células eucariotas y

tienen una gran afinidad por el ergosterol. Como consecuencia de tal fijación se altera la estructura de la membrana, se origina una despolarización de esta y un aumento de la permeabilidad para protones y cationes monovalentes con pérdida de contenido citoplasmático, conllevando a la muerte celular. Otros polienos de uso común son la nistatina y la natamicina (Allevato, 2007; Maestre *et al.*, 2001).

Los azoles tienen un anillo con átomos de nitrógenos libres unidos mediante enlace C-N a otros anillos aromáticos. La naturaleza de estos anillos modifica las propiedades fisicoquímicas, el efecto terapéutico, la toxicidad, entre otras características. En función del número de nitrógenos que posee el anillo se dividen en imidazoles: miconazol y ketoconazol y triazoles: fluconazol, itraconazol y voriconazol. Tienen actividad fungistática por inhibición de la demetilación del lanosterol de la membrana citoplasmática fúngica al unirse a una de las enzimas del citocromo P-450, ello lleva a la acumulación de metil-esteroles y a la reducción de la concentración de ergosterol, un esteroles esencial para la integridad de la membrana citoplasmática fúngica (Allevato, 2007).

Las alilaminas inhiben la enzima escualeno-epoxidasa y disminuyen la concentración de ergosterol, aumentando los niveles de escualeno. Como consecuencia, aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática, se altera la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo. Entre este tipo de antimicóticos se encuentra terbinafina y naftifina (Maestre, 2001).

En cuanto a los lipopéptidos actúan inhibiendo la síntesis de glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta glucano-sintetasa, enzima responsable de formar este polímero de la glucosa que es esencial para la estructura de la pared de la célula fúngica. La pared se altera y se torna incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que la célula muere. Pertenecen a este grupo las papulacandinas, equinocandinas y los triterpenos glicosilados, productos naturales derivados de los hongos, cuyo efecto es fungicida. Estos agentes no afectan a las células de

mamíferos porque carecen de las enzimas blanco de estos compuestos (Allevato, 2007; Maestre, 2001).

Por otra parte, la incidencia de candidiasis se ha incrementado dramáticamente en los últimos años; sin embargo, la disposición de antimicóticos se ha limitado a quinolonas, algunos azoles y polienos; casi todos tienen una o más limitaciones, como sus efectos adversos, el espectro antimicótico reducido y la escasa penetración a ciertos tejidos. El tratamiento se hace más difícil con el desarrollo de resistencia a algunos de los agentes convencionales y con la mínima actividad fungicida de los azoles (Allevato, 2007).

La resistencia frente a los antimicóticos ha sido ampliamente estudiada en *Candida albicans*, residente en la superficie mucosa de boca, aparato digestivo y sistema urinario en el 15% al 60% de los individuos sanos (Cowen *et al.*, 2002). Martínez, 2002, describe tres posibles mecanismos de resistencia en *Candida spp.*: el primero es la modificación de la enzima diana; el segundo, la incapacidad de alcanzar concentraciones adecuadas del antifúngico en el sitio de acción por la presencia de barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo activo; y por último, la inactivación del antimicótico por modificación del mismo. En particular, la resistencia dada por el aumento del flujo de salida de los agentes antifúngicos se debe a la sobre-expresión de los genes de eflujo, CDR1, CDR2 (familia ABC de proteínas transportadoras de membrana) y MDR1 (mayor familia de proteínas de transporte facilitado) (Sardi *et al.*, 2013).

Asimismo, la eficacia de la terapia antifúngica se encuentra afectada por sustituciones de aminoácidos en la enzima Erg11p (lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilasa), codificada por el gen ERG11, indispensable para la síntesis del ergosterol. La resistencia a los azoles se ha descrito en aislamientos clínicos en los que se demuestra una disminución de la expresión de dicha enzima o la presencia de

mutaciones específicas que la afectan en su estructura o función (Martínez *et al.*, 2002; Sardi, 2011).

## **1.2 NANOTECNOLOGÍA**

En 1974, Norio Taniguchi de la Universidad de Tokio, Japón, definió la nanotecnología como el proceso de separación, consolidación y deformación de los materiales en un átomo o una molécula (Taniguchi, 1974). Actualmente, el programa National Nanotechnology Initiative (NNI) de EE.UU, el cual coordina la investigación y avances en nanotecnología, considera que la tecnología a nanoescala implica el control de la materia a nivel atómico, molecular o macromolecular en la escala de tamaño entre 1-100 nm. Esto permite la creación de estructuras, dispositivos y sistemas con nuevas propiedades (ópticas, biológicas y químicas) en función de su tamaño (Monge, 2009; De la Rosa, 2007).

El surgimiento y progreso de la nanotecnología está ligado al desarrollo de nuevos nanomateriales que no sólo se enfocan en la tecnología sino también en la ciencia. Los estudios en nanotecnología involucran diversas áreas de investigación, desde actividades industriales hasta ciencias aplicadas. Uno de los mayores adelantos en este nuevo campo de las ciencias es la producción y aplicación de nanopartículas a las ciencias biológicas (Liu, 2006; Rai *et al.*, 2009). En la medicina, es especialmente utilizada como herramienta en la administración dirigida de medicamentos, sistemas de entrega de genes, nuevos dispositivos de diagnóstico, en la lucha contra enfermedades como el cáncer y en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (Singh *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2009).

### 1.3 ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE LA PLATA

El uso de la plata como agente antimicrobiano ha sido documentado desde el año 1000 a.C y con el transcurso del tiempo, el interés de su aplicación ha aumentado gracias a la actividad inhibitoria frente a diversos microorganismos (Rai *et al.*, 2009; Ruparelia *et al.*, 2008).

Las propiedades antimicrobianas de la plata fueron evidenciadas desde la antigüedad al utilizar vasos de plata para preservar el agua y el vino. De igual forma, el polvo de plata era considerado por Hipócrates, padre de la medicina moderna, como la posible cura de diversas enfermedades (Ruparelia, 2008; Ayala, 2009).

De esta manera, los compuestos de plata entraron en la práctica médica convirtiéndose en las principales armas contra la infección de heridas en la Primera Guerra Mundial hasta el surgimiento de los antibióticos. En 1884, aparece en Alemania el nitrato de plata como una solución oftálmica para la prevención de la conjuntivitis gonocócica neonatal, que es tal vez el primer uso médico documentado de la plata. Además, por vía tópica la sulfadiazina de plata era el tratamiento estándar antibiótico para las heridas graves, quemaduras y sigue siendo ampliamente utilizado en unidades de quemados (Nair *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008).

La actividad antimicrobiana de la plata se ha asociado a su alta reactividad, lo cual permite unirse fácilmente a diversas moléculas entre estas, al ARN y al ADN. Asimismo, los iones plata interaccionan con grupos tiol y con otros grupos como carboxilatos, fosfatos, hidroxilos, imidazoles y aminas (Monge, 2009). Esta reacción puede ser de forma sencilla o combinada lo que logra alterar procesos vitales para la célula microbiana, entre ellos, la replicación, la síntesis proteica, la producción de ATP y la respiración celular (Monge, 2009; Sardi *et al.*, 2013).

#### 1.4 NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)

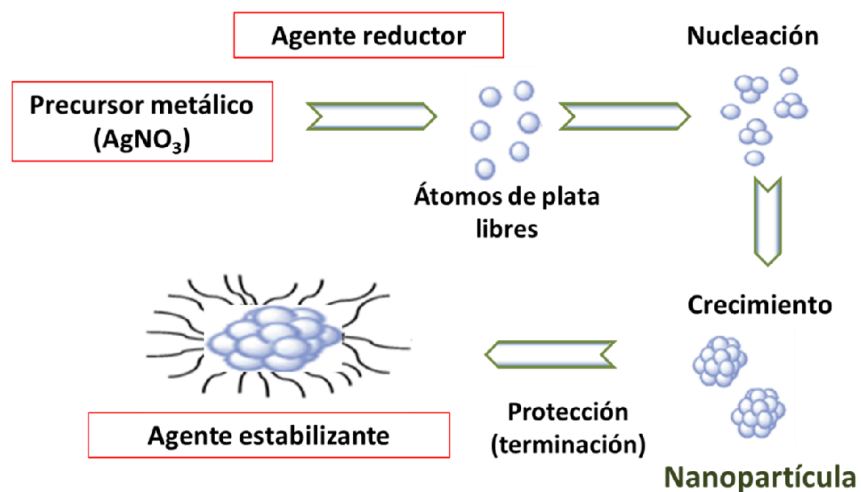
El comité ISO TC 229 WG1, encargado de la estandarización en el área de la nanotecnología principalmente en la terminología, clasificación y nomenclatura, define la nanopartícula como un nano-objeto con al menos una de sus tres dimensiones en el rango de la nanoescala (1–100 nm) (Morones *et al.*, 2005; Rai, 2009).

Las nanopartículas metálicas entre ellas las AgNPs, presentan propiedades diferentes a los materiales a mayor escala sintetizados a partir de los mismos átomos (Solomon *et al.*, 2007). Estas diferencias se hacen notables comparando el color amarillo-marrón de las dispersiones de nanopartículas de plata con la solución incolora de nitrato de plata o la apariencia metálica de la plata metálica. La plata coloidal ó AgNPs presentan especial interés debido a sus propiedades particulares como la conductividad, la estabilidad química, catalítica y la actividad antimicrobiana (Sharma *et al.*, 2009; Pal *et al.*, 2007).

Con el fin de sintetizar nanopartículas, se han desarrollado diversas técnicas físicas o químicas tales como fotorreducción, microemulsión, reducción química, biosíntesis, ablación laser, entre otras (Nair *et al.*, 2007; Noritomi *et al.*, 2010). Cada método tiene sus propias ventajas y limitaciones. Entre los parámetros que están influenciados por el método de síntesis se incluyen: el diámetro promedio de AgNPs y el tamaño, la distribución de tamaño, la forma, la carga superficial, la adición de agentes estabilizantes, rendimiento de la reacción, química de la reacción, y la presencia de impurezas (Solomon, 2007).

La reducción química es el método más frecuentemente aplicado para la preparación de AgNPs, este requiere de tres componentes básicos: precursor metálico ( $\text{AgNO}_3$  el más utilizado), agente reductor y agente estabilizante (Tao *et al.*, 2006; Sondi *et al.*, 2004; Monge, 2009). Durante la formación de las

nanopartículas inicialmente ocurre la reducción de la sal metálica al correspondiente átomo de plata. Los átomos libres actúan como centros de nucleación dando lugar a racimos atómicos. Posteriormente tales racimos se agrupan para permitir el crecimiento molecular y así formar las nanopartículas de plata. Las AgNPs contienen entre 20-15000 átomos de plata (**Ver Figura 4**) (Chen *et al.*, 2008; Monge, 2009).



**Figura 4.** Formación de nanopartículas de plata (Monge, M. 2009).

Se ha establecido que la plata y las AgNPs en una solución acuosa producen la liberación de iones de plata, los cuales son biológicamente activos y con efecto microbicida. Sin embargo, un estudio comparativo entre AgNPs, nitrato de plata y cloruro de plata, reveló que las AgNPs tienen mayor actividad antimicrobiana que los iones de plata libre. Se ha propuesto como mecanismo alternativo que las AgNPs interactúan con la pared celular de la célula microbiana, provocando la lisis de la misma. Este hecho conlleva a una mayor permeabilidad en la pared celular dejando a la célula incapaz de la regulación del transporte a través de la membrana plasmática, lo que culmina con la muerte celular (Sondi, 2004; Morones, 2005; Choi, 2008).

Por otra parte, como resultado de estudios comparativos entre el efecto de AgNPs sobre microorganismos resistentes y susceptibles a antimicrobianos, se ha establecido que las AgNPs no se unen selectivamente a algunas proteínas, sino a un amplio espectro de dianas que incluyen la membrana, proteínas citoplasmáticas y ácidos nucleicos (Ayala *et al.*, 2009; Noorbakhsh *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2009). Actualmente, el mecanismo más aceptado de acción de las AgNPs es que éste se da por un efecto combinado, en el que cada mecanismo propuesto (interacción con la pared celular, ADN, ARN y enzimas respiratorias) contribuye a proporcionar una mayor actividad biocida (Chaloupka *et al.* 2010).

Existen numerosos estudios que demuestran el efecto antifúngico de las AgNPs, Noorbakhsh *et al.*, 2011 estudiaron el efecto de las AgNPs de forma individual y en combinación con antifúngicos como fluconazol y griseofulvina frente a *Trichophyton rubrum*. Los resultados demostraron que las AgNPs inhibieron el crecimiento del hongo en concentraciones de 10 µg/ml. De esta forma, presentaron una menor inhibición que la griseofulvina (0.8 µg/ml), pero mayor eficiencia que el fluconazol (40 µg/ml). Además, la actividad inhibitoria de los antifúngicos fue incrementada en presencia de las AgNPs.

Nasrollahi *et al.*, 2011, investigaron los efectos antimicóticos de AgNPs sobre *Candida albicans* ATCC 5027 y *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4005027, el estudio determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI<sub>50</sub>) de las AgNPs en 0.5 µg/mL y sugirió mayor investigación sobre el efecto sinérgico de las nanopartículas con antimicóticos convencionales.

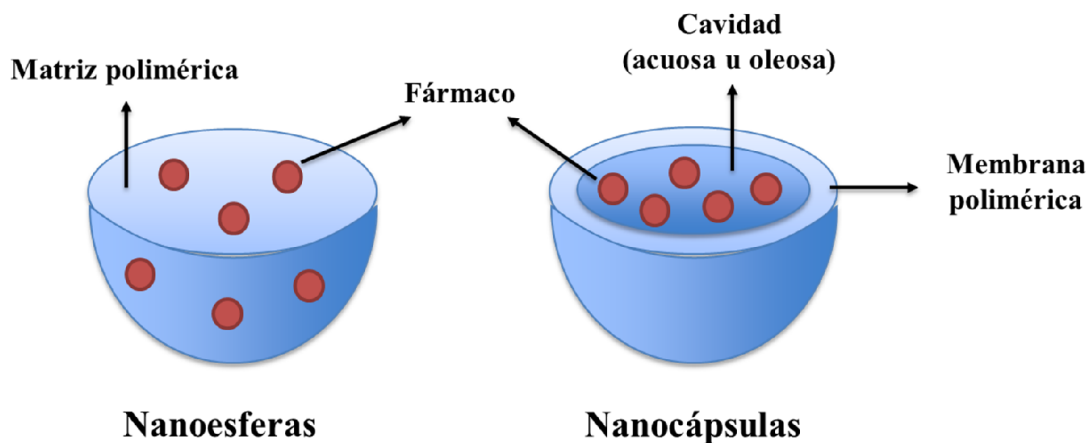
Panacek *et al.*, 2009, estudiaron la actividad antifúngica de las nanopartículas de plata frente a *Candida spp.* Por medio de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración mínima fungicida (CMF) y ensayos de citotoxicidad de las AgNPs en fibroblastos humanos. Se demostró un efecto inhibitorio contra las levaduras en concentraciones de 0.21 mg/L de AgNPs. En

contraste, la plata iónica inhibió el crecimiento de las levaduras en concentraciones comparables al nivel citotóxico (aprox. 1 mg/L).

## 1.5 ENCAPSULACIÓN DE AgNPs UTILIZANDO BIOPOLÍMEROS

La encapsulación desde un punto de vista físico, se puede definir como la incorporación de una molécula, fármaco o proteína en una red de agregación de polímero/s mediante distintos tipos de procesos de fabricación (Pinto *et al.*, 2006). En los últimos años las nanopartículas o micropartículas poliméricas biodegradables han sido propuestas como nuevos sistemas transportadores de fármacos, moléculas biológicamente activas. Todo ello ha sido posible por las grandes posibilidades que ofrecen estos sistemas para mejorar la eficacia o solucionar problemas relacionados con la administración de distintos tipos de moléculas en los seres vivos (Mora *et al.*, 2010). La encapsulación permite entre otras ventajas, mejorar la eficacia y aumentar el tiempo de permanencia del fármaco en el lugar de aplicación. Por otro lado, disminuye la toxicidad de los fármacos y permite dirigir en este caso, las nanopartículas de manera específica mediante modificación con ligandos (Neufeld *et al.*, 2006).

Los nanocompuestos se pueden obtener mediante dos tipos de encapsulación: nanocápsulas o nanoesferas (**Ver Figura 5**) y es posible diferenciarlas por su organización estructural (Kumari *et al.*, 2010). En el primer caso, las nanoesferas son de tipo matricial, donde el principio activo queda intercalado en la matriz formada por el biopolímero. El principio activo puede ser absorbido en la superficie de la esfera o encapsulado dentro de la partícula. Las nanocápsulas, en cambio, son sistemas vesiculares en los que el fármaco se localiza en el interior de la partícula, generalmente disuelto en un vehículo oleoso y rodeado por la membrana polimérica (Mora *et al.*, 2010).



**Figura 5.** Organización estructural de las Nanoesferas y Nanocápsulas (Lima, 2013).

Entre los biopolímeros empleados para encapsular principios activos se destacan: el ácido poli-láctico (PLA), el ácido poli-láctico-co-glicólido (PLGA) y el quitosano. El PLGA es actualmente uno de los polímeros biodegradables más empleados como nanotransportadores puesto que por hidrólisis en fluidos corporales se degrada en sus dos monómeros, ácido láctico y ácido glicólico que no tienen efectos tóxicos asociados a su administración en la liberación controlada de fármacos (Danhier *et al.*, 2012). Las principales estrategias empleadas en la preparación de nanocápsulas de PLGA incluyen: los métodos por emulsificación-difusión, emulsión del solvente-evaporación, deposición interfacial y el método de nanoprecipitación (Kumari *et al.*, 2010; Mora *et al.*, 2010).

En cuanto al polímero PLA, es ampliamente utilizado como nanotransportador, pues las unidades libres de ácido láctico funcionan como un intermediario natural en el metabolismo de los carbohidratos. Al igual que los métodos de preparación del PLGA, la formación de nanocápsulas de PLA tiene como clave la eliminación del solvente en el que se disuelva el ácido. Por lo tanto, las principales estrategias de preparación de nanocápsulas de PLA incluyen evaporación del solvente,

desplazamiento del solvente, “salting out” y difusión del solvente (Kumari *et al.*, 2010).

En relación con el quitosano, es un biopolímero hidrosoluble capaz de formar películas, fibras, hidrogeles, micro y nanopartículas en condiciones y medio ácido suaves. El carácter policationico le atribuye alta afinidad para asociar moléculas terapéuticas a las cuales protege de la degradación hidrolítica y enzimática. Entre las metodologías más frecuentes para preparar nanopartículas a base de quitosano se encuentran: precipitación, entrecruzamiento covalente y gelificación ionotrópica utilizando tripolifosfato pentasódico (TPP) (Vimal *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2009).

## **1.6 CITOTOXICIDAD**

La citotoxicidad relacionada principalmente al daño generado en las células no microbianas, es una gran preocupación en el desarrollo de nuevos fármacos. En un esfuerzo para evitar la interacción directa entre la superficie de las nanopartículas y las células mamíferas, las nanopartículas de metal y otros nanomateriales como los puntos cuánticos o los nanotubos de carbono, pueden ser modificados mediante una barrera polimérica. Esta modificación es una estrategia eficaz para prevenir la toxicidad inherente derivada del núcleo del nanomaterial (Schrand *et al.*, 2008; Nafee *et al.*, 2009).

La formación de una barrera de protección interfacial entre el núcleo metálico y las células, es importante para prevenir la alteración de células y tejidos sanos circundantes. Además, se ha demostrado que aún con la incorporación de AgNPs en barreras poliméricas como quitosano, PLA: ácido poliláctico o PLGA: ácido poli(láctico-co-glicólico) no se altera su actividad antimicrobiana. En otros estudios se ha encontrado que la interacción de nanopartículas de plata con polímeros crea

dispersiones más estables en solución, lo cual es importante para las aplicaciones biomédicas de interés (Schrand *et al.*, 2008).

A partir de los diversos estudios de citotoxicidad sobre células mamíferas como las células germinales C18-4 (Braydich *et al.*, 2005); células hepáticas BRL 3A (Rai *et al.*, 2009) y la línea de células neuroendocrinas PC-12, es un hecho notorio que la exposición a las nanopartículas de plata disminuye significativamente la función mitocondrial, paso inicial y fundamental hacia la apoptosis (Monge, 2009).

Rai y colaboradores 2004, en un estudio con la línea celular hepática: BRL 3A, observaron disminución del nivel de glutatión reducido (GSH) y un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS). Recientemente, se ha documentado que los iones  $Ag^+$  alteran la función de la mitocondria a través de interacciones con los grupos tiol de su membrana interna. Asimismo, se ha descrito interacción con enzimas como la tiorredoxina, glutatión, SOD y la tiorredoxina peroxidasa, las cuales están involucradas en la neutralización del estrés oxidativo. Las nanopartículas de plata pueden agotar el mecanismo de defensa antioxidante, lo que conduce a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y a la posterior alteración de la célula hasta su muerte.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto antifúngico de nanopartículas de plata frente a especies patógenas de *Candida*.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Seleccionar la mejor estrategia de síntesis de AgNPs con posible actividad antifúngica.
- ✓ Seleccionar las AgNPs con mejores características físicas, químicas y actividad antifúngica sobre especies de *Candida*.
- ✓ Evaluar la encapsulación en biopolímeros como estrategia para mejorar la actividad antifúngica y disminuir el efecto citotóxico de las AgNPs.
- ✓ Evaluar el efecto de las AgNPs sobre la pared celular y secreción de proteasas en *Candida spp.*

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 REACTIVOS Y CEPAS FÚNGICAS

**3.1.1 Reactivos.** Todos los reactivos empleados fueron grado analítico y se utilizaron sin purificación adicional. El nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ , 99.98%), la L-cisteína ( $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$ , >99%), el monohidrato de hidracina ( $\text{H}_2\text{NNH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 98+%), el Citrato de sodio ( $\text{Na}_3\text{C}_3\text{H}_5\text{O}(\text{COO})_3$ , 99%) y el medio de cultivo Saboraud 2% Dextrosa Agar (SDA) fueron adquiridos de Merck (Darmstadt, Alemania). El Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, 99%), el ácido tánico ( $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$ , 99%), el reactivo fenólico Folin Ciocalteu (2N), el medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), el fluconazol ( $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_6\text{F}_2\text{O}$ ) y el Polivinil alcohol (PVA, 99%) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri). Para todos los ensayos se empleó agua desionizada.

### 3.1.2 Cepas Fúngicas y medios de cultivo

#### Cepas ATCC

- ✓ *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (cepa de referencia para validación del ensayo antifúngico estandarizado por el CLSI) fue adquirida de Microbiologics® (USA).
- ✓ *Candida albicans* ATCC 10231 (Genital Pathogens QC) fue donada por la Escuela de Microbiología de la Universidad Industrial de Santander.

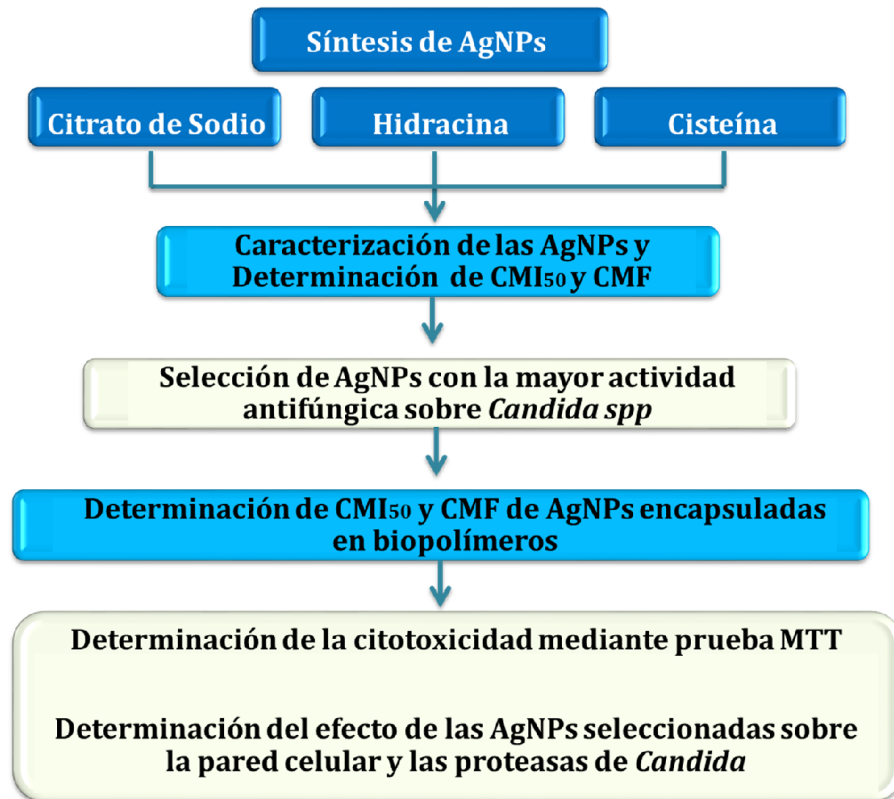
#### Aislamientos clínicos de *Candida*

- Los aislamientos de *Candida* provienen de muestras de lesiones cutáneas analizadas en la Escuela de Microbiología de la Universidad Industrial de Santander. Los aislados fúngicos se seleccionaron para el estudio teniendo en cuenta los siguientes criterios de inclusión:
  1. Especies aisladas de pacientes con candidiasis cutánea.
  2. Especies con resistencia antimicótica o con sensibilidad disminuida frente a un antifúngico de rutina como fluconazol.
  3. Especies de *Candida* de importancia clínica, de mayor prevalencia en Candidiasis mucocutánea.

Todos los cultivos de *Candida* se realizaron en agar Sabouraud al 2% de Dextrosa (SDA) a 35°C. Los ensayos de sensibilidad antifúngica se llevaron a cabo en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) con L-glutamina y sin bicarbonato de sodio, ajustado a pH 7±0.1 y con 0.2% de glucosa, de acuerdo con la norma M27-A3 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

### 3.2 METODOLOGÍA

La metodología general planteada para la ejecución del proyecto se describe en el **Esquema 1**.



**Esquema 1.** Metodología general empleada en el desarrollo del proyecto de investigación

#### 3.2.1 SÍNTESIS DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA (AgNPs)

Las condiciones de síntesis de AgNPs empleadas para el desarrollo del presente trabajo y descritas a continuación, corresponden a las condiciones seleccionadas luego del proceso de estandarización realizado en el Grupo de investigación de Bioquímica y Microbiología (GIBIM) de la Universidad Industrial de Santander (UIS) (Paredes, 2011).

### **3.2.1.1 Síntesis mediante reducción con Cisteína**

La síntesis de AgNPs se realizó de acuerdo con lo descrito por Khan *et al.*, 2009. A partir del  $\text{AgNO}_3$  (0.01M) se realizó la reducción química empleando cisteína (0,01M) en presencia del agente estabilizante CTAB (0.01M). Posteriormente, se adicionó PVA a una concentración final de 0.02% (w/v). Finalmente, la reacción se expuso a sonicación durante dos horas. La síntesis fue llevada a cabo a temperatura ambiente y en presencia de luz. La observación del color rojo-naranja en la suspensión indicó la formación de AgNPs. La suspensión coloidal obtenida se almacenó en frascos transparentes a temperatura ambiente.

### **3.2.1.2 Síntesis mediante reducción con Citrato de Sodio**

Inicialmente fueron precalentadas a 60°C la solución de  $\text{AgNO}_3$  (solución 1) y la mezcla de citrato de sodio – ácido tánico (preparada a una relación 100:1) (solución 2). Luego, fue adicionado gota a gota la solución 1 sobre la solución 2 bajo condiciones de vigorosa agitación magnética. Posteriormente, se dejó en ebullición a 300°C durante 30 minutos mientras se observó una transición de coloración hacia un tono verdoso. La suspensión coloidal final contenía  $\text{AgNO}_3$  (0.59 mM), citrato de sodio (5.5 mM) y ácido tánico (47.8  $\mu\text{M}$ ) (Kumar *et al.*, 2007). La suspensión de AgNPs fue almacenada en frascos ámbar a 4°C.

### **3.2.1.3 Síntesis mediante reducción con Hidracina.**

La síntesis de AgNPs consistió en mezclar  $\text{AgNO}_3$ , CTAB e Hidrato de hidracina en un matraz con agitación magnética suave, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. La reacción fue sometida a sonicación durante dos horas. La aparición de una coloración amarilla indicó la formación de las nanopartículas. La suspensión final contenía  $\text{AgNO}_3$  (0.6 mM), CTAB (0.6 mM) e hidrato de hidracina (0.6 mM)

en un volumen de 20 mL. Las suspensiones coloidales de AgNPs se almacenaron en frascos ámbar a temperatura ambiente.

### **3.3 ENCAPSULACIÓN DE AgNPs UTILIZANDO BIOPOLÍMEROS**

La encapsulación de las AgNPs de forma independiente con PLGA (ácido poli-láctico-co-glicólido) y PLA (ácido poli-láctico) fue realizada empleando la técnica de doble emulsión-evaporación de solvente. Inicialmente, se preparó la primera emulsión: fue disuelto el polímero en diclorometano y se adicionó la muestra de AgNPs seleccionada por sus características físico-químicas y actividad antifúngica. Esta primera emulsión de polímero-AgNPs se homogenizó a 3000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente, se preparó la segunda emulsión, la cual consistió en adicionar la emulsión 1 sobre una solución de polietilimina (PEI 0.25%) y poloxamer (0.5%). Seguidamente, se homogenizó a 15.500 rpm durante 10 minutos. Finalmente, la emulsión obtenida fue rotoevaporada durante 1 hora con el objetivo de retirar el solvente empleado y la solución obtenida fue centrifugada en filtros amicon hasta retirar el exceso de polímero y purificar los encapsulados (Bennewitz *et al.*, 2011).

La encapsulación de AgNPs en quitosano se realizó mediante la técnica de gelificación ionotrópica utilizando tripolifosfato pentasódico (TPP). Se disolvió el quitosano en solución de ácido acético al 2% y se aplicó agitación magnética durante 12 horas. Las partículas de quitosano no disueltas se filtraron. Posteriormente, se agregó gota a gota la suspensión de AgNPs y seguidamente se adicionó la solución acuosa de TPP. Todo se realizó a temperatura ambiente. La reacción se dejó durante dos horas y fue centrifugada. Las nanopartículas obtenidas en el sedimento fueron lavadas y resuspendidas para su posterior caracterización (Vimal *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2009).

### 3.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS

La caracterización fisicoquímica de las nanopartículas se realizó mediante las siguientes técnicas analíticas:

**Espectrofotometría UV-VIS.** Se basa en el análisis de la cantidad de radiación electromagnética en el rango de longitudes de onda del ultravioleta y visible (380-780 nm) que puede absorber o transmitir una muestra en función de la concentración de la sustancia presente.

**Dispersión de luz en modo dinámico (DLS).** También llamada espectroscopía de correlación fotónica o cuasi-elástica de dispersión de luz. Es una técnica en la física que se puede utilizar para determinar la distribución de tamaño de partículas pequeñas en suspensión o polímeros en solución.

**Potencial Zeta.** Es un término científico para el potencial electrocinético en los sistemas coloidales. En la literatura de la química coloidal, se denota generalmente con la letra griega zeta. Desde un punto de vista teórico, el potencial zeta es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria de fluido unido a la partícula dispersada, entendiéndose esto como la carga superficial de las partículas.

**Absorción Atómica.** La espectroscopia de absorción atómica con llama es el método más empleado para la determinación de metales en una amplia variedad de matrices. En este método la muestra es directamente aspirada a una llama de flujo laminar. La llama tiene como función generar átomos en su estado fundamental de los elementos presentes en la muestra. Temperaturas cercanas a los 1.500–3.000°C son suficientes para producir la atomización de un gran número de elementos, los que absorberán parte de la radiación proveniente de la fuente luminosa.

**Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).** Es un instrumento que permite observar la topografía de una muestra utilizando los electrones secundarios producidos por la interacción de un haz de electrones de alta energía con la muestra. Además de la emisión de electrones secundarios, la interacción haz–

muestra produce otras señales como: retrodispersión de electrones, producción de rayos X, electrones Auger, cátodo luminiscencia, etc. Los microscopios electrónicos recientes combinan una serie de detectores para analizar las distintas señales que se generan. Las principales utilidades del SEM son la alta resolución y la gran profundidad de campo que resuelve una imagen tridimensional de la muestra.

**Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).** Permite la observación de la muestra en cortes ultrafinos. El TEM dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada del espécimen. Es una herramienta importante para la caracterización estructural de materiales nanoestructurados, de los cuales se puede obtener no solo información morfológica, de nuestro interés, sino también cristalográfica y de composición química con la ayuda de la espectroscopia de dispersión de energía de rayos-X (EDS).

En resumen, las nanopartículas sintetizadas se caracterizaron por Espectrofotometría UV-Vis en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1601-1601 PC, utilizando un barrido de 300 nm a 600 nm. Dispersión de luz en modo dinámico (DLS) y determinación del Potencial zeta con el equipo Malvern Zetasizer Nano-ZS, utilizando un volumen de muestra de 1.5 mL de la suspensión de nanopartículas en un intervalo de concentración de 100-200 ppm. También, las AgNPs se caracterizaron mediante Microscopía Electrónica de Barrido en modo TEM (S-TEM) en el laboratorio de Microscopía del Parque Tecnológico de Guatiguará (PTG) de la Universidad Industrial de Santander. Finalmente, las AgNPs se caracterizaron mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) en el Centro de Investigación de Materiales (CCMR), de la Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York (USA) y en la Universidad Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (Brasil); c) La fase cristalina de las AgNPs (cisteína) se determinó por Difracción de Rayos X (**Ver anexo 1**) utilizando un equipo difractómetro Philip a una velocidad de barrido de  $0.02 \text{ s}^{-1}$  en un intervalo de  $2\theta$  de  $20^\circ$  a  $80^\circ$  con radiación  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ).

### 3.5 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI<sub>50</sub>)

La CMI<sub>50</sub> se consideró como la menor concentración de AgNPs capaz de reducir la concentración microbiana en un porcentaje  $\geq 50\%$  con respecto al control de crecimiento sin AgNPs. El ensayo antifúngico se llevó a cabo bajo la metodología propuesta por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008) en el documento M27-A3 donde se describe la estandarización de las pruebas de sensibilidad antifúngica para las levaduras. Los cultivos de *Candida* se realizaron en agar SDA al 2% a 35°C/48 h. El inóculo se ajustó de acuerdo al protocolo a una concentración final de  $0.5 - 2.5 \times 10^3$  UFC/mL con solución salina estéril 0.85% (w/v) y medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) con L-glutamina, sin bicarbonato de sodio y con 0.2% de glucosa. El medio se ajustó a pH  $7 \pm 0.1$ . La interpretación de los resultados se realizó teniendo en cuenta la escala de lectura visual descrita en el documento M27-A3, con especial interés en la escala 2 que corresponde a la considerable reducción de la turbidez (50% de inhibición) con respecto al control de crecimiento.

Las concentraciones evaluadas de AgNPs libres y encapsuladas en polímeros fueron 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5  $\mu\text{g/mL}$ . La mezcla de inóculo-AgNPs se realizó en microplacas de 96 pozos en relación 1:1 y se incubaron a 35°C. Así mismo, se procedió con el control de sensibilidad antifúngica: fluconazol, el cual se empleó en un rango de concentraciones de 0.5 – 64  $\mu\text{g/mL}$ . La lectura visual se realizó a las 0, 24 y 48 h. Se realizaron más de 3 experimentos independientes por duplicado con los correspondientes controles de esterilidad del medio de cultivo y controles de crecimiento (sin exposición a antimicrobianos).

### **3.6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA FUNGICIDA (CMF)**

A partir de la CMI<sub>50</sub> seleccionada para cada cepa fúngica y sus concentraciones mayores, se tomó una alícuota de 100 µl de cada una de estas concentraciones y se resuspendieron en 900 µl de caldo de cultivo RPMI 1640 con el fin de revitalizar las células fúngicas existentes. Los cultivos se incubaron a 35°C durante 24 horas. Posteriormente, se tomó una alícuota de cada tubo y se realizó la siembra en cajas petri con SDA al 2% con el fin de corroborar la ausencia de crecimiento fúngico. Estas placas inoculadas se incubaron durante 48 horas a 35°C. Se consideró la CMF como la menor concentración de nanopartículas que produjo una reducción de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) >99,9% en comparación con el inóculo sin tratamiento con AgNPs.

### **3.7 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD**

La prueba de citotoxicidad fue realizada en el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la Universidad Industrial de Santander.

#### **3.7.1 Línea celular de mamífero**

Se emplearon células tipo fibroblasto murino NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™) las cuales fueron mantenidas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivo (SFBI, Hyclone) a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

#### **3.7.2 Ensayo MTT**

Los fibroblastos NIH/3T3 fueron tratados con diferentes concentraciones de AgNPs (1.1 – 3.3 – 10 – 30 µg/mL). Las células control fueron mantenidas sin exposición a

nanopartículas. La citotoxicidad fue determinada por el método colorimétrico de MTT (Bromuro de 3 (4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico) (Carmichael *et al.*, 1988; Shanmugasundaram *et al.*, 2013). El MTT es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial de las células mamíferas viables a su forma insoluble, formazán. El compuesto formazán queda retenido en las células y es liberado mediante su solubilización química. La cantidad de MTT reducido fue cuantificado mediante espectrofotometría a 580 nm empleando un lector de microplacas (Multiskan Go). El porcentaje de citotoxicidad fue calculado mediante la fórmula: % citotoxicidad =  $100 * (DO \text{ grupo control} - DO \text{ grupo tratado}) / DO \text{ grupo control}$ . La citotoxicidad fue expresada como la concentración tóxica de la muestra para el 50% y 90% de las células (CC<sub>50</sub>, CC<sub>90</sub>) calculados por regresión sigmoideal utilizando el software Mxlfite™ (ID Business Solution, UK); Los ensayos fueron realizados por triplicado.

Para los ensayos de citotoxicidad se consideraron como variable dependiente el número de células mamíferas empleadas y la Densidad óptica (DO) producto de la reducción del compuesto MTT, y como variables independientes las formulaciones de AgNPs libres y encapsuladas en el polímero seleccionado, PLGA. En el **cuadro 1** se observan las variables medibles que se tuvieron en cuenta para el análisis de citotoxicidad.

**Cuadro 1.** Variables de análisis para el ensayo de citotoxicidad

Nombre de la variable	Definición	Naturaleza
Concentración Citotóxica 50 (CC <sub>50</sub> )	Concentración mínima del compuesto que disminuyó 50% la viabilidad celular con respecto al control (células sin tratamiento)	Cuantitativa
Concentración Citotóxica 90 (CC <sub>90</sub> )	Concentración mínima del compuesto que disminuyó 90% la viabilidad celular con respecto al control (células sin tratamiento)	Cuantitativa

### **3.8 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS AgNPs SOBRE LA PARED CELULAR FÚNGICA**

El efecto de las AgNPs sobre la pared celular de *Candida* fue evidenciado mediante Microfotografías que permitieron observar la interacción levadura-AgNPs. Los ensayos se llevaron a cabo en el laboratorio de Quimioterapia antifúngica del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sao Paulo, Brasil y en el Laboratorio de Biología Celular de Hongos del Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho de la Universidad Federal de Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil. En estos laboratorios se realizó Microscopía de fluorescencia con blanco de calcoflúor y DAPI, Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) para las células tratadas con AgNPs y los respectivos controles (sin tratamiento con AgNPs).

Inicialmente fueron preparadas las muestras de Levadura-AgNPs a las concentraciones previamente determinadas como CMI<sub>50</sub>. Posteriormente se realizó fijación química con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5% durante 30 minutos para las muestras de fluorescencia y 1 hora para las muestras de Microscopía electrónica (SEM y TEM). Una vez fijadas las células, se continuó con el procesamiento respectivo para el análisis por cada tipo de Microscopía. Los protocolos empleados se encuentran en detalle en el **anexo 2** (Protocolos de Microscopía).

### **3.9 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DE PROTEASAS**

#### **3.9.1 Ensayo cualitativo de inhibición de proteasas**

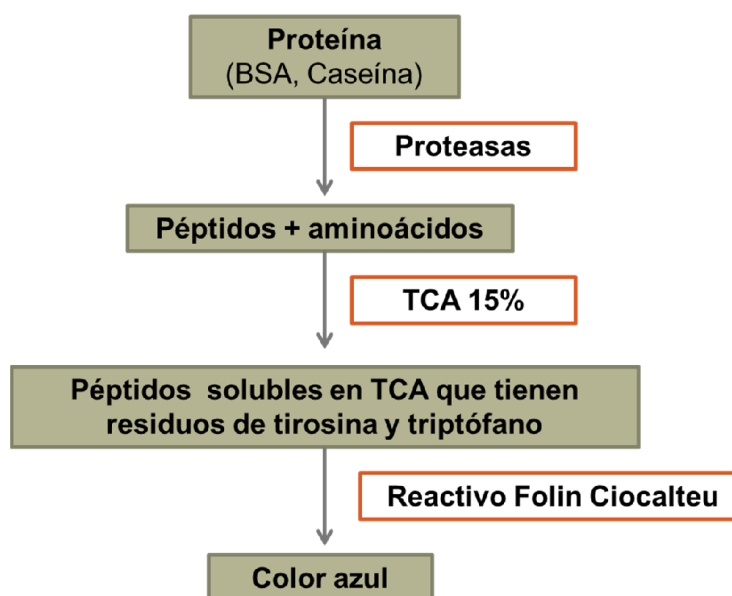
El ensayo cualitativo para evaluar la producción e inhibición de Proteasas aspárticas secretadas (Sap), fue llevado a cabo mediante modificación de la metodología

propuesta por Dostál *et al.*, 2003. Inicialmente fueron realizados cultivos líquidos de *Candida* en el medio YPD (Extracto de levadura 1%, Peptona 2%, Dextrosa 2%) con una concentración sub-inhibitoria de AgNPs y se incubaron a 35°C durante 8-10 horas. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se realizó la prueba de hidrólisis en un medio de cultivo enriquecido con una fuente proteica. De esta manera, fue seleccionado el medio Base Carbón Levadura (YCB) suplementado con Albúmina de Suero Bovino (BSA) al 0.1%, pH: 5.0. Las placas se incubaron por 24-48 horas a 35 °C. La aparición de halos de aclaramiento en el agar, evidenció la hidrólisis enzimática de la proteína debido a las Sap secretadas en el medio de cultivo. Como control de producción de Sap fue preparado un cultivo de *Candida* sin tratamiento con AgNPs.

### **3.9.2 Ensayo cuantitativo de inhibición de proteasas**

Para determinar el efecto inhibitorio de las AgNPs sobre la secreción de Sap, se realizaron modificaciones de Chand *et al.* 2011. A partir un cultivo de *Candida* en medio YPD (Extracto de levadura 0.25%, Peptona 0.5%, Dextrosa 0.25%) a 35°C/Overnight en presencia de una fuente proteica como BSA 0.1%. Se procedió a centrifugar el cultivo y se adicionó 100 µL de sobrenadante en 900 µl de buffer citrato 0.1M pH: 3.2 suplementado con BSA al 0.1%. Se incubó a 35°C y la reacción de hidrólisis fue detenida con ácido tricloroacético (TCA al 15%) a intervalos de 1 minuto hasta 4 minutos para encontrar el tiempo de mayor hidrólisis. La producción de las proteasas fue evidenciada mediante la liberación de péptidos y aminoácidos producto de la actividad hidrolítica. Los péptidos liberados solubles en TCA que tienen residuos de tirosina y triptófano fueron cuantificados colorimétricamente a 750 nm mediante la reducción del Reactivo de Folin Ciocalteu (Ver **Esquema 2**). A partir de una curva patrón de tirosina, fue determinada la Unidad de actividad proteolítica, definida como la cantidad de enzima capaz de catalizar la conversión de 1 µmol de sustrato por minuto. Las Unidades/mL de enzima fue calculado

mediante la fórmula: U/mL de enzima = ( $\mu$ mol tirosina liberada x Volumen total del ensayo (mL))/ (Volumen de enzima utilizada (mL) x Tiempo de ensayo (min) x Volumen utilizado en medición colorimétrica (mL)).



**Esquema 2.** Ensayo cuantitativo para determinar actividad proteolítica de Sap (Chand, R *et al.* 2011).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE *Candida*

Teniendo en cuenta el primer criterio de inclusión de las cepas de *Candida* mencionado en el numeral 3.1.2, se preseleccionaron 8 cepas; a partir de estas, se procedió con la selección de acuerdo con la sensibilidad disminuida o resistencia antifúngica presentada frente a fluconazol. En consecuencia, fueron elegidas 5 cepas de *Candida* sobre las cuales fueron desarrollados gran parte de los experimentos programados de actividad antifúngica de los nanocompuestos. En la

**tabla 1** se evidencia los resultados obtenidos mediante la prueba de sensibilidad para levaduras y se resalta en negrilla las cepas seleccionadas. La CMI<sub>50</sub> correspondió a la escala 2 de lectura visual, donde se evidenció considerable reducción de turbidez (50% de inhibición) con respecto al control de crecimiento.

**Tabla 1.** Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI<sub>50</sub>) de fluconazol frente a las cepas de *Candida* preseleccionadas para el estudio. El ensayo fue realizado mediante microdilución en caldo RPMI, pH 7±0.1 y el inóculo evaluado fue de 0.5 – 2.5x10<sup>3</sup> UFC/mL, de acuerdo al protocolo para levaduras M27-A3 del CLSI.

Especie de <i>Candida</i>	CMI <sub>50</sub> de Fluconazol (µg/mL)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	2
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	16
<i>C. guilliermondii</i>	4
<i>C. krusei</i>	64
<i>C. glabrata</i>	64
<i>C. tropicalis</i>	1
<i>C. parapsilosis</i>	1
<i>C. albicans</i>	1

Con el fin de conocer la clasificación de sensibilidad frente a fluconazol de las cepas de *Candida* seleccionadas para el estudio, en la **tabla 2** se exponen los puntos de corte según el CLSI (2008) para levaduras frente al antifúngico azólico. Los puntos de corte son valores de CMI específicos que permiten clasificar los hongos en las categorías: Sensible, Sensible dependiente de la Dosis y Resistente.

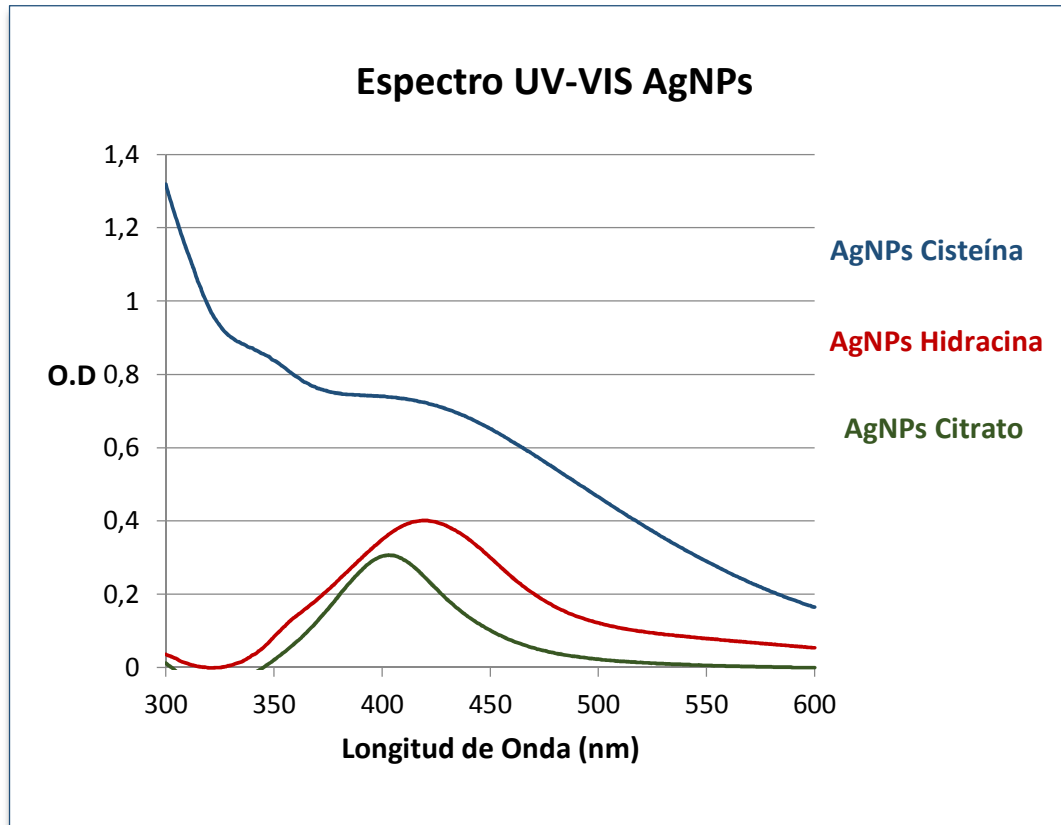
**Tabla 2.** Puntos de corte recomendados por el CLSI (M27 – A3) para levaduras frente a Fluconazol.

Antifúngico	Sensible	Sensible Dosis Dependiente (S-DD)	Resistente
Fluconazol	≤8 µg/mL	16-32 µg/mL	≥64 µg/mL

De acuerdo con los puntos de corte del CLSI, las cepas de *Candida* seleccionadas para el presente estudio, se clasificaron como Resistentes (*C. glabrata* y *C. krusei*), Sensible Dosis Dependiente (*C. albicans*) y Sensibles (*C. guilliermondii* y *C. parapsilosis*).

#### 4.2 CARACTERIZACIÓN DE AgNPs

En la **Figura 6** se presentan los espectros de absorción UV-Vis de las AgNPs sintetizadas y se observa que los espectros fueron los esperados de acuerdo con el agente reductor utilizado. Se evidenció el “hombro” de absorción en la región comprendida entre 400 – 430 nm producto de la resonancia de plasmón superficial de las AgNPs sintetizadas con Cisteína como agente reductor. Los espectros de absorción correspondiente a la síntesis de AgNPs con citrato de sodio y con hidracina fueron los esperados y presentaron un máximo de absorción característico para AgNPs alrededor de 410 nm.

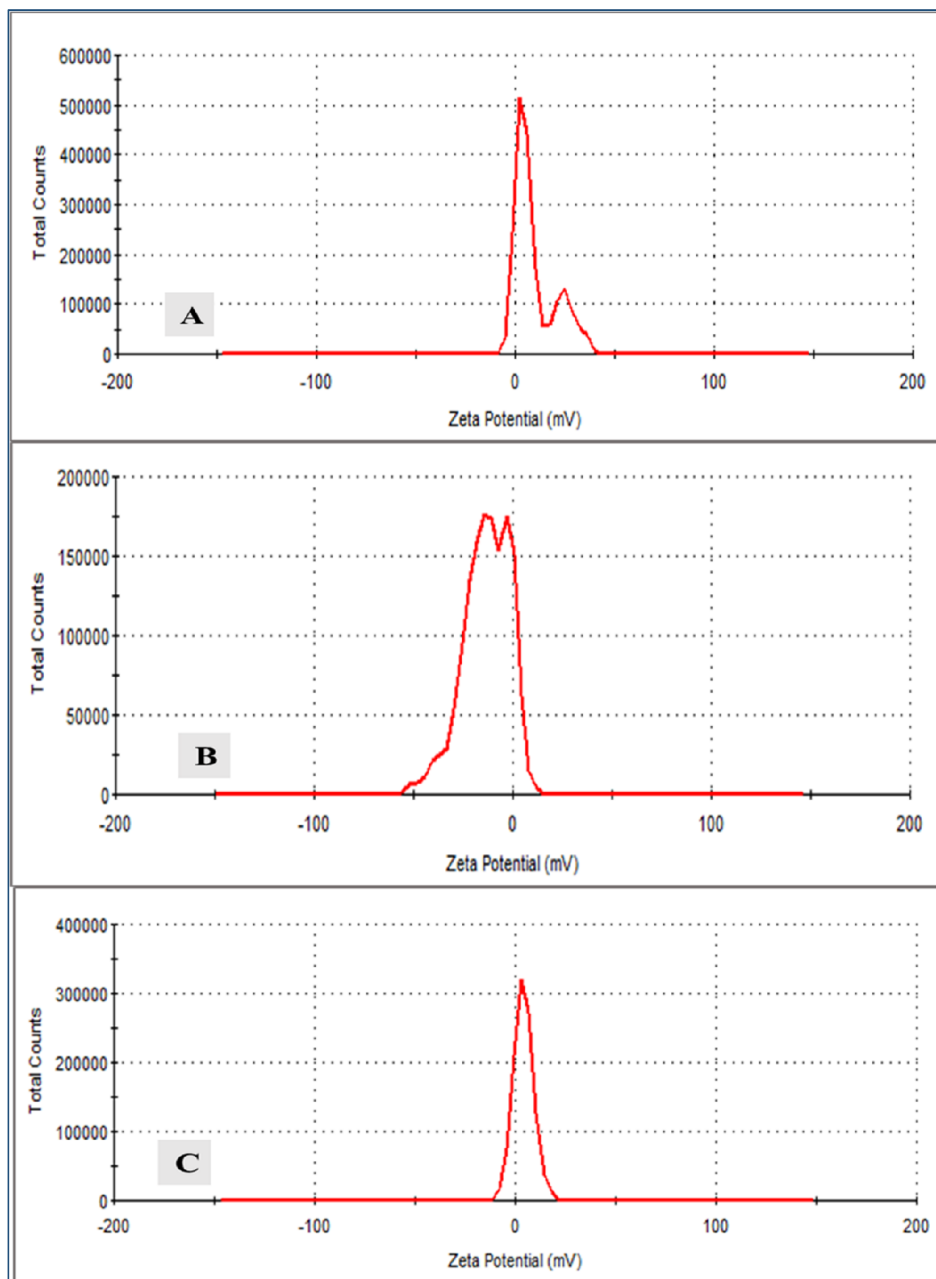


**Figura 6.** Espectro UV-Vis de las AgNPs sintetizadas. Las muestras de AgNPs fueron diluidas 1:2 con agua deionizada y se procedió a realizar el barrido a una longitud de onda entre 300 – 600 nm en celdas reducidas.

Los espectros UV-Vis demostraron el comportamiento esperado para las AgNPs, ya que la interacción entre AgNPs y la luz produce una oscilación colectiva de los electrones de superficie ocasionando bandas de resonancia conocidas como plasmones de superficie localizados ó resonancia del plasmón superficial (RPS) (Solomon *et al.*, 2007; Barnes *et al.*, 2003). La absorbancia de la RPS de las AgNPs se encuentra en el espectro visible con un pico alrededor de 410 nm (Sharma *et al.*, 2009; Nanda *et al.*, 2009; Dongwei *et al.*, 2009). El corrimiento de la absorción hacia

el azul (menor longitud de onda) en el espectro ultravioleta-visible, como se observa en la síntesis con Citrato, indica una disminución en el tamaño promedio de las nanopartículas. Asimismo, el ancho de la banda refleja la dispersión en la población de las partículas, es decir, entre más estrecho sea el pico, las partículas presentan poblaciones de tamaño promedio cercanas entre sí. En efecto, lo anterior fue demostrado al relacionar los espectros UV-Vis con los tamaños hidrodinámicos promedio obtenidos mediante Dispersión de Luz en modo Dinámico (DLS), encontrando mayor tamaño y dispersión en la síntesis con hidracina en comparación a la síntesis con citrato.

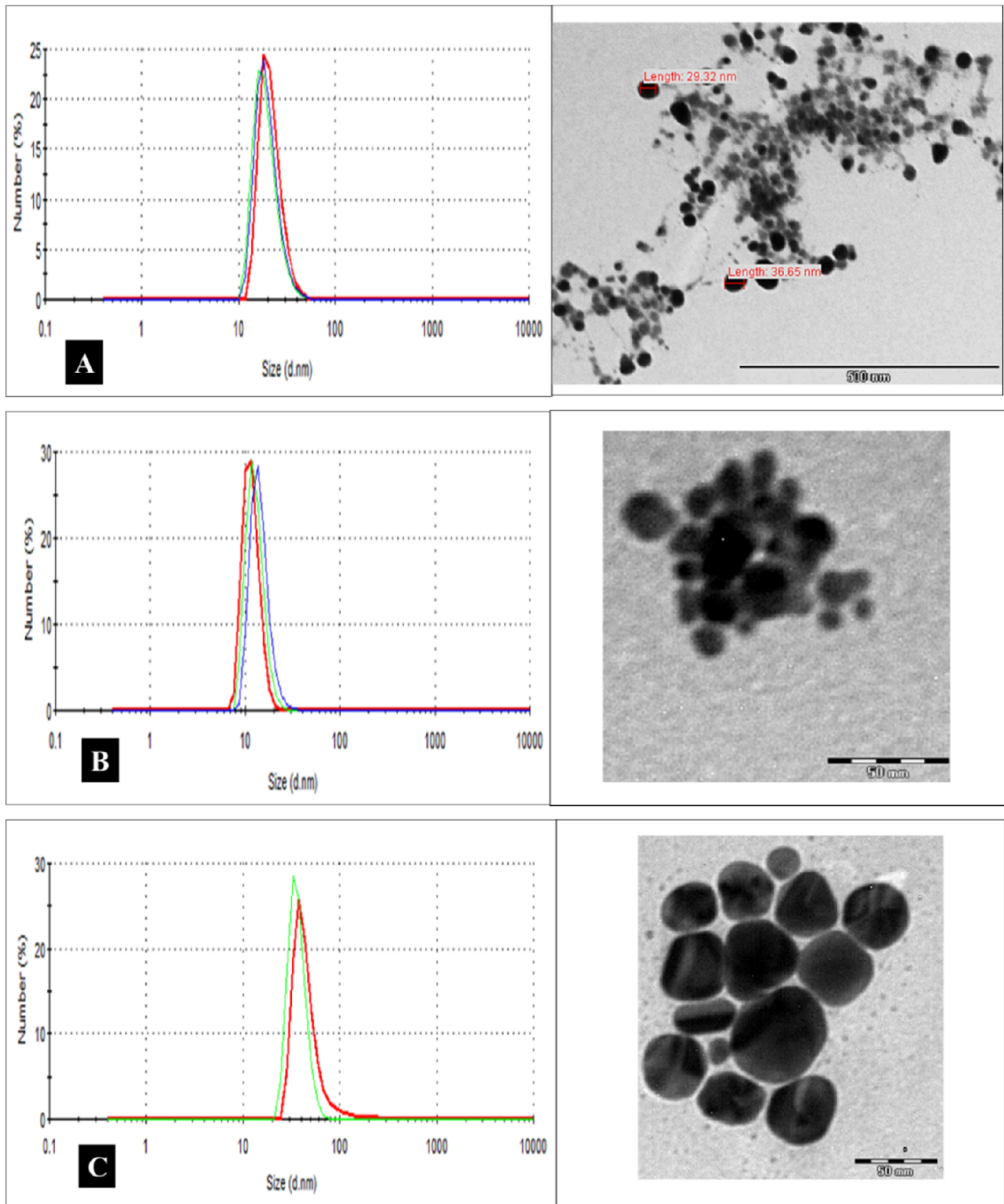
Respecto a la carga superficial determinada como Potencial zeta, la cual indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundantes en la partícula para desestabilizarla, fueron obtenidas dos tipos de AgNPs con carga superficial neta positiva (síntesis con cisteína e hidracina) y una con carga neta negativa (síntesis con citrato). En la **Figura 7** se demuestra la carga superficial neta de las AgNPs obtenidas mediante reducción química empleando diferentes agentes reductores.



**Figura 7.** Carga superficial neta de las AgNPs obtenidas con diferente agente reductor **(A)** Cisteína (pH: 3.8) **(B)** Citrato (pH: 8.2) **(C)** Hidracina (pH: 10.2). La medición se realizó al pH final de reacción de cada ruta de síntesis de AgNPs y las muestras fueron diluidas con agua deionizada hasta una concentración entre 100 – 200 ppm.

A pesar de lo descrito por Petica *et al.*, 2008, quienes exponen que las partículas con carga superficial entre el rango de -20 mV a 20 mV presentan menor estabilidad dado que tienen tendencia a asociarse y formar sedimentos; cabe destacar que las tres síntesis de AgNPs con carga superficial dentro del rango mencionado, fueron estables por 12 meses en el caso de la síntesis con cisteína y por 4 meses en el caso de las otras dos rutas de síntesis. En la síntesis con cisteína, es posible explicar la mayor estabilidad de la suspensión debido a la acción del CTAB y de un segundo agente surfactante como Polivinil-alcohol (PVA) el cual una vez formadas las AgNPs evita la aglomeración mediante la formación de micelas.

El tamaño de las AgNPs fue evidenciado mediante DLS y también fue analizado mediante microscopía TEM. El tamaño hidrodinámico promedio observado por DLS fue acorde con el tamaño promedio de las partículas analizadas mediante TEM. En esta última técnica, se observó morfología esférica en la mayoría de las partículas, lo cual es un resultado favorable para la actividad antimicrobiana de interés, puesto que algunos autores (Rai *et al.*, 2009; Morones *et al.*, 2005; Pal *et al.*, 2007) describen este tipo de morfología como relevante en el anclaje inicial sobre las células microbianas. En la **Figura 8** se evidencia el rango estrecho de tamaño de las AgNPs, comprendido entre 14 a 36 nm con un índice de polidispersión (PDI) de 0.2 a 0.4 y asimismo se observa las microfotografías electrónicas de cada tipo de síntesis.



**Figura 8.** Caracterización mediante DLS y TEM de las AgNPs sintetizadas con los diferentes agentes reductores **(A)** Cisteína (pH: 3.8) **(B)** Citrato (pH: 8.2) **(C)** Hidracina (pH: 10.2). El análisis por TEM se realizó adicionando 10  $\mu$ L de cada tipo de AgNPs sobre un grid (Formvar) de cobre cubierto con carbón.

La microfotografía de la síntesis de AgNPs con cisteína permitió detectar la presencia de largas cadenas aglomeradas y no lineales que indican la interacción entre partículas. Esta característica podría generar un mayor efecto antifúngico debido al “ataque” simultáneo de AgNPs aún sin que esta condición de interacción pueda afectar la estabilidad de la suspensión coloidal (Khan *et al.*, 2009; Cheow *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). La interacción observada, posiblemente se debe a la formación del complejo Cisteína-Ag insoluble en el medio de reacción cuando se agrega la cisteína entre el precursor metálico y el agente estabilizante (CTAB) (Khan *et al.*, 2009; Mansoob *et al.*, 2012). El CTAB es empleado durante la síntesis con cisteína ya que permite una mayor solubilización, estabilización, adsorción de los reactivos y especialmente porque disminuye la formación del complejo Cisteína-Ag (Khan *et al.*, 2009). Las AgNPs sintetizadas con iones citrato no presentaron una forma definida y exhiben agregados que afectarían las propiedades físico-químicas y así, el efecto antifúngico. En relación a las AgNPs sintetizadas con hidracina, la microfotografía demostró partículas de forma esférica definida, tamaño monodispersos y sin presencia de agregados, características favorables para la estabilidad y actividad antifúngica de interés.

En la **tabla 3** se presenta el resumen de los resultados del tamaño en solución acuosa, la carga superficial neta y el índice de polidispersión obtenido para cada tipo de AgNPs en la medición por DLS. De acuerdo con los resultados, las AgNPs obtenidas mediante cisteína presentaron las características más convenientes y requeridas para un posible agente antifúngico; tamaño promedio aceptable menor de 20 nm y carga superficial positiva que permite generar una mayor interacción electrostática con las células fúngicas (Nasrollahi *et al.*, 2011; Noorbakhsh *et al.*, 2011; Huh *et al.*, 2011).

**Tabla 3.** Resumen de la Caracterización de AgNPs. Las mediciones de tamaño hidrodinámico y carga superficial (Potencial zeta), se realizaron a pH final de

reacción de cada ruta de síntesis y fueron diluidas con agua deionizada en relación 1:2. Las mediciones se realizaron por triplicado.

AgNPs	Tamaño Hidrodinámico Promedio (nm)	Índice de Polidispersión (PdI)	Potencial Zeta (mV)
Agente reductor empleado			
Hidracina	36.34 ±15.3	0.342 ±0.03	+3.98 ±0.9
Citrato de Sodio	14.39 ±6.4	0.409 ±0.1	-18.4 ±1.5
Cisteína	19.83 ±6.2	0.266 ±0.15	+4.05 ±1.3

### 4.3 EFECTO ANTIFÚNGICO DE AgNPs

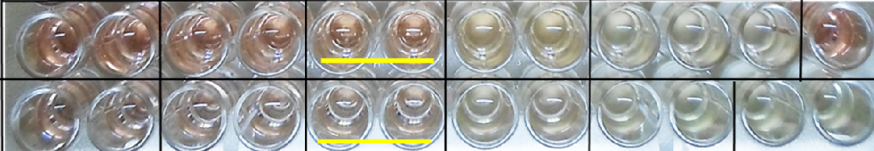
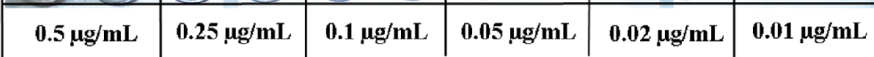
Para determinar el efecto antifúngico de las partículas sintetizadas y caracterizadas, los ensayos se realizaron mediante microdilución en caldo bajo el protocolo estandarizado del CLSI para levaduras descrito en el documento M27-A3. Se empleó fluconazol como control de inhibición y los ensayos siempre fueron realizados con la cepa de referencia que valida la técnica, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, tal como se describe en el protocolo mencionado.

#### 4.3.1 Determinación de la CMI<sub>50</sub> Y CMF

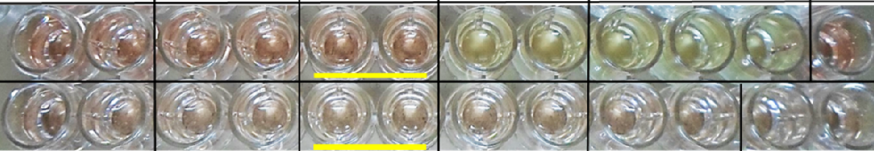
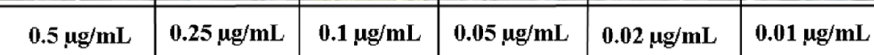
La **Figura 9** presenta uno de los experimentos de microdilución en caldo que permite determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI<sub>50</sub>) de las AgNPs frente a las cepas de estudio. La CMI<sub>50</sub> de todas las nanopartículas obtenidas se encontró entre 0.1 a 0.5 µg/mL para las cepas evaluadas, observando mejor efecto antifúngico de las AgNPs sintetizadas mediante reducción con cisteína. Asimismo,

en la Figura 9 se evidencia el efecto del antifúngico fluconazol, confirmando la resistencia farmacológica (CMI<sub>50</sub> ≥64 µg/mL) de *C. krusei* y *C. glabrata*; Sensibilidad Dosis Dependiente (CMI<sub>50</sub>: 16-32 µg/mL) de *C. albicans* y la sensibilidad (CMI<sub>50</sub> ≤ 8 µg/mL) de *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis* descritas al inicio del estudio (selección de las cepas).

<i>C. albicans</i> ATCC 10231						
Fluconazole	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	CC	CE
AgNPs - Cys						
	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	0.1 µg/mL	0.05 µg/mL	0.02 µg/mL	0.01 µg/mL
<i>C. krusei</i>						
Fluconazole	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	CC	CE
AgNPs - Cys						
	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	0.1 µg/mL	0.05 µg/mL	0.02 µg/mL	0.01 µg/mL
<i>C. glabrata</i>						
Fluconazole	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	CC	
AgNPs - Cys						
	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	0.1 µg/mL	0.05 µg/mL	0.02 µg/mL	0.01 µg/mL

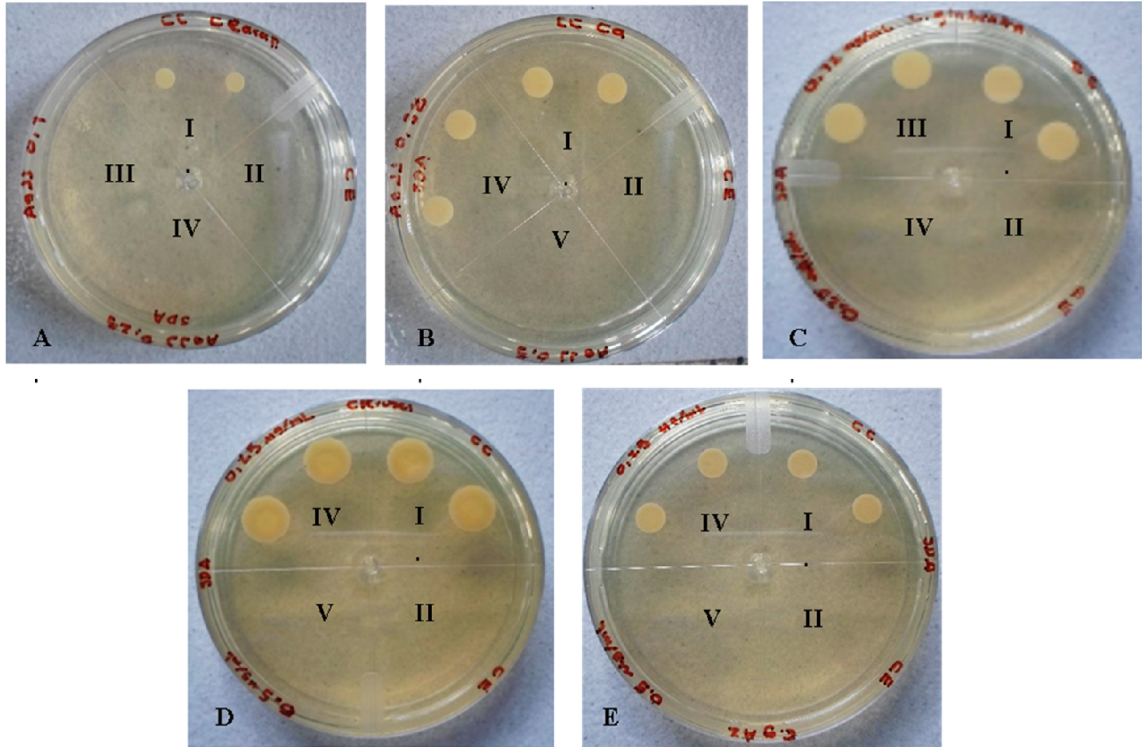
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019						
Fluconazole	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	CC	CE
						
AgNPs - Cys	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	0.1 µg/mL	0.05 µg/mL	0.02 µg/mL	0.01 µg/mL
						

<i>C. guilliermondii</i>						
Fluconazole	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL	2 µg/mL	CC	CE
						
AgNPs - Cys	0.5 µg/mL	0.25 µg/mL	0.1 µg/mL	0.05 µg/mL	0.02 µg/mL	0.01 µg/mL
						

**Figura 9.** Determinación de CMI<sub>50</sub> de AgNPs (Cisteína) mediante la norma CLSI para levaduras. Los ensayos se llevaron a cabo en medio RPMI 1640 con L-glutamina y sin bicarbonato de sodio, ajustado a pH 7±0.1 y con 0.2% de glucosa. **CC:** Control de Crecimiento; **CE:** Control de Esterilidad del medio de cultivo. Las **líneas amarillas** indican la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI<sub>50</sub>) de acuerdo con la lectura visual comparada con los controles.

La **Figura 10** muestra uno de los ensayos para determinar la Concentración Mínima Fungicida (CMF) de las AgNPs (Cisteína) frente a las cepas de *Candida*. Se evidenció actividad fungicida (CMF) desde 0.25 µg/mL hasta 2 µg/mL según la cepa de estudio y el tipo de AgNPs evaluada. Estos resultados son comparables con los descritos por otros autores (Panacek *et al.*, 2009; Nasrollahi *et al.*, 2011; Noorbakhsh *et al.*, 2011). La **tabla 4** expone el resumen de los resultados obtenidos en la actividad antifúngica de las nanopartículas.



**Figura 10.** Determinación de CMF de las AgNPs (Cisteína) frente a las cepas de *Candida*. Los ensayos se realizaron en cajas petri con SDA al 2% y fueron incubadas durante 48 horas a 35 °C. Las imágenes demuestran la actividad fungicida de las AgNPs (Cisteína) sobre **(A)** *C. parapsilosis* ATCC 22019 **(B)** *C. albicans* ATCC 10231 **(C)** *C. glabrata* **(D)** *C. krusei* **(E)** *C. guilliermondii*. (I: Control de Crecimiento; II: Control de esterilidad del medio de cultivo; III: 0.1 µg/mL AgNPs; IV: 0.25 µg/mL AgNPs; V: 0.5 µg/mL AgNPs).

**Tabla 4.** CMI<sub>50</sub> y CMF de AgNPs sobre las cepas de *Candida*. El ensayo fue realizado mediante microdilución en caldo RPMI, pH 7±0.1 y el inóculo evaluado fue de 0.5 – 2.5x10<sup>3</sup> UFC/mL.

ESPECIE	Fluconazol	AgNPs – Cisteína		AgNPs – Hidracina		AgNPs – Citrato	
	CMI <sub>50</sub> (µg/mL)	CMI <sub>50</sub> (µg/mL)	CMF (µg/mL)	CMI <sub>50</sub> (µg/mL)	CMF (µg/mL)	CMI <sub>50</sub> (µg/mL)	CMF (µg/mL)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	16	0.25	0.5	0.1	0.5	1	>2
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	2	0.1	0.25	0.1	0.5	0.5	2
<i>C. guilliermondii</i>	4	0.1	0.5	0.1	0.25	0.5	>2
<i>C. krusei</i>	>64	0.1	0.5	0.25	0.5	0.5	>2
<i>C. glabrata</i>	>64	0.1	0.25	0.25	0.5	0.5	>2

De acuerdo con los resultados de sensibilidad antifúngica, las AgNPs obtenidas mediante reducción con cisteína e hidracina exhibieron mejor actividad contra las cepas de *Candida* seleccionadas. La acción antifúngica de la síntesis con cisteína e hidracina fue muy similar, sin embargo, por la menor complejidad de preparación y la naturaleza química es conveniente seleccionar la cisteína como agente reductor ideal. Respecto a la síntesis con citrato, posiblemente la carga superficial negativa y los agregados que incrementan el tamaño de partículas en la suspensión influyeron en la disminución del efecto y en la interacción electrostática con la célula (Petica et al., 2008; Rai et al., 2009; Schrand et al., 2008).

Por otra parte, se evidencia que las AgNPs exhibieron una mayor potencia farmacológica *in vitro* con respecto al fluconazol, ya que una menor concentración

generó el mismo efecto inhibitorio del 50% de las células fúngicas. El fluconazol inhibió el 50% de las células de *C. albicans* a 16 µg/mL, mientras las AgNPs de mayor efecto sobre esta cepa requirió sólo 0.1 µg/mL, es decir, una concentración 160 veces más baja. También, considerando el caso de las cepas resistentes a fluconazol (*C. glabrata* y *C. krusei*), con 0.1 µg/mL de AgNPs (640 veces menos que fluconazol) se inhibió la mitad de las células levaduriformes.

Del mismo modo, es posible considerar que las AgNPs sintetizadas en este trabajo presentaron mayor eficacia farmacológica *in vitro* que el antifúngico convencional fluconazol. La intensidad de la respuesta antifúngica de las AgNPs fue mayor en comparación con el fluconazol, puesto que las AgNPs generaron efecto fungicida entre 0.25 a 2 µg/mL, mientras que el Azol sólo generó efecto fungistático a la máxima concentración evaluada de 64 µg/mL.

El efecto antifúngico *in vitro* de las AgNPs sintetizadas es comparable e incluso mejor a la acción de grupos de antifúngicos de amplio uso sobre especies de *Candida*: el efecto fungicida de anfotericina B (representante del grupo de antifúngicos polienos), presenta CMF entre 2-16 µg/mL; Azoles: posaconazol CMF alrededor de 8 µg/mL, itraconazol y voriconazol CMF >10µg/mL y del grupo de equinocandinas, caspofungina presenta actividad fungicida alrededor de 1 µg/mL (Sardi *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2014).

Es importante resaltar que el efecto fungistático y fungicida de las AgNPs sobre las cepas levaduriformes evaluadas, fue independiente al perfil de sensibilidad farmacológica exhibido frente a fluconazol. Así, *C. krusei* y *C. glabrata*, especies con resistencia innata y secundaria a fluconazol y la cepa de referencia *C. parapsilosis*, especie sensible a este antifúngico, presentaron una sensibilidad quimioterapéutica *in vitro* a concentraciones muy similares de AgNPs. De esta manera, las nanopartículas sintetizadas se pueden considerar como potencial

agente anticandidiásico para el control fúngico de cepas sensibles y resistentes a antifúngicos convencionales.

El efecto antifúngico de las AgNPs exhibido sobre las cepas de *Candida*, es debido posiblemente a los múltiples blancos y su acción simultánea, lo que brinda un efecto fungicida sobre las especies evaluadas (Noorbakhsh *et al.*, 2011; Young *et al.*, 2009). En contraste, el fluconazol presenta una sola diana cuya acción es reducir la concentración de ergosterol, un esteroles esencial para la integridad de la membrana celular fúngica (Gregori *et al.*, 2005; Catalán *et al.*, 2006).

Es importante mencionar que el efecto biocida de las partículas de plata se atribuye a su tamaño nanométrico, lo cual facilita la interacción con la célula microbiana ya que presenta mayor superficie en relación al volumen. A su vez, la interacción electrostática célula-nanopartícula generada por la carga superficial positiva del compuesto juega un rol significativo en su adhesión inicial (Mocanua *et al.*, 2014; Huh *et al.*, 2011).

Se ha descrito que la pared celular puede presentar alteraciones posteriores al tratamiento con nanopartículas, ya que éstas pueden interrumpir la transferencia de electrones transmembranales y causar lisis de la célula (Choi *et al.*, 2008). Esto induce la entrada de las partículas y genera la oxidación de los componentes celulares mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Lok *et al.*, 2006). Según Gogoi *et al.*, 2006, las nanopartículas pueden reaccionar directamente con el DNA, las proteínas celulares y en consecuencia, afectar la cadena respiratoria y la división celular.

Las nanopartículas de plata en solución acuosa promueven la liberación de iones de plata potenciando la actividad biocida de las nanopartículas. Los iones de plata penetran la pared celular y pueden formar complejos con las bases nitrogenadas en el ADN y así, condensar y reducir el proceso de replicación (Choi *et al.*, 2008).

Asimismo, los iones plata pueden inhibir la expresión de enzimas y proteínas indispensables para la producción de ATP. La reacción de Ag<sup>+</sup> con los grupos tiol, carboxilo, fosfato, hidroxilo, amina, imidazol e indol pueden generar la inactivación de enzimas vitales para la célula y producir la muerte (Noorbakhsh *et al.*, 2011; Choi *et al.*, 2008; Nasrollahi *et al.*, 2011). Kumar y colaboradores 2004, propusieron que el oxígeno se asocia con iones plata y reacciona con grupos sulfhidrilo (-S-H) sobre la pared celular formando uniones R-S-S-R, lo cual bloquea la respiración y causa la muerte celular.

#### **4.4 ENCAPSULACIÓN DE AgNPs UTILIZANDO BIOPOLÍMEROS**

Teniendo en cuenta las características físico-químicas y la actividad antifúngica exhibida por las AgNPs obtenidas mediante reducción con cisteína, fue seleccionado este tipo de síntesis para la encapsulación en biopolímeros. La encapsulación de AgNPs en polímeros se realizó como estrategia eficaz para mejorar la actividad antifúngica y disminuir la citotoxicidad derivada del núcleo metálico de la nanopartícula. Los polímeros empleados en este trabajo: el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliláctico-co-glicólido (PLGA) y el quitosano, fueron seleccionados con base en la literatura científica como vehículos de amplio uso debido a la baja citotoxicidad y eficiencia en la entrega de fármacos (Danhier *et al.*, 2012; Dongwei *et al.*, 2009; Nafee *et al.*, 2009).

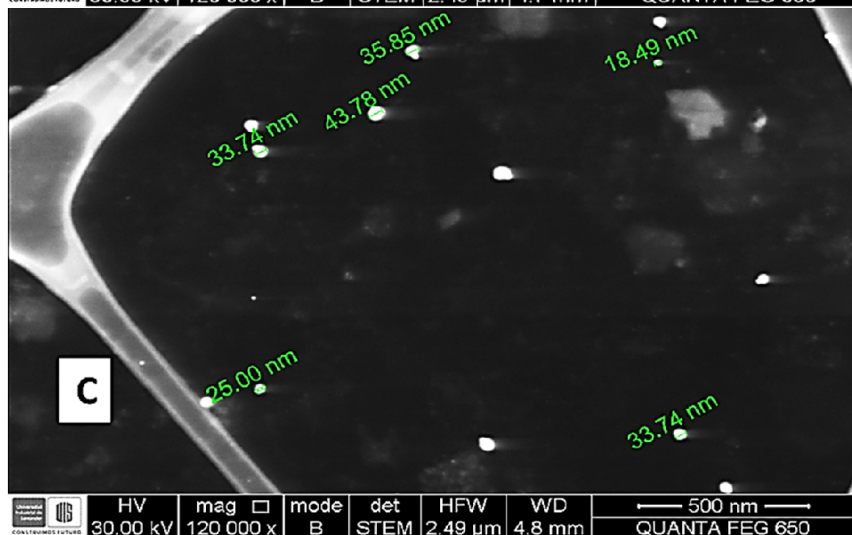
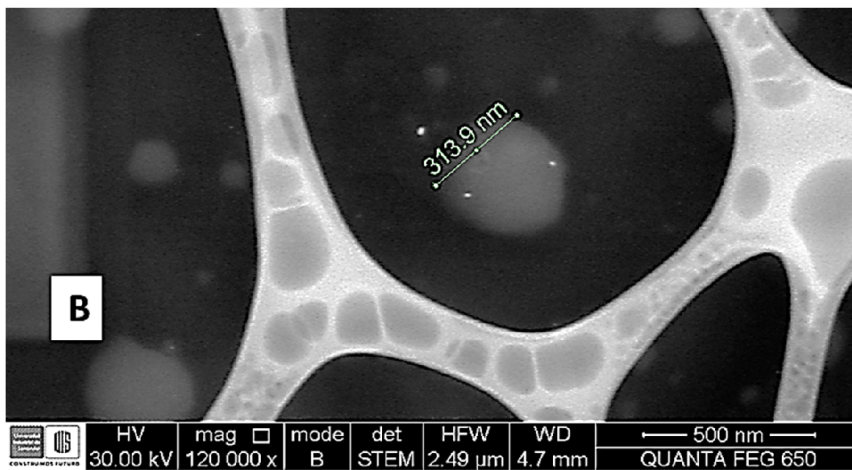
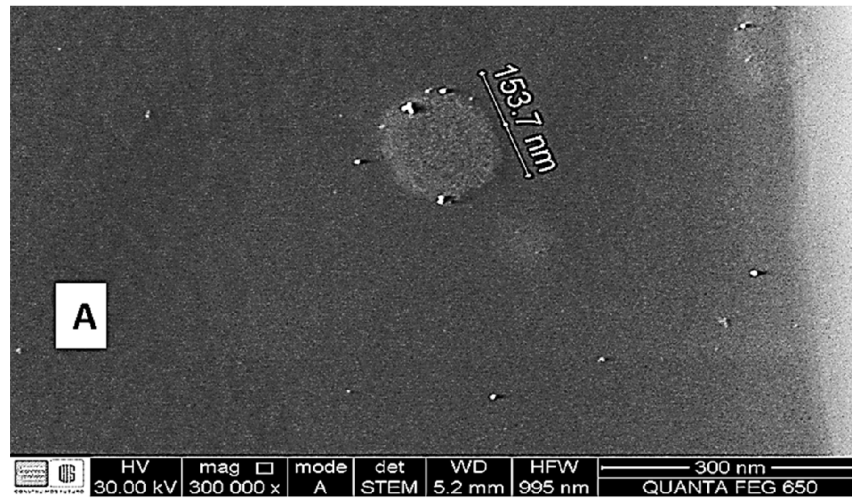
En la **tabla 5** se exponen las condiciones finales empleadas en la encapsulación de AgNPs con los polímeros PLA y PLGA. A partir de las condiciones presentadas, se logró obtener nanocompuestos poliméricos de un tamaño y carga superficial neta aceptable e incluso mejor a los resultados descritos en otras investigaciones (Cheow *et al.*, 2010; Mora *et al.*, 2010; Danhier *et al.*, 2012). El procedimiento de

encapsulación fue estandarizado en el Grupo de Investigación en Bioquímica y Microbiología de la UIS.

**Tabla 5.** Condiciones experimentales para encapsulación en polímeros (PLA y PLGA)

VARIABLES	VALORES
[Polímero] mg/mL	1.8
Acuosa : orgánica: Acuosa	1:10:100
[AgNPs]	177 ppm
[Polietilenimina] (% w/v)	0.25
[Poloxamer] (%w/v)	0.5
Velocidad Ultraturrax (rpm)	15.500
Polímero:AgNPs	1:2
Fase orgánica	Diclorometano: 1 mL
Fase acuosa 1	0.1 mL
Centrifugación	10000 rpm 10 min
Ajuste pH	6.5

En la **Figura 11**, se presentan los nanocompuestos sintetizados de PLA@Ag y PLGA@Ag mediante Microscopía Electrónica de Barrido en modo TEM (S-TEM). En las microfotografías se observa las nanoesferas obtenidas de cada polímero conteniendo las partículas de plata (puntos de mayor brillo) insertadas y/o absorbidas en la matriz polimérica. Por otro lado, la microfotografía de las AgNPs libres (Imagen C) evidencia el tamaño esperado de las nanopartículas sintetizadas. Las AgNPs se observan como puntos brillantes debido al contraste generado por su naturaleza metálica. De esta manera se evidenció la formación de nanocompuestos poliméricos que permitieron el transporte de un principio activo, las AgNPs.



**Figura 11.** Microfotografías S-TEM de encapsulados de AgNPs: (A) PLGA@Ag; (B) PLA@Ag (C) AgNPs libres (sin encapsular). La medición se realizó adicionando 10  $\mu$ L de cada tipo de AgNPs sobre un grid (Formvar).

Las nanopartículas encapsuladas fueron consideradas como nanoesferas de acuerdo con las características observadas en las microfotografías de S-TEM (Kumari *et al.*, 2010; Lima, 2013; Mora *et al.*, 2010). Las AgNPs se observaron intercaladas y/o absorbidas en la matriz formada por el polímero. Todas las síntesis de encapsulación en polímeros presentaron un tamaño promedio entre 208 a 246 nm, aceptable para este tipo de compuestos (Mora *et al.*, 2010; Danhier *et al.*, 2012) y se obtuvo la carga superficial neta positiva para las diferentes matrices poliméricas (Ver **Tabla 6**).

**Tabla 6.** Caracterización de encapsulados de AgNPs utilizando biopolímeros. Las muestras fueron analizadas a pH 6.5 sin dilución previa y las mediciones de tamaño y carga superficial se realizaron por triplicado.

Nanocompuesto	Tamaño Hidrodinámico promedio (nm)	Índice de polidispersión (PDI)	Carga superficial (mV)	% de Encapsulación*
<b>PLA@Ag</b>	<b>246.70 <math>\pm</math> 11.58</b>	<b>0.22 <math>\pm</math> 0.01</b>	<b>+6.31 <math>\pm</math> 1.76</b>	<b>35</b>
<b>PLGA@Ag</b>	<b>208.63 <math>\pm</math> 23.17</b>	<b>0.46 <math>\pm</math> 0.07</b>	<b>+5.67 <math>\pm</math> 0.30</b>	<b>40</b>
<b>Quitosano@Ag</b>	<b>211.70 <math>\pm</math> 5.12</b>	<b>0.31 <math>\pm</math> 0.02</b>	<b>+56.36 <math>\pm</math> 1.3</b>	<b>1</b>

\* El porcentaje de encapsulación fue determinado mediante la fórmula: % de Encapsulación= 100 \* (Concentración final de AgNPs (mg)/ Concentración inicial de AgNPs (mg)).

En general se obtuvieron encapsulados con características muy similares de tamaño y carga superficial. En el caso de los encapsulados en quitosano, presentaron mayor carga superficial aportada por la naturaleza policatiónica del polímero (Vimal *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2009). El tamaño y la carga de los compuestos obtenidos fueron comparables con otras investigaciones (Cheow *et al.*, 2010; Mora *et al.*, 2010; Danhier *et al.*, 2012).

En relación a la actividad biocida de las AgNPs, fue potenciada tras la encapsulación en los biopolímeros PLA y PLGA. En contraste, las nanopartículas encapsuladas en quitosano no exhibieron mejoramiento en la acción antifúngica de las AgNPs, incluso para inhibir algunas cepas evaluadas se requirió de una mayor concentración de este nanocompuesto. La **tabla 7** expone los resultados de la actividad antifúngica de los encapsulados obtenidos y de las AgNPs libres. Cada ensayo se realizó por duplicado en tres experimentos independientes.

**Tabla 7.** Determinación de CMI<sub>50</sub> y CMF de los compuestos encapsulados. La actividad antifúngica de las AgNPs fue realizada mediante el protocolo descrito en el documento M27-A3 del CLSI, a una concentración final de  $0.5 - 2.5 \times 10^3$  UFC/mL de levaduras. De igual forma se evaluaron los blancos de reacción (polímeros) y se descartó la posible actividad antifúngica a las concentraciones empleadas para este estudio.

ESPECIE	AgNPs - Cisteína		PLGA@Ag - Cisteína		PLA@Ag - Cisteína		Quitosano@Ag Cisteína	
	CMI <sub>50</sub> (µg/mL)	CMF (µg/mL)	CMI <sub>50</sub> (µg/mL)	CMF (µg/mL)	CMI <sub>50</sub> (µg/mL)	CMF (µg/mL)	CMI <sub>50</sub> (µg/mL)	CMF (µg/mL)
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.25	0.5	0.01	0.01	0.01	0.05	0.25	>0.5
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0.1	0.25	0.01	0.01	0.01	0.01	0.1	0.5
<i>C. guilliermondii</i>	0.1	0.25	0.01	0.01	0.01	0.01	0.25	>0.5
<i>C. krusei</i>	0.1	0.5	0.01	0.01	0.01	0.05	0.5	>0.5
<i>C. glabrata</i>	0.1	0.25	0.01	0.01	0.01	0.05	0.5	>0.5

Los nanocompuestos encapsulados presentaron un mayor efecto antifúngico comparado con las AgNPs libres, posiblemente este resultado fue producto de la entrega simultánea de AgNPs adsorbidas o intercaladas en la matriz del polímero, por lo cual el efecto es potenciado. En otras palabras, es posible que el polímero transporte mayor número de AgNPs y las descargue sobre la superficie celular, en contraste con la cantidad de partículas de plata individuales que alcanzan a interactuar con las células (Zhang *et al.*, 2010; Danhier *et al.*, 2012).

A partir de los resultados de caracterización y de actividad antifúngica de las nanopartículas encapsuladas en polímeros, se consideró que el mejor nanocompuesto fue logrado con el co-polímero PLGA, con el cual se obtuvo el mayor porcentaje de encapsulación de AgNPs. El nanocompuesto PLGA@Ag presentó actividad fungicida frente a todas las especies de *Candida* a una concentración de 0.01 µg/mL, la menor concentración evaluada. En consecuencia,

este compuesto fue entre 25 a 50 veces más potente en comparación con las AgNPs libres y se necesitó una concentración 200 a 6400 veces menor que el fluconazol para inhibir el 50% de las células fúngicas. Estos resultados fueron comparables con los nanocompuestos obtenidos en otros estudios (Nasrollahi *et al.*, 2011; Ruparelia *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2009).

#### **4.5 CITOTOXICIDAD**

Determinar la citotoxicidad de los nanocompuestos obtenidos en este trabajo significó un análisis indispensable debido a la gran discusión sobre la toxicidad de nanopartículas metálicas frente a las células no microbianas (Pan *et al.*, 2007; Shanmugasundaram *et al.*, 2013; Yen *et al.*, 2009; Schrand *et al.*, 2008). Se conoce que las AgNPs presentan múltiples blancos, de acción simultánea sobre células microbianas, descritos en el numeral 4.3, y se ha encontrado que tales mecanismos de las AgNPs también se presentan sobre las células mamíferas (Braydich *et al.*, 2005; Rai *et al.*, 2009; Monge, 2009). Las nanopartículas pueden interactuar con enzimas como la superóxido dismutasa (SOD) y la tiorredoxina peroxidasa hasta agotar el mecanismo de defensa antioxidante de las células mamíferas, lo que conduce a la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Monge, 2009). Esta acumulación puede iniciar una respuesta inflamatoria y provocar la alteración y destrucción de la mitocondria. En consecuencia se liberan factores apoptogénicos resultando en la muerte celular (Almofti *et al.*, 2003).

Por lo anterior, la citotoxicidad de las AgNPs (Cisteína) y el compuesto encapsulado PLGA@Ag fue analizada mediante la prueba de MTT, que permite determinar la actividad metabólica de las células mamíferas posterior al tratamiento con los compuestos de interés. Para esta prueba fueron empleadas células de fibroblastos teniendo en cuenta el interés de desarrollar un agente antifúngico sobre una patología principalmente cutánea que posteriormente puede diseminarse a nivel

sistémico (Naglik *et al.*, 2011; Monteiro *et al.*, 2014). Para llevar a cabo el ensayo de citotoxicidad fue necesario cambiar el pH final de las suspensiones coloidales y por tanto fueron caracterizados nuevamente los compuestos (Ver **tabla 8**) ya que el pH es un factor importante en el tamaño y carga de las partículas sintetizadas.

**Tabla 8.** Caracterización de compuestos para ensayo MTT. Las muestras fueron analizadas sin dilución previa y por triplicado.

Compuesto	Tamaño (nm)	Carga (mV)	pH
<b>AgNPs (Cisteína)</b>	<b>49.0 ±5.7</b>	<b>+22.0</b>	<b>7.4</b>
<b>PLGA@Ag</b>	<b>295.6 ±27.3</b>	<b>+12.7</b>	<b>7.4</b>

Las AgNPs libres (Cisteína) sintetizadas en el presente estudio presentaron efecto citotóxico en el 50% de las células (CC<sub>50</sub>) de fibroblasto murino a un rango de concentración de 7.12 – 9.08 µg/mL considerando la desviación estándar (Ver **Tabla 9**). La CC<sub>50</sub> hallada, fue entre 71.2 a 90.8 veces mayor a la CMI<sub>50</sub> (0.1 µg/mL) con la cual se obtuvo la inhibición de la mitad de las células de *Candida* evaluadas *in vitro* y entre 14.24 a 18.16 veces mayor a la CMF (0.5 µg/mL) con la cual se eliminó la totalidad de las células fúngicas (Tabla 5).

**Tabla 9.** Citotoxicidad de nanocompuestos sobre fibroblastos de murino NIH/3T3. La tabla expone en detalle los resultados de la prueba de citotoxicidad y presenta la concentración tóxica de los compuestos para el 50% y 90% de las células (CC<sub>50</sub>, CC<sub>90</sub>). El compuesto PLGA@Ag se evaluó en concentraciones menores (0.037 – 1 µg/mL) debido a que la muestra patrón sintetizada se encontraba en menor concentración que las AgNPs.

Compuesto	% CITOTOXICIDAD ( $\pm$ DS)				CC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL $\pm$ DS)	CC <sub>90</sub> ( $\mu$ g/mL $\pm$ DS)
	Concentración ( $\mu$ g/mL)					
	1.1	3.3	10	30		
AgNPs	6.55 $\pm$ 0.7	17.88 $\pm$ 4.39	63.13 $\pm$ 7.7	80 $\pm$ 1.2	8.1 $\pm$ 0.98	>30
Compuesto	Concentración ( $\mu$ g/mL)				CC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL $\pm$ DS)	CC <sub>90</sub> ( $\mu$ g/mL $\pm$ DS)
	0.037	0.11	0.33	1		
PLGA@Ag	0.39 $\pm$ 1.9	0.64 $\pm$ 0.59	3.19 $\pm$ 2.0	1.24 $\pm$ 4.6	>1 *	>1 *

\* Mayor concentración evaluada; **CC**: Concentración Citotóxica; **DS**: Desviación estándar.

En relación a la citotoxicidad del compuesto encapsulado (PLGA@Ag), es necesario fijar un punto de comparación entre las AgNPs libres y encapsuladas a una concentración cercana a 1  $\mu$ g/mL debido a la diferencia de concentraciones evaluadas para cada compuesto. De esta manera, se evidencia que las AgNPs libres a la concentración de 1.1  $\mu$ g/mL presentaron 6.55% de toxicidad celular frente a un 1.24% de citotoxicidad del PLGA@Ag (1  $\mu$ g/mL) para los fibroblastos de murino. Aunque se observa menor toxicidad del compuesto encapsulado, los resultados obtenidos presentan dos contextos discutibles. El primero, es para el polímero empleado ya que se esperaba una diferencia marcada en la citotoxicidad con respecto a las AgNPs libres (Danhier *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2010; Mora *et al.*, 2010) y el segundo, se enfoca en la mínima citotoxicidad exhibida por las AgNPs sintetizadas mediante reducción con Cisteína. En este punto, es importante tener en cuenta que el efecto citotóxico de los nanomateriales, específicamente de las nanopartículas de plata, es directamente proporcional a la concentración del metal, el agente reductor empleado y el tamaño de partícula (Pan *et al.*, 2007; Yen *et al.*, 2009). Cabe resaltar que la naturaleza química de la cisteína la enmarca dentro de la química verde o química sostenible, que explica la posible disminución en la formación de residuos químicos tóxicos (Sharma *et al.*, 2009).

De acuerdo con los resultados de citotoxicidad obtenidos para los blancos de reacción (Ver **Tabla 10**), es decir los polímeros empleados en la síntesis de encapsulados, se observa que a la concentración inicial de las síntesis se generó un porcentaje mayor del 80% de citotoxicidad. Sin embargo, de acuerdo con el procedimiento descrito para la encapsulación, se procedió a realizar una serie de lavados que diluyeron 100 veces la concentración inicial de polímeros. Una vez se obtuvieron los encapsulados (muestra patrón) se realizaron las respectivas diluciones (desde 1:5 hasta 1:50) para preparar las concentraciones a evaluar (rango de 0.01 a 0.5 µg/mL). En consecuencia, la citotoxicidad real, es decir, la citotoxicidad a la concentración de polímeros utilizados en este trabajo se ubicó en el porcentaje (%) de citotoxicidad para dilución 1:1000 (menor de 1.4%).

**Tabla 10.** Citotoxicidad de los polímeros utilizados en la encapsulación de AgNPs. Los polímeros empleados para el ensayo de MTT fueron evaluados en diluciones seriadas 1:10 bajo la misma metodología utilizada frente a los nanocompuestos de plata.

Compuesto	% CITOTOXICIDAD (±DS)				CC <sub>50</sub> (µg/mL ± DS)	CC <sub>90</sub> (µg/mL ± DS)
	Diluciones					
	1:1	1:10	1:100	1:1000		
PEI 0.5% (V/V)	82.99±0.8	55.5±3.7	11.01±3.2	0	0.05 %	>0.5% *
Sln B (Pol 0.5% + PEI 0.25%)	85.99±0.1	45.0±0.9	1.91±1.7	0	Pol 0.05% + PEI 0.02%	> [ ] Sln B *
PLGA(5 mg/mL)	88.61±0.4	42.82±3.3	1.017±0.6	1.41±2.4	0.5 mg/mL	>5 mg/mL *

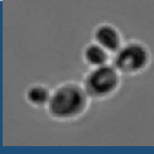

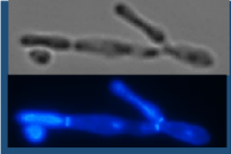
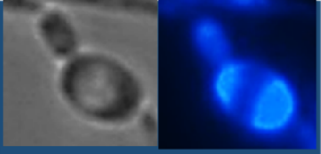
**Sln:** Solución; **Pol:** Poloxamer; **PEI:** Polietilenimina; **CC:** Concentración Citotóxica;  
**[ ]:** Concentración

## 4.6 EFECTO DE LAS AgNPs SOBRE LA PARED CELULAR FÚNGICA

### 4.6.1 Fluorescencia con Blanco de Calcoflúor

El efecto de las AgNPs sobre la pared de *Candida* fue evidenciado mediante diferentes tipos de Microscopía, entre ellas, Microscopía de Fluorescencia empleando Blanco de Calcoflúor (BC) afín a la quitina de la pared celular (Pringle *et al.*, 1989; Badrane *et al.*, 2012). Para analizar el efecto de la CMI<sub>50</sub> de AgNPs a nivel de la quitina, se procedió a diferenciar el patrón de fluorescencia con BC de las células tratadas y no tratadas con las nanopartículas (Ver **Cuadro 2**). Se analizaron 100 células/ensayo y se evidenció en general diferencias mínimas entre las muestras. Las cepas empleadas para este ensayo fueron *C. albicans* ATCC 10231 y *C. parapsilosis* ATCC 22019. Los patrones de marcaje considerados fueron: Fluorescencia en la superficie/citoplasma de la célula, septo o tabique y zona de brotación o sitio de salida de las células hijas (Borde de la célula).

**Cuadro 2.** Fluorescencia con Blanco de Calcoflúor (BC) de *C. albicans* y *C. parapsilosis* expuestas a AgNPs. Las células tratadas con la CMI<sub>50</sub> de AgNPs posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2.5%. La coloración con BC se realizó a una concentración de 1 mg/mL durante 5 minutos en cámara oscura.

Ensayo	Fluorescencia con BC			
	Superficie celular/citoplasma		Septo o Tabique	Zona de Brotación
				
Control de <i>C. albicans</i>	+++		++	+
<i>C. albicans</i> tratada con 0,25 µg/mL de AgNPs	+++		+	++
Control de <i>C. parapsilosis</i>	++++		+	+
<i>C. parapsilosis</i> tratada con 0,1 µg/mL de AgNPs	++++		++	+

(+) 1 – 20 Células; (++) 21 – 40 Células; (+++) 41 – 70 células; (++++) 71 – 100 células

Mediante la técnica de fluorescencia con Blanco de Calcoflúor, no se logró evidenciar un patrón característico de las células tratadas con AgNPs frente a las células control. De acuerdo con los resultados, se esperaba la detección de este polisacárido en los septos y zonas de brotación, ya que generalmente el contenido de quitina es mayor en estas áreas (Chaffin, 2008; Pringle *et al.*, 1989; Sardi *et al.*, 2013). Sin embargo, la marcación fue muy semejante en las células expuestas a AgNPs como en los controles, indicando ausencia de alteraciones cualitativas a este nivel. No obstante, el patrón de fluorescencia sobre la superficie celular/citoplasma fue notorio. Se debe tener en cuenta que la quitina está compuesta por unidades de N-acetilglucosamina y para formar el polisacárido, la enzima quitina sintetasa deposita tales unidades en el espacio extracelular próximo a la membrana

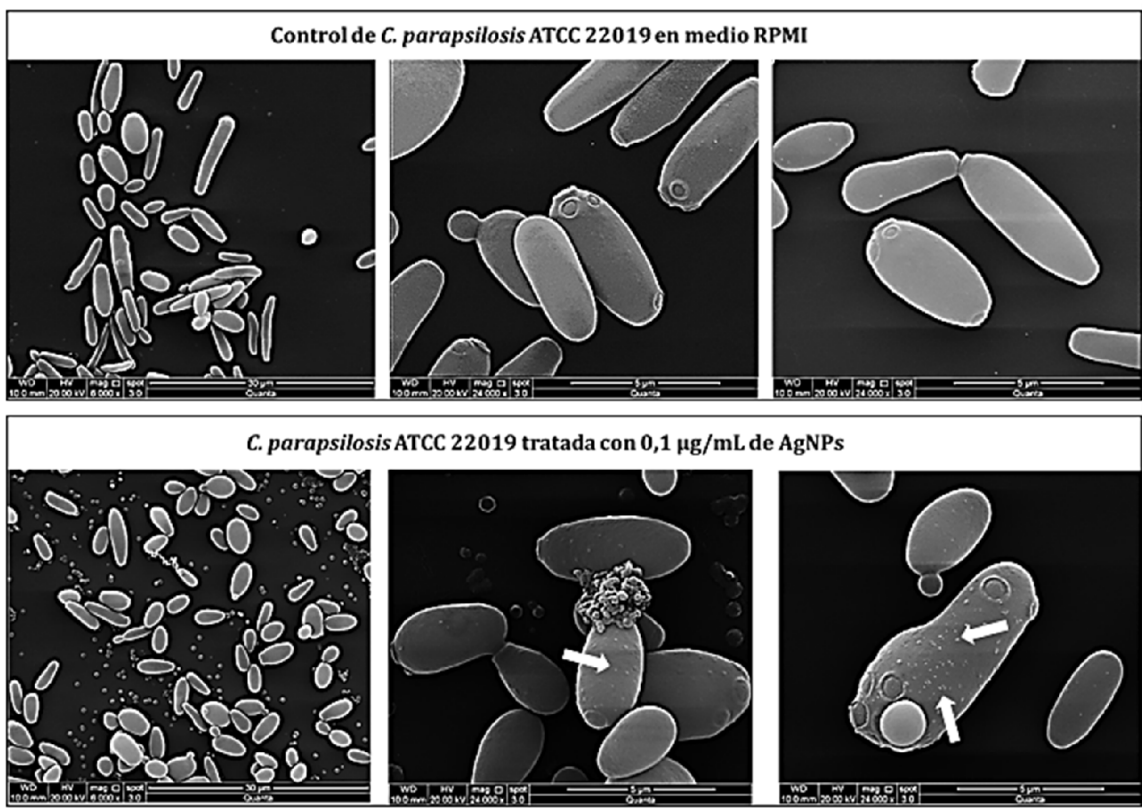
citoplasmática (Pontón, 2008). Por esa razón, es posible que la fluorescencia detectada en la mayoría de las células fuera producto de la interacción con las unidades de quitina inmersas en la membrana.

También, es necesario recordar que la estructura celular de la pared de *Candida* está constituida por polisacáridos y glicoproteínas intercaladas. Algunos autores (Qu *et al.*, 2012; Pringle *et al.*, 1989) indican que el BC sólo interactúa con microfibrillas de quitina y cadenas de polímeros nacies con conformaciones  $\beta$ -1,4 y que la interacción de polímeros con conformación  $\beta$ -1,3 (glucanos) es significativamente más débil o indetectable. Por el contrario, otros investigadores (Evans, 1996; Badrane *et al.*, 2012) afirman que el BC puede unirse a cadenas (1,3)  $\beta$ -D-glucano. En resumen, aunque la fluorescencia encontrada pueda ser el resultado de interacciones entre el BC con quitina u otros polisacáridos de la pared, el patrón observado en las células tratadas no fue alterado, por lo cual se realizaron otras técnicas microscópicas para corroborar el efecto de AgNPs en la superficie celular.

#### **4.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

Uno de los mecanismos de acción de las AgNPs y tal vez el más descrito en la literatura científica (Nasrollahi *et al.*, 2011; Noorbakhsh *et al.*, 2011; Morones *et al.*, 2005), es la acción sobre la pared celular. Según los resultados obtenidos mediante las microfotografías electrónicas de barrido, es evidente el anclaje de las AgNPs y el posterior daño en la superficie de la célula (Ver **Figura 12**). En este trabajo se demuestra que las nanopartículas están implicadas en alteraciones de la capa superficial de la célula levaduriforme (flechas). Aunque no es una alteración muy destacada, cabe mencionar que la concentración evaluada de AgNPs fue sub-inhibitoria ya que se requería obtener suficiente número de células previendo la pérdida inevitable de muestra durante su procesamiento.

Además, en las microfotografías de las células tratadas con AgNPs, se observan agregados adheridos a la superficie de la célula fúngica. Esto, corresponde a AgNPs que posiblemente están interactuando entre sí, tal como se pudo observar en la imagen de TEM de las nanopartículas sintetizadas mediante reducción con Cisteína. En este sentido, es posible pensar que el “ataque” de las AgNPs obtenidas con esta ruta de síntesis, se enfoca en una “red” de partículas con acción simultánea sobre la célula (Khan *et al.*, 2009; Cheow *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).



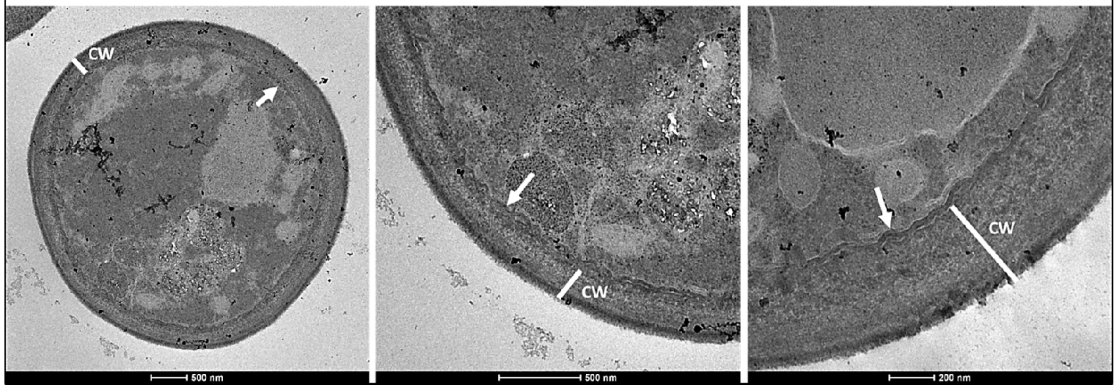
**Figura 12.** Efecto de AgNPs sobre *C. parapsilosis* evidenciado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Las células fueron tratadas durante 48 h con la CMI<sub>50</sub> de las AgNPs (cisteína) y fueron fijadas químicamente con glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 4%, se realizó la deshidratación y secado mediante la técnica de punto crítico y posteriormente fue metalizado con oro

y observado al microscopio. Todo el procedimiento fue realizado de la misma manera para el control (sin tratamiento con AgNPs).

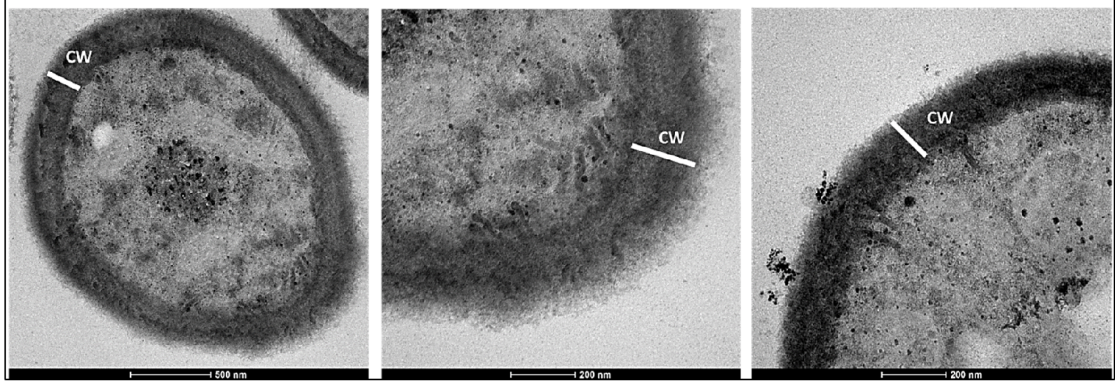
De acuerdo con las imágenes de TEM (Ver **Figura 13**), en primer lugar se confirman las alteraciones a nivel de la superficie celular observadas en las microfotografías electrónicas de barrido. La pared de las células (CW) tratadas con AgNPs presentan una menor compactibilidad, se observan discontinuas y exponen un incremento de su grosor con respecto al control, indicando desorganización estructural de los componentes. Los efectos encontrados son comparables con el daño generado en la célula posterior al proceso de esterilización como se evidencia en el trabajo de Kasperkovitz *et al.* 2011. En contraste, se muestra que las células control tienen un citoplasma electro-denso con membrana citoplasmática continua (flechas) y pared celular compacta. La alteración en la membrana y pared celular de las levaduras tratadas con AgNPs, permite a su vez mayor accesibilidad de las nanopartículas al interior de la célula, interactuando con las enzimas vitales y desencadenando inhibición de la replicación y multiplicación celular (Monge, 2009; Sardi *et al.*, 2013), como se evidenció en la fluorescencia con DAPI, presentada en el siguiente ítem.

Los daños generados en la pared celular de los hongos tienen efectos profundos en el crecimiento y morfología de la célula, puesto que la pared es la encargada principalmente de la rigidez celular, de soportar la presión osmótica y de limitar la entrada de moléculas tóxicas (Chaffin, 2008).

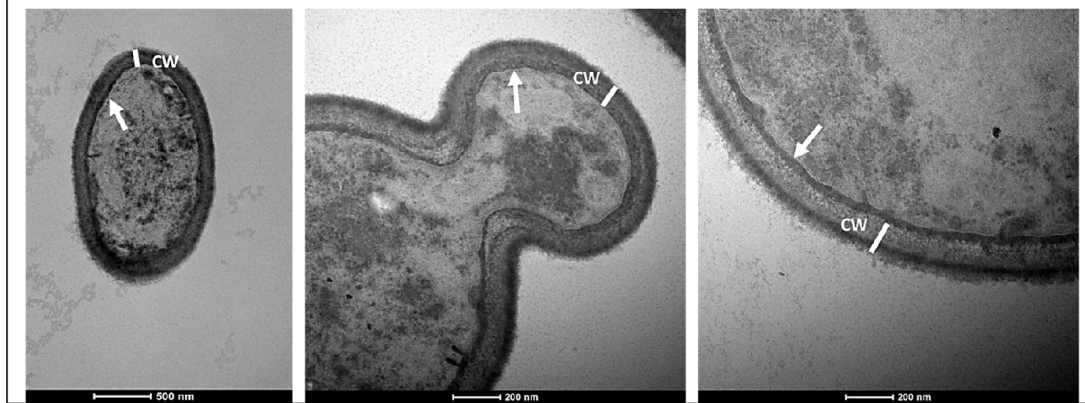
**Control de *C. albicans* ATCC 10231 en medio RPMI**

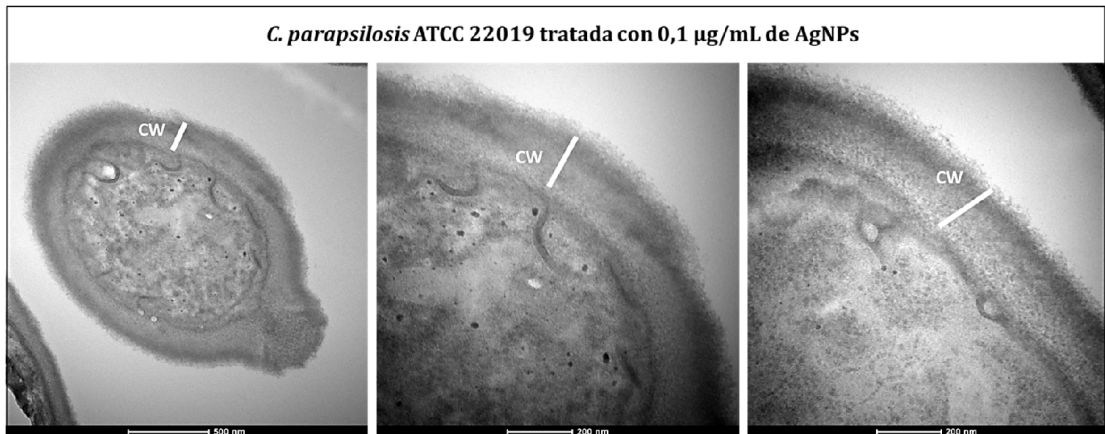


***C. albicans* ATCC 10231 tratada con 0,25 µg/mL de AgNPs**



**Control de *C. parapsilosis* ATCC 22019 en medio RPMI**

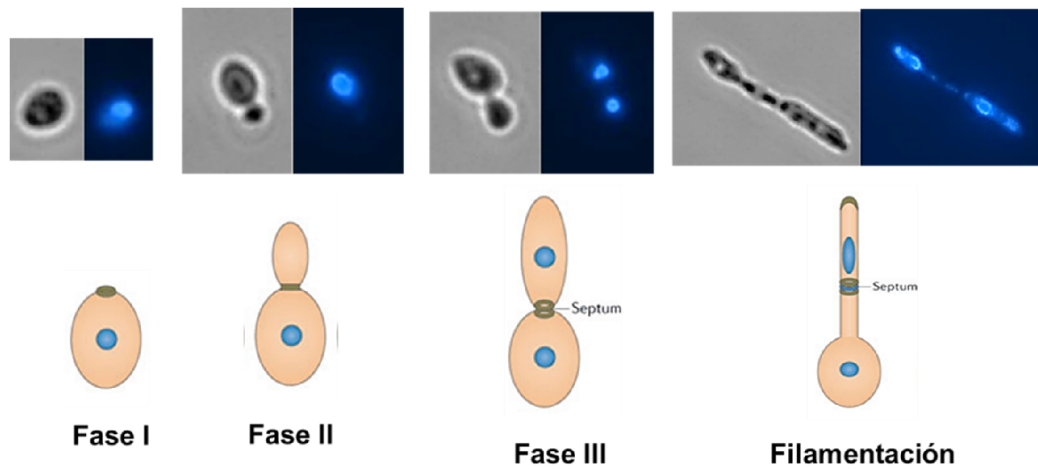




**Figura 13.** Efecto de las AgNPs sobre *Candida albicans* y *C. parapsilosis* evidenciado mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). Las células fueron tratadas durante 48 h con la CMI<sub>50</sub> de las AgNPs (cisteína) y fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 4%, se realizó la deshidratación e inclusión en resina y posteriormente se realizaron cortes ultrafinos contrastados con metales pesados para observar al microscopio. Todo el procedimiento fue realizado de la misma manera para el control (sin tratamiento con AgNPs).

#### 4.7 Fluorescencia con DAPI

La Microscopía de Fluorescencia utilizando el fluorocromo DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), fue realizada con el fin de analizar el posible efecto de las AgNPs sobre la división celular de la levadura, ya que tiene afinidad con regiones de Adenina y Timina del ADN. Se consideraron tres fases del ciclo levaduriforme (Fase I, II, III) y una fase de filamentación (Ver **Figura 14**), este último, se observa especialmente en *C. albicans* debido al dimorfismo exhibido por la especie.



**Figura 14.** Etapas de la división celular en *Candida* y la respectiva transferencia de material genético marcado con DAPI.

La técnica de fluorescencia empleando DAPI aprovecha la capacidad de este compuesto de pasar a través de la membrana celular y unirse al material genético de las células. Este marcaje permitió hacer seguimiento de la división celular de *Candida* posterior al tratamiento con AgNPs (Ver **Tabla 11**). Para el ciclo levaduriforme (Fases I, II y III), los resultados indicaron que el comportamiento es independiente a la especie evaluada. Una vez fue expuesto a AgNPs, *C. parapsilosis* presentó un mayor número de células individuales (en Fase I), sin indicio de brotación (o gemación), y el número de células gemantes sin transferencia de ADN (Fase II) fue disminuido a la mitad. Posiblemente, esta inhibición en la transferencia de material genético está implicada en la detención de la multiplicación celular luego de la exposición a AgNPs, confirmando lo descrito por otros autores (Monge, 2009; Sardi *et al.*, 2013).

En cuanto a los resultados obtenidos en *C. albicans*, se evidencia que posterior al tratamiento con AgNPs, se incrementó el número de células gemantes con transferencia de material genético (en Fase III), pero se observa que las gemantes permanecieron como células individuales (incremento en Fase I) y no continuaron a su fase filamentosa. La inhibición de la filamentación de *C. albicans* es un

resultado relevante, puesto que es uno de los atributos de virulencia que influyen en gran medida en la patogénesis de la Candidiasis (Castrillón *et al.*, 2005; Naglik *et al.*, 2011; Naglik *et al.*, 2003).

**Tabla 11.** Efecto de AgNPs sobre el ciclo celular de *Candida*. Se evidencia el efecto de las AgNPs (cisteína) sobre la división celular de las especies de *Candida albicans* y *C. parapsilosis*. Los datos presentados corresponden al análisis realizado en 200 células/ensayo. Se exhiben de igual forma los resultados obtenidos de las células no tratadas con AgNPs. Las células de cada ensayo fueron contadas por triplicado.

Muestra	N° de Células En Fase I	N° de Células En Fase II	N° de Células En Fase III	N° de Células En Fase Filamentación
Control de <i>C. parapsilosis</i>	147 ±3	38 ±5	14 ±3	1 ±0
<i>C. parapsilosis</i> tratada con 0.1 µg/mL de AgNPs	169 ±4*	17 ±3*	10 ±2	0 ±0
Control de <i>C. albicans</i>	81 ±3	46 ±2	65 ±2	8 ±0
<i>C. albicans</i> tratada con 0.25 µg/mL de AgNPs	90 ±2*	42 ±4	86 ±3*	2 ±0*

\*Alteración evidenciada

#### 4.8 EFECTO DE AgNPs (Cisteína) SOBRE LA SECRECIÓN DE PROTEASAS

##### 4.8.1 Ensayo cualitativo sobre proteasas fúngicas

Teniendo en cuenta la importancia de la secreción de proteasas como uno de los atributos de virulencia en *Candida*, el interés de este trabajo también se centró en determinar de forma cualitativa la producción de proteasas aspárticas posterior al

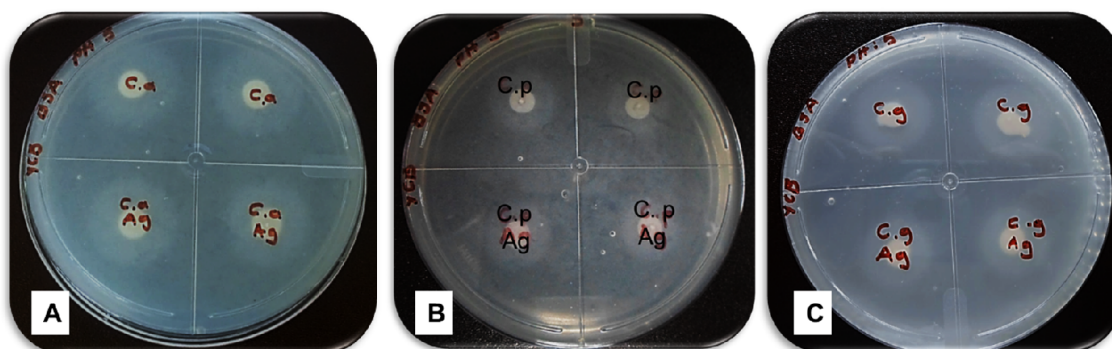
tratamiento con AgNPs. Diferentes métodos han sido implementados por los investigadores para medir la actividad de proteasas en levaduras (Chand *et al.*, 2011; Kantarcioglu *et al.*, 2002; Ray *et al.*, 1990; Sachin *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2014). La detección cualitativa de proteasas inicialmente fue estandarizada teniendo en cuenta variables como la fuente proteica, medio de cultivo para detectar la hidrólisis y pH del medio de cultivo. Las fuentes de proteína consideradas, la albúmina de suero bovino (BSA) y la caseína, empleadas a concentraciones menores de 0.2%; el pH evaluado para secreción de proteasas *in vitro* entre 3 a 5; y los medios de cultivo base nitrógeno levadura (YNB) y base carbón levadura (YCB) fueron condiciones que permitieron alcanzar una metodología que detectara cualitativamente la secreción de proteasas (Ramos *et al.*, 2014; Chand *et al.*, 2011; Sachin *et al.*, 2012). El medio de cultivo YCB suplementado con 0.1% de BSA y ajustado a pH 5.0, fue el que favoreció la detección de las enzimas secretadas.

La **tabla 12** presenta los resultados del efecto de las AgNPs sobre la actividad proteolítica de las especies de *Candida*. Este ensayo fue realizado por duplicado en tres experimentos independientes. En la **figura 15** se muestra uno de los ensayos realizados.

**Tabla 12.** Ensayo cualitativo del efecto de AgNPs sobre la secreción de proteasas. Los ensayos fueron realizados en cajas de petri con medio de cultivo base carbón levadura (YCB) suplementado con BSA 0.1% y ajustado a pH 5.0.

Especie de <i>Candida</i>	Tiempo de incubación	Diámetro de halo (cm)	
		Control (sin AgNPs)	Tratamiento con AgNPs*
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	18 h	2.6 ±0.2	2.7 ±0.2
	24 h	3.0 ±0.2	2.8 ±0.1
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	18 h	1.5 ±0.2	1.0 ±0.1
	24 h	2.5 ±0.1	2.2 ±0.1
<i>C. guilliermondii</i>	18 h	1.9 ±0.2	1.5 ±0.1
	24 h	2.7 ±0.1	2.5 ±0.1

\* Las cepas se expusieron a la CMI<sub>50</sub> de AgNPs



**Figura 15.** Ensayo cualitativo de secreción de proteasas de **(A)** *C. albicans* ATCC 10231 **(B)** *C. parapsilosis* ATCC 22019 **(C)** *C. guilliermondii*. Cada imagen presenta las células tratadas con AgNPS (Ag) y el respectivo control sin tratamiento. Las fotografías fueron tomadas a las 18 horas de incubación.

Los resultados del ensayo cualitativo, exponen mínimas diferencias entre la producción de proteasas en condiciones estrictas del ensayo. Por ello, se considera que la actividad proteolítica de *Candida* no fue alterada de forma importante ante la exposición a AgNPs. Lo anterior, fue confirmado en el ensayo cuantitativo descrito en el siguiente ítem, aun considerando que el comportamiento de secreción de Sap puede presentar diferencias en medio sólido (ensayo cualitativo) con respecto al

medio líquido (ensayo cuantitativo) debido a la velocidad de crecimiento y la disposición de la fuente nutritiva (Chand *et al.*, 2011).

De acuerdo con los resultados, se puede considerar que los medios de cultivo sólidos suplementados con una fuente proteica son una alternativa viable y fácil de usar para detectar la acción de proteasas (Kumar *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2014; Chand *et al.*, 2011; Sachin *et al.*, 2012). El uso de esta metodología puede tener una gran aplicabilidad, permitiendo evidenciar la secreción de enzimas proteolíticas posterior al tratamiento de interés, en este caso con AgNPs. Asimismo, la técnica en cuestión permite establecer la relación directa entre la producción de proteasas y la patogenicidad de las levaduras como se describe en diferentes estudios (Sachin *et al.*, 2012; Junior *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2014)

#### **4.8.2 Ensayo cuantitativo sobre proteasas fúngicas**

Considerando la importancia de establecer de forma cuantitativa la acción proteolítica de las proteasas secretadas por *Candida* posterior a la exposición con AgNPs, se determinó la actividad enzimática, definida como la cantidad de enzima capaz de catalizar la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto. Para tal fin, la actividad hidrolítica de las proteasas fue determinada con base en la hidrólisis de BSA al 0.1% y posteriormente fue cuantificada mediante espectrofotometría. Los datos presentados en la **tabla 13** fueron calculados a partir de la curva patrón de tirosina, las absorbancias obtenidas y la fórmula descrita en el **anexo 3**. Se descartó interferencia de las AgNPs con el reactivo de folin empleado en la cuantificación espectrofotométrica y asimismo del caldo YPD (extracto de levadura 0.25%, peptona 0.5%, dextrosa 0.25%) empleado durante el ensayo. Las condiciones finales del ensayo se obtuvieron tras la estandarización empleando variables presentadas en otras investigaciones (Chand *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2014).

**Tabla 13.** Efecto de las AgNPs sobre la actividad proteolítica de Sap. El ensayo fue realizado en buffer citrato 0.1M pH: 3.2 suplementado con BSA a 0.1%. La reacción de hidrólisis se realizó a 35°C y fue detenida con ácido tricloroacético (TCA al 15%). Los ensayos se realizaron por triplicado.

ENSAYO	ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA (Unidades/mL enzima)
Control de <i>C. parapsilosis</i>	7.94 ±1.8
<i>C. parapsilosis</i> tratada con 0.1µg/mL de AgNPs	7.17±1.1
Control de <i>C. albicans</i>	11.47±2.1
<i>C. albicans</i> tratada con 0.25µg/mL de AgNPs	8.57±2.5

Los resultados del efecto inhibitorio en la secreción de proteasas de *Candida* tanto en el estudio cualitativo como cuantitativo, demuestran que no hay una inhibición marcada de estas enzimas proteolíticas posterior al tratamiento con AgNPs a la CMI<sub>50</sub>.

Existen numerosas publicaciones en las cuales se relaciona la secreción de proteasas en aislados de *Candida albicans* y su rol en la patogénesis de la candidiasis cutánea e invasiva (Hube *et al.*, 1997; Correia *et al.*, 2010; Sachin *et al.*, 2012; Junior *et al.*, 2011). Sin embargo, es escasa la literatura científica sobre la producción de enzimas proteolíticas en otras especies del género, y aun menor el número de trabajos donde se relacione la inhibición de proteasas aspárticas con las AgNPs (Kantarcioğlu *et al.*, 2002; De Bernardis *et al.*, 1999; Junior *et al.*, 2011). Por lo anterior, el enfoque de este estudio hacia la posible inhibición de las proteasas de *Candida* como efecto del tratamiento con AgNPs es novedoso y a su vez, limita la comparación con otros estudios.

Considerando las diferentes investigaciones que determinan o detectan la actividad proteolítica de las cepas de *Candida* con el fin de relacionarlas con el sitio de aislamiento y la virulencia (Kumar *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2014; Chand *et al.*, 2011; Sachin *et al.*, 2012), cabe mencionar que este trabajo logró evidenciar la actividad de proteasas secretadas por las especies *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. guilliermondii*, resultados similares a los obtenidos por otros autores (De Bernardis *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 1992; Kantarcioglu *et al.*, 2002) donde demostraron actividad proteolítica por especies diferentes a *C. albicans*.

Los ensayos cualitativos y cuantitativos realizados en la determinación de proteasas fueron útiles para evidenciar que las especies de *Candida* seleccionadas en el estudio presentaron acción proteolítica y para determinar que el tratamiento con AgNPs no generó una marcada inhibición en la secreción enzimática. Es importante mencionar que las proteasas como atributos de virulencia no representarían una preocupación ya que el tratamiento con AgNPs evita la secreción de estas enzimas dado el efecto fungicida sobre las especies de *Candida*.

## 5. CONCLUSIONES

La síntesis de AgNPs empleando cisteína como agente reductor fue seleccionada como la mejor estrategia de síntesis debido a que constituyó un método reproducible y rápido para la obtención de AgNPs estables y adicionalmente este tipo de síntesis presentó los mejores resultados de actividad antifúngica sobre las cepas de *Candida* evaluadas.

Las AgNPs sintetizadas evidenciaron mayor potencia y eficacia farmacológica *in vitro* con respecto al antifúngico convencional, fluconazol y en consecuencia, se pueden considerar como un potencial agente anticandidiásico para el control fúngico de cepas sensibles y resistentes a fluconazol.

La metodología de microdilución en caldo estandarizada por el CLSI para levaduras, es una técnica reproducible y confiable para el análisis de la actividad antifúngica de nanopartículas de plata.

La encapsulación de AgNPs con PLGA presentó la mayor actividad anticandidiásica con respecto a la demostrada con los otros biopolímeros y potencializó entre 25 a 50 veces la actividad antifúngica de las nanopartículas.

El compuesto encapsulado PLGA@Ag fue en promedio 5 veces menos tóxico para los fibroblastos de murino, en comparación con las AgNPs libres que demostraron mínima citotoxicidad.

Las nanopartículas de plata sintetizadas en el presente estudio tienen como blanco la pared y la membrana celular de la levadura y constituyen las causas de inhibición y/o muerte de las especies de *Candida*.

El tratamiento con AgNPs inhibe la filamentación de *C. albicans* y en consecuencia, disminuye la virulencia de la especie puesto que es uno de los principales atributos que influyen en la severidad de la Candidiasis por este agente.

Los resultados del efecto inhibitorio en la secreción de proteasas de *Candida* tanto en el estudio cualitativo como cuantitativo, demostraron que no hay una destacada inhibición proteolítica posterior al tratamiento con AgNPs.

Finalmente, la actividad antifúngica exhibida por las AgNPs libres y encapsuladas frente a especies de *Candida* y el mínimo efecto citotóxico, permiten considerar los nanocompuestos de plata como una potencial alternativa en el desarrollo de nuevos agentes anticandidiásicos.

## 6. RECOMENDACIONES

Evaluar el efecto antifúngico de las AgNPs sobre otras especies de levaduras y hongos filamentosos de interés en salud pública y determinar la citotoxicidad de las AgNPs frente a otros tipos de líneas celulares y a nivel *in vivo*.

Realizar ensayos moleculares que permitan determinar más a fondo las posibles alteraciones a nivel del material genético de las células fúngicas y asimismo continuar con otras técnicas que evidencien daños en la integridad de los componentes celulares y subcelulares de los hongos como por ejemplo inmunofluorescencia.

Por último, teniendo en cuenta el efecto hallado de las AgNPs sobre la membrana y pared celular de *Candida*, sería importante evidenciar mediante microfotografías electrónicas tal efecto en función del tiempo de exposición a nanopartículas y analizar la progresión del daño causado en la célula fúngica.

## DIVULGACIÓN

Nombre del evento: **Global Biotechnology Congress 2013**

Realizado entre el 03 – 06 de Junio de 2013 en Boston, USA.

Producto asociado:

- In vitro antifungal activity of silver nanoparticles against different species of *Candida spp.*

Nombre del evento: **44<sup>th</sup> World Chemistry Congress IUPAC 2013**

Realizado entre el 11 – 16 de Agosto de 2013 en Estambul, Turquía

Productos asociados:

- Synthesis, characterization and antibacterial activity of silver nanoparticles
- Green synthesis of silver nanoparticles and its antifungal activity against different species of *Candida spp*

Nombre del evento: **VII Congreso Internacional de Materiales**

Realizado entre el 29 de Octubre – 01 de Noviembre de 2013 en Medellín, Colombia

Producto asociado:

- Síntesis química de nanopartículas de plata con actividad antifúngica sobre *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*.

## ESTANCIA INTERNACIONAL

La pasantía de investigación fue realizada en el Laboratorio de Quimioterapia Antifúngica del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sao Paulo, Brasil, bajo la tutoría de la profesora Kelly Ishida y en el Laboratorio de Biología Celular de Hongos del Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho de la Universidad Federal de Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil. En estos laboratorios se realizó Microscopía de Fluorescencia con Blanco de calcoflúor y DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). Además, se realizó Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) para evidenciar el efecto de las AgNPs sobre las células fúngicas.

## BIBLIOGRAFÍA

Aaron, M. (1998). Dimorphism and virulence in *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology*. 1: 687–692

Albrecht, A., Naglik, J. *et al.* (2004). *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cellular Microbiology*. 6: 915–926

Allevato, M., Negroni, R., Galimberti, R. (2007). Antifúngicos Ayer, hoy y mañana. *Act Terap Dermatol*. 30: 8-19

Almofti, M., Ichikawa, T., Yamashita, K. *et al.* (2003). Silver ion induces a cyclosporine a-insensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome C. *J. Biochem*. 134: 43 - 49

Ayala, N., Lara, H., Ixtepan, L. *et al.* (2009). Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: *Nanoscale does matter*. 5: 2-9.

Barnes, W., Dereux, A., Ebbesen, W. (2003). Surface plasmon subwavelength optics. *Nature*. 424: 824-830.

Badrane, H., Hong, M., Blankenship, J. *et al.* (2012). Rapid Redistribution of Phosphatidylinositol- (4,5)- Bisphosphate and Septins during the *Candida albicans* Response to Caspofungin. 56: 4614-24.

Bennewitz, M., Lobo, T., Nkansah, M., Ulas, G, *et al.* (2011). Biocompatible and pH-Sensitive PLGA Encapsulated MnO Nanocrystals for Molecular and Cellular MRI. *ACS Nano*. 5: 3438-3446.

Braydich, L., Hussain, S., Schlager, J. *et al.* (2005). In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol Sci.* 88: 412 - 419.

Carmichael J, Mitchell J, DeGraff W, et al. (1988). Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br J Cancer.* 57: 540–547.

Castrillón, L., Palma, A. *et al.* (2005). Factores de virulencia en *Candida sp.* *Dermatología Rev Mex.* 49: 12-27

Catalán M., Montejo J. (2006). Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Rev Iberoam Micol.* 23: 39-49

Chaffin, W. (2008). *Candida albicans* Cell Wall Proteins. *Microbiology and molecular biology reviews.* 72: 495–544

Chaffin, W. y López, J. (1998). Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. *Microbiology and molecular biology reviews.* 62:130–180

Challacombe, J., Naglik, J *et al.* (2003). *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews.* 67: 400–428

Chaloupka, K., Malam, Y., Seifalian, A. (2010). Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology.* 28: 580-8.

Chand, R., Salwan, R and Yadav, K. (2011). Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement. *Critical Reviews in Microbiology.* 3: 262–276

Chen, X. y Schluesener, H. (2008). Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicology Letters*. 176: 1–12.

Cheow, W., Chang, M., Hadinoto, K. (2010). Antibacterial Efficacy of Inhalable Levofloxacin-Loaded Polymeric Nanoparticles against E. coli Biofilm Cells: The Effect of Antibiotic Release Profile. *Pharm Res*. 27: 1597–1609.

Choi, O., Deng, K., Kim, N. *et al.* (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res*. 42: 3066 – 74.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2008). *Document M27-A3: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast; Approved Standard – (3<sup>a</sup> Ed)*, Pennsylvania, USA

Cortés, J., Reyes, P., Gómez, C. *et al.* (2011). Fungal bloodstream infections in tertiary care hospitals in Colombia. *Rev Iberoam Micol*. 28: 74–78.

Correia, A., Lermann, U., Teixeira, L. *et al.* (2010). Limited role of secreted aspartyl proteinases Sap1 to Sap6 in *Candida albicans* virulence and host immune response in murine hematogenously disseminated candidiasis. *Infect Immun*. 78:4839-49

Danhier, F., Ansorena E., Joana, M *et al.* (2012). PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release*. 161: 505–522.

De Bernardis *et al.* (1999). Evidence that Members of the Secretary Aspartyl Proteinase Gene Family, in Particular SAP2, Are Virulence Factors for *Candida Vaginitis*. *J Infect Dis*. 179: 201-208.

De la Rosa, E. (2007). Nanofotónica: luz y nanopartículas. *Concyteg*. 24: 412 - 420.

Dongwei, W., Wuyong, S., Weiping, Q. *et al.* (2009). The synthesis of chitosan-based silver nanoparticles and their antibacterial activity. *Carbohydrate Research*. 344: 2375–2382

Dostal, J., kova, P. *et al.* (2003). Simple Method for Screening Candida Species Isolates for the Presence of Secreted Proteinases: a Tool for the Prediction of Successful Inhibitory Treatment. *Journal of clinical microbiology*.41: 712–716

Dos Santos P, McArthur C, and Joyce C. (2014). Multi-drug resistant oral Candida species isolated from HIV-positive patients in South Africa and Cameroon. *Diagn Micr Infec Dis*. 79: 222–227

Enwuru, C., Ogunledun, A., Idika, N. *et al.* (2008). Fluconazole resistant opportunistic oropharyngeal *Candida* and non-*Candida* yeast-like isolates from HIV infected patients attending ARV clinics in Lagos, Nigeria. *Afr Health Sci*. 8: 142–148.

Gogoi S, Gopinath P, Paul A, *et al.* (2006). Green Fluorescent Protein-Expressing Escherichia coli as a Model System for Investigating the Antimicrobial Activities of Silver Nanoparticles. *Langmuir*. 22: 9322–9328

Gregori S, Bárbara S. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm*. 39:2

Gutiérrez, C., De Bedout, C. *et al.* (2007). Sensitivity to Fluconazol and Voriconazol in *Candida spp.* isolates from the oral mucosa of HIV positive patients. *Infectio*. 11: 183-189.

Hauman, C., Thompson, I. y Wolfaardt, P. (1993). Oral carriage of *Candida* in healthy and HIV-seropositive persons. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*.76: 570-572.

Evans, I. (1996). *Yeast Protocols: Methods in Cell and Molecular Biology*. 53: 391-393

Hube, B., Sanglard, D., Odds, F. *et al.* (1997). Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence. *Infect Immun*. 65:3529-38

Huffnagle, G., Noverr, M. (2013). The emerging world of the fungal microbiome. *Trends in Microbiology*. 21: 334-341

Huh, J., Jik, Y. (2011). "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*. 156: 128–145

Junior, A., Silva, A., Rosa, F., *et al.* (2011). In vitro differential activity of phospholipases and acid proteinases of clinical isolates of *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 44:334-338

Kantarcioglu, S., Yücel, A. (2002). Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses*. 45: 160-5

Kasperkovitz, P., Khan, N., Tam, J. *et al.* (2011). Toll-Like Receptor 9 Modulates Macrophage Antifungal Effector Function during Innate Recognition of *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Infection and immunity*. 79: 4858–4867

Khan, Z., Tnabaiti, T. y Mossalamy, E. (2009). Effect of macromolecule poly(vinyl alcohol) on the growth of cetyltrimethylammonium bromide stabilized Ag-nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects*. 352: 31-37

Kumar, C., Kumar, S., Menon, T. (2006). Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. *Mycopathologia*.161:213–8.

Kumar, S., Nagaraja, B., Shashikala, V., et al. (2004). Highly efficient Ag/C catalyst prepared by electro-chemical deposition method in controlling microorganisms in water. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. 223: 313–319

Kumar, S., Gandhi, K., Kumar, R. (2007). Modeling of formation of gold nanoparticles by Citrate Method. *Ind Eng Chem Res*. 46: 3128-36

Kumari, A., Kumar, S., Yadav, S. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 75: 1-18.

Lima, P. (2013). Nanotecnología y sus aplicaciones. Editorial Ciencias Paralelas. Disponible en: <http://www.cienciasparalelas.com.br/nanotecnologia-e-suas-aplicacoes/>

Liu, W. (2009). Nanoparticles and Their Biological and Environmental Applications. *Rev Cubana Salud Pública*.

Lok, C., Chen, R., Yu, W. et al. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J Proteome Res*. 5: 916–924.

Maestre, V. y Cervera, L. (2001). Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. *Revista Española de Quimioterapia*. 14: 3

Mansoor, M., Kalathil, S., Lee, J. et al. (2012). Synthesis of cysteine capped silver nanoparticles by electrochemically active biofilm and their antibacterial activities. *Bull Korean Chem Soc*. 33: 2592-96.

Martínez, M., López-Ribot, J. Kirkpatrick, W. *et al.* (2002). Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother.* 49: 515-24.

Mocanu A, Furtos G, Rapuntean S, *et al.* (2014). Synthesis; characterization and antimicrobial effects of composites based on multi-substituted hydroxyapatite and silver nanoparticles. *Appl Surf Sci.* 1—11

Monge, M. (2009). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *An. Quím.* 105: 33-41

Monteiro, D., Negri, M., Silva, S., Gorup, L., Rodrigues, E., Oliveira, R., Barros, D., y Henriques, M. (2014). Adhesion of *Candida* biofilm cells to human epithelial cells and polystyrene after treatment with silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 114, 410– 412.

Mora, C., Fessi, H., Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics.* 385: 113-142.

Morones, J., Elechiguerra, J., Camacho A. *et al.* (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology.* 16: 2346-2353.

Nafee, N., Schneider, M., Schaefer, U., Lehr, C. (2009). Relevance of the colloidal stability of chitosan/PLGA nanoparticles on their cytotoxicity profile. *International Journal of Pharmaceutics.* 381: 130–139

Naglik, J., Moyes, D., Achtler, B., Hube, B. (2011). *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and Infection.* 13: 963–976.

Naglik, J., Rodgers, C. (2003). Differential Expression of *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinase and Phospholipase B Genes in Humans Correlates with Active Oral and Vaginal Infections. *Journal Infectious Diseases*. 188: 469–79

Nair, L., Laurencin, C. (2007). Silver Nanoparticles: Synthesis and Therapeutic Applications. *J Biomed Nanotechnol*. 3: 301-316.

Nanda, A., Saravanan, M. (2009). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine*. 5:452-456.

Nasrollahi, A., Pourshamsian, K. y Mansourkiaee, P. (2011). Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi, *Int J Nano Dim*.1: 233-239.

Neufeld, M., Ribeiro, J. A. *et al.* (2006). Nanoencapsulation II. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2: 53-65.

Noorbakhsh, F., Rezaie, S. y Shahverdi, A. (2011). Antifungal Effects of Silver Nanoparticle alone and with Combination of Antifungal Drug on Dermatophyte Pathogen *Trichophyton Rubrum*. *Biochemistry and Bioinformatics*. 5: 364-367

Noritomi, H., Igari, N., Kenji, U. *et al.*(2010). Synthesis and size control of silver nanoparticles using reverse micelles of sucrose fatty acid esters. *Colloid Polym Sci*. 288: 887–89.

Pal, S., Kyung, Y. y Song, J. (2007). Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-

Negative Bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*.73: 1712–1720.

Pan, Y., Neuss, S., Leifert, A., Fischler, M., *et al.* (2007). Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small*. 3:1941-9.

Panacek, A., Kolar M. y Vecerova, R. *et al.* (2009). Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida spp.* *Biomaterials*.30: 6333–6340.

Paredes, D. (2011). Estudio del efecto antibacteriano de nanopartículas de plata sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Petica, A., Gavrilu, S., Lungu, M., Buruntea, N., Panzaru, C. (2008). Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Mater Sci Eng B*. 152, 22-27

Pfaller, M., Diekema, D., Mendez, M. *et al.*(2006). *Candida guilliermondii*, an Opportunistic Fungal Pathogen with Decreased Susceptibility to Fluconazole: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. *Journal of clinical microbiology*.44:3551–3556

Pfaller M, Diekema D. (2007). Epidemiology of Invasive Candidiasis a Persistent Public Health Problem. *Clin Microbiol Rev*. 20: 133 –163.

Pinto, C., Ronald, M., Neufeld, J. *et al.* (2006).Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2: 8-21.

Pringle, J., Preston, R., Adams, A. *et al.* (1989). Methods in cell biology. Chapter 19, Fluorescence microscopy methods for yeast. 31: 381-383.

Qu, Y., Jelacic, B., Pettolino, F. *et al.* (2012). Mitochondrial Sorting and Assembly Machinery Subunit Sam37 in *Candida albicans*: Insight into the Roles of Mitochondria in Fitness, Cell Wall Integrity, and Virulence. 11: 532-544.

Rai, M., Yadav, A. y Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*. 27: 76–83.

Ramos, L., Barbedo, L., Silva, L., *et al.* (2014). Protease and phospholipase activities of *Candida* spp. isolated from cutaneous candidiasis. *Rev Iberoam Micol*.

Ray, T., Payne, C. (1990). Comparative production and rapid purification of *Candida* acid proteinase from protein-supplemented cultures. *Infect Immun*. 58: 508-14.

Rivas, J., Cortés, J., Cuervo, S. *et al.* (2009). Resistencia al fluconazol en aislamientos clínicos de *Candida* en un centro de referencia de pacientes con cáncer. Libro de Resúmenes V Congreso *Rev Chil Infect*. 26: 135-143.

Ruparelia, J., Chatterjee, A., Duttagupta, S. *et al.* (2008). Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomaterialia*. 4: 707–716.

Sachin, C., Ruchi, K., Santosh, S. (2012). In vitro evaluation of proteinase, phospholipase and haemolysin activities of *Candida* species isolated from clinical specimens. *Int J Med Biomed Res*.1:153-157

Sánchez, Y., Cabrera, N., Toledo, A. *et al.* (2009). Nanotechnology and its possibilities of application in the scientific-technological field. *Rev Cuban salpubl*.35: 1-9

Sanglard D. (2002). Importancia clínica de los mecanismos de resistencias a los antifúngicos en las levaduras. *EnfermInfeccMicrobiolClin*.20: 225-234.

Sardi, J., Almeida, A., Mendes, M. *et al.* (2011). New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites – a brief review.*Arch Oral Biol*.56: 951–959

Sardi, J., Scorzoni, L. *et al.* (2013). Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*. 62: 10–24

Schaller, M., Krnjaic, N. *et al.* (2003).Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by Candida albicans. *Journal of Medical Microbiology*. 52: 247–249

Schommer, N y Gallo, R. 2013. Structure and function of the human skin microbiome *Trends in Microbiology*. 21: 12

Shanmugasundaram T, Radhakrishnan M, Gopikrishnana V, Pazhanimurugan R, Balagurunathan R. (2013). A study of the bactericidal, anti-biofouling, cytotoxic and antioxidant properties of actinobacterially synthesised silver nanoparticles. *Colloids Surf*.111: 680 - 687

Sharma, V., Yangard, R. y Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*. 145: 83–96

Schrand, A., Braydich, L., Schlager, J. *et al.* (2008). Can silver nanoparticles be useful as potential biological labels?.*Nanotechnology*. 19: 235104 – 17

Singh, M., Singh, S., Prasad, S. *et al.* (2008). Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of Silver nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 3:115 – 122.

Solomon, S., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. *et al.* (2007). Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *Journal of Chemical Education*.84: 322-325

Sondi, I., Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*.275: 177-182

Sudbery, P. (2011). Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nature Reviews Microbiology* 9: 737-748

Taniguchi, N. (1974). On the Basic Concept of Nano-Technology. *Japan Society of Precision Engineering*. Disponible en: <http://www.nano.gov/html/facts/whatIsNano.html>.

Tao, A., Sinsermsuksakul, P. *et al.* (2006). Polyhedral silver nanocrystals with distinct scattering signatures. *Angew Chem Int*. 45: 4597-4601.

Torres, D., Alvarez, M., Rondón, S. (2009). Evaluación mediante tres técnicas de susceptibilidad a fluconazol en especies de *Candida* aisladas en pacientes con infecciones invasoras, Bogotá - Colombia. *Rev Chilena Infectol*. 26: 135–43.

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. *et al.* (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. 39: 309–317

Yamamoto, T., Nohara, K., Uchida, K. *et al.* (1992). Purification and characterization of secretory proteinase of *Candida albicans*. *Microbiol Immunol*. 36: 637-41

Yang, Y. (2003). Virulence factors of *Candida*, *J Microbiol Immunol Infect.* 36: 223-228

Yen, H., Hsu, S., Tsai, C. (2009). Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small.* 5:1553-61.

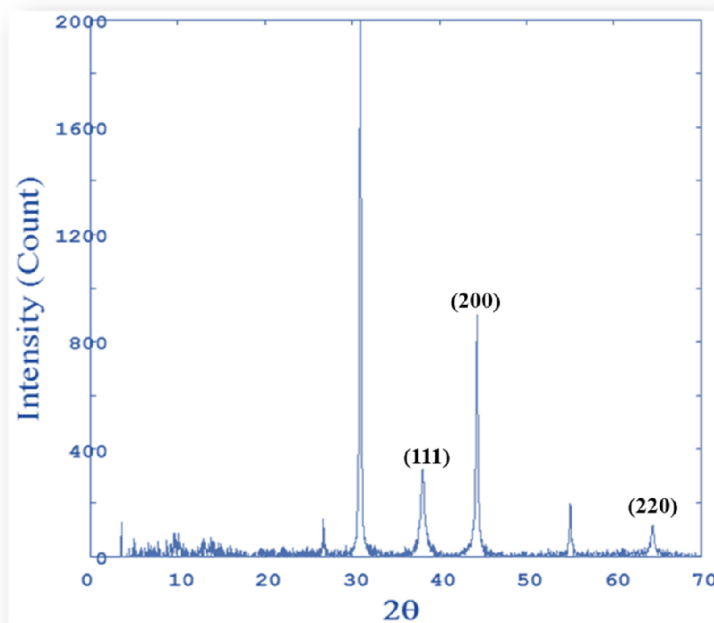
Young-Ki, J., Byung, K., and Geunhwa, J. (2009). Antifungal Activity of Silver Ions and Nanoparticles on Phytopathogenic Fungi. *Plant Disease.* 93: 1037- 43.

Zhang, L., Pornpattananankul, D., Hu, C. *et al.* (2010). Development of Nanoparticles for Antimicrobial Drug Delivery. *Current Medicinal Chemistry.* 17: 585-594.

Zuluaga, A., De Bedout, C., Agudelo, C. *et al.* (2010). Sensibilidad a fluconazol y voriconazol de especies de *Candida* aisladas de pacientes provenientes de unidades de cuidados intensivos en Medellín, Colombia (2001–2007). *Rev Iberoam Micol.* 27: 125-129.

## ANEXOS

**ANEXO 1.** Determinación de la fase cristalina de las AgNPs (cisteína) mediante Difracción de Rayos X (DRX).



El espectro corresponde a la difracción de rayos X de AgNPs utilizando cisteína como agente reductor. Estos patrones se compararon y se interpretaron con datos estándar del Centro Internacional de Datos de Difracción (ICDD). Los picos característicos de la plata fueron consistentes con un sistema cúbico centrado en las caras (FCC). Los principales picos a  $2\theta$  de  $38.08^\circ$ ,  $44.32^\circ$ ,  $64,5^\circ$  corresponden a faceta cúbica (111), (200), (220), respectivamente. El espectro de difracción de rayos X confirma la estructura cristalina de nanopartículas de plata. Todos los picos en el difractograma de rayos X pueden ser fácilmente indexados a una estructura cúbica centrada en la cara de plata según la literatura disponible (JCPDS, No. 4-0783). Sin embargo, la aparición de diferentes picos en la muestra indica la presencia de impurezas producidas posiblemente por iones bromuro (Br) a partir de CTAB y  $\text{Ag}^+$  no reducido en solución.

**ANEXO 2.** Protocolos de Microscopía empleados en el desarrollo del presente proyecto.

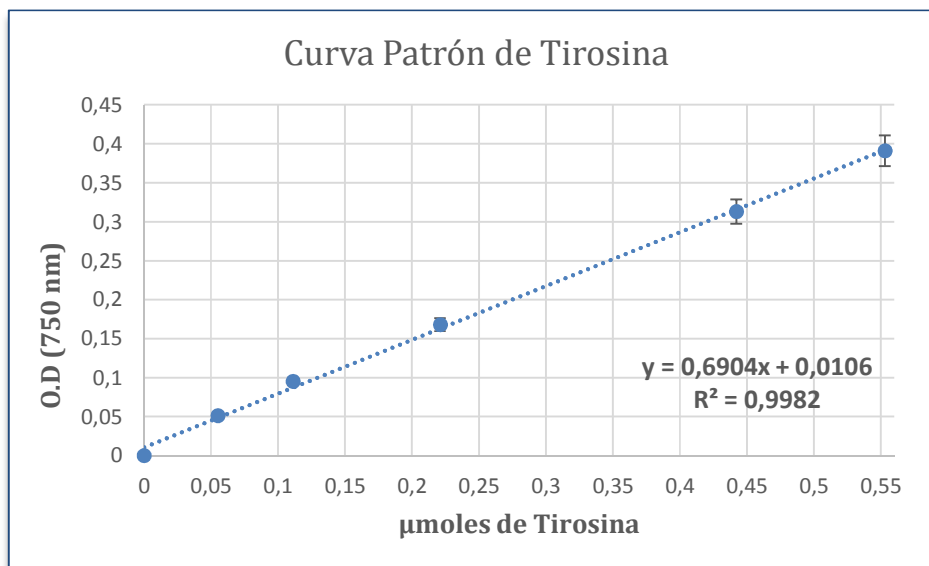
**Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)**

<b>Procedimiento</b>
Recoger las células fúngicas de interés
Fijar en Paraformaldehído 4% + Glutaraldehído 2.5%, diluidos en tampón Cacodilato 0.1M
Lavar la muestra con tampón Cacodilato 0.1M
Pos-fijación con OsO <sub>4</sub> 1% + Ferrocianato de potasio 1.25 % + CaCl <sub>2</sub> 5mM en tampón Cacodilato 0.1M
Lavar con tampón Cacodilato 0.1M
Deshidratación con Etanol 30%
Deshidratación con Etanol 50%
Deshidratación con Etanol 70%
Deshidratación con Etanol 90%
Deshidratación con Etanol 100%
Deshidratación con Etanol 100% Ultraseco
Infiltrar con Spurr 1:3 Etanol
Infiltrar con Spurr 1:2 Etanol
Infiltrar con Spurr 1:1 Etanol
Infiltrar con Spurr 2:1 Etanol
Infiltrar con Spurr 3:1 Etanol
Infiltrar con Spurr puro
Emblocamiento con Spurr puro
Piramidar y hacer cortes ultrafinos
Contrastar con acetato de uranilo
Contrastar con citrato de plomo
Visualizar en microscopio electrónico de transmisión

### Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

<b>Procedimiento</b>
Recoger la muestra fúngica de interés
Fijar en Paraformaldehído 4% + Glutaraldehído 2.5%, diluidos en tampón Cacodilato 0.1M
Lavar la muestra con tampón Cacodilato 0.1M
Adherir la muestra sobre una lámina de vidrio con Poli-L-lisina
Pos-fijación con OsO <sub>4</sub> 1% + Ferrocianato de potasio 0.8% + CaCl <sub>2</sub> 5mM en tampón Cacodilato 0.1M
Lavar con tampón Cacodilato 0.1M
Deshidratación con Etanol 30%
Deshidratación con Etanol 50%
Deshidratación con Etanol 70%
Deshidratación con Etanol 90%
Deshidratación con Etanol 100%
Deshidratación con Etanol 100% Ultraseco
Punto Crítico
Adherir las láminas en soporte metálico
Metalizar con oro
Visualizar en microscopio electrónico de barrido

**ANEXO 3.** Datos empleados para determinar actividad enzimática de proteasas



<i>C. albicans</i> ATCC 22019		
Tiempo de reacción (min)	Hidrólisis de BSA 0.1% en cultivo (sin AgNPs)	Hidrólisis de BSA 0.1% en Cultivo con CMI <sub>50</sub> de AgNPs
	O.D (750 nm)	O.D (750 nm)
0	0.030 ± 0.02	0.030 ± 0.01
1	0.122 ± 0.05	0.083 ± 0.06
2	0.283 ± 0.08	0.137 ± 0.05
3	<b>0.328 ± 0.06 *</b> (0.459 µmoles)	<b>0.248 ± 0.07 *</b> (0.343 µmoles)
4	0.295 ± 0.03	0.206 ± 0.05

<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019		
Tiempo de reacción (min)	Hidrólisis de BSA 0.1% en cultivo (sin AgNPs)	Hidrólisis de BSA 0.1% en Cultivo con CMI <sub>50</sub> de AgNPs
	O.D (750 nm)	O.D (750 nm)
0	0.040 ±0.03	0.030± 0.03
1	0.072 ±0.04	0.064 ±0.06
2	0.183 ±0.03	0.161 ±0.04
<b>3 *</b>	<b>0.230 ±0.05 *</b> (0.312 μmoles)	<b>0.209 ±0.03 *</b> (0.287 μmoles)
4	0.215 ±0.02	0.192 ±0.04

\* La absorbancia fue reemplazada en la ecuación de la curva patrón de tirosina y fue hallada la concentración en μmoles de tirosina liberada. Esta concentración fue empleada para determinar la actividad enzimática presente en la **tabla 15**. La fórmula aplicada se expone a continuación:

$$\text{Unidades/mL enzima} = \frac{\mu\text{moles tirosina liberada} \times \text{Volumen total del ensayo (1,5 mL)}}{\text{Volumen de enzima utilizada (0,1 mL)} \times \text{Tiempo de ensayo (3 min)} \times \text{Volumen Utilizado en medición colorimétrica (0,2 mL)}}$$