

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL
NORDESTE**

FACULTAD DE MEDICINA

**MAESTRÍA EN MICOLOGÍA
MÉDICA**

**“EFECTO ANTIFÚNGICO DE NANOPARTÍCULAS DE
PLATA OBTENIDAS A PARTIR DE *Aspergillus terreus*,
SOBRE LEVADURAS DEL GÉNERO *Candida*”**

MAESTRANDO: Luciana Maria Noblega

DIRECTOR: Cintia Mariana Romero

CO-DIRECTOR: Christian Alvarez

AÑO 2023



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DEL NORDESTE



FACULTAD
DE MEDICINA

Maestría en Micología Médica

“EFECTO ANTIFÚNGICO DE NANOPARTÍCULAS DE PLATA
OBTENIDAS A PARTIR DE *Aspergillus terreus*, SOBRE
LEVADURAS DEL GÉNERO *Candida*”

Maestrando

Luciana Maria Noblega

Director

Cintia Mariana Romero

Co- director

Christian Alvarez

Año

2023

*A mis padres,
Mercedes y Lito*

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a todas aquellas personas que me acompañaron y compartieron conmigo este trabajo científico.

En primer lugar, a mi directora, Cintia Romero y a Andrés Morales, por la dedicación y generosidad que han demostrado hacia mí.

Un agradecimiento especial a mi Co-director, jefe y amigo Christian Álvarez, por haber confiado en mí hace 8 años para formar parte de su grupo de trabajo y de esa manera haberme sumergido en el fantástico mundo de los hongos.

A todo el equipo del laboratorio 13 de PROIMI-CONICET por el gran apoyo brindado durante el tiempo que me llevó el estudio.

A los docentes de la maestría por los conocimientos compartidos y por haber significado tanto en mi formación como micóloga.

Agradezco extraordinariamente a mi familia.

Principalmente a mi esposo Jorge, por su apoyo, tiempo, confianza, amor y sobre todo sus palabras de aliento. A mis hijas Justina y Felicitas por el tiempo que les quité a ellas para que este logro sea posible.

A mis padres Mercedes y Lito por su apoyo incondicional en todas y cada una de las etapas de mi vida, sobre todo a mi madre que físicamente no está, pero siempre será la luz que iluminará mi camino.

A mis tías María Eugenia y María Julia por haber estado presente cuando las necesité y lo siguen estando.

Y sobre todo Gracias a Dios.

Eternamente agradecida, sin Ustedes no habría llegado a esta instancia.

ÍNDICE

ABREVIACIONES	3
RESUMEN	5
CAPÍTULO 1:	9
INTRODUCCIÓN.....	9
CAPÍTULO 2:	18
2.1. JUSTIFICACIÓN.....	19
2.2. HIPÓTESIS.....	22
2.3. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. MICROORGANISMO SELECCIONADO PARA LA BIOSÍNTESIS DE AgNPS	24
3.2. PRODUCCIÓN DE AgNPS	25
3.2.3. OBTENCIÓN DE BIOMASA	25
3.2.4. BIOSÍNTESIS DE AgNPS	26
3.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS AgNPS	27
3.3.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN DE LUZ ULTRAVIOLETA-VISIBLE.....	27
3.3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	29
3.3.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER	29
3.4. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR... 30	
3.4.1. CEPAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO	30
3.4.2. MEDIO DE CULTIVO	31
3.4.3 PREPARACIÓN Y SIEMBRA DEL INÓCULO.....	31
3.4.4 SOLUCIÓN DE AgNPS	32
3.4.5. LECTURA VISUAL DE LA ZONA DE INHIBICIÓN	32
3.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA	33
3.5.1. CEPAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO	33
3.5.2.DETERMINACIÓN DE LA CIM MEDIANTE VITEK® 2 COMPACT.....	33
3.5.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA MEDIANTE MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO	34
3.5.4. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE	36

3.5.5. MEDIO DE CULTIVO	37
3.5.6. PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES	37
3.5.5. ENSAYO DE MICRODILUCIÓN.....	39
3.5.7. PREPARACIÓN DEL INÓCULO	40
3.5.8. LECTURA DE LAS PLACAS	41
3.6. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD	42
CAPÍTULO 4: RESULTADOS	43
4.1. MICROORGANISMO ELEGIDO PARA LA BIOSÍNTESIS DE AgNPS.....	44
4.2. BIOSÍNTESIS DE AgNPS	44
4.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS AgNPS	45
4.3.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN DE LUZ ULTRAVIOLETA-VISIBLE.....	45
4.3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	46
4.3.3.ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER.....	47
4.4. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	48
4.4.1. RESULTADO DE CIM A ANTIFÚNGICOS CONVENCIONALES DE LAS LEVADURAS ENSAYADAS	48
4.4.2. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.....	50
4.4.3. MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO	51
4.5. CITOTOXICIDAD.....	54
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN, CONCLUSIÓN	56
5.1. DISCUSIÓN.....	57
5.2. BIOSÍNTESIS DE AgNPS Y CARACTERIZACIÓN.....	58
5.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA	61
5.4. MECANISMO DE ACCIÓN.....	65
5.5. CITOTOXICIDAD.....	66
5.6. CONCLUSIÓN.....	69
BIBLIOGRAFÍA.....	70
ANEXOS.....	76

ABREVIACIONES

- AgNPS: nanopartículas de plata
- AMB: anfotericina B
- ATF: antifúngicos
- CAS: caspofungina
- Ca: *Candida albicans*
- Cg: *Candida glabrata*
- Ct: *Candida tropicalis*
- Ck: *Candida krusei*
- Cp: *Candida parapsilosis*
- CE: control de esterilidad
- CC: control de crecimiento
- CIM: concentración inhibitoria mínima
- CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
- FCZ: fluconazol
- FTIR: espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
- g: gramos
- hs: horas
- I: intermedio
- ITZ: itraconazol
- L: litro
- MH: Mueller-Hinton
- mm: milímetros
- mM: milimolar
- MIC: micafungina
- NM: nanomateriales
- nn: nanometros
- NPS: nanopartículas
- R: resistente
- S: sensible
- SDD: sensible dosis dependiente
- SEM: Microscopio electrónico de barrido
- SM: solución madre

- SPR: plasmón de superficie localizada
- UV-Vis: luz ultravioleta visible
- VCZ: voriconazol

RESUMEN

La nanotecnología es una ciencia relativamente nueva, que se encuentra en creciente desarrollo debido a su amplia gama de aplicaciones en diferentes áreas. En las últimas décadas, la nanotecnología se ha centrado en el estudio e investigación de las nanopartículas metálicas, principalmente las nanopartículas de plata (AgNPS). La biosíntesis de las mismas, ha recibido gran atención debido a su extensa variedad de aplicaciones médicas, entre la que se destaca su potencial efecto antimicrobiano.

Últimamente se observó un aumento de microorganismos resistentes a los antimicrobianos de uso convencional. Así también, las infecciones fúngicas oportunistas se incrementaron dramáticamente. Aunque, los principales agentes causales siguen siendo *Candida* y *Aspergillus*, el espectro de patógenos fúngicos ha cambiado y se han diversificado. Los azoles y polienos han sido el pilar fundamental en la terapia antimicótica durante años, sin embargo, la resistencia a fluconazol manifestada por diferentes cepas patógenas, y la elevada toxicidad de la anfotericina B, impulsaron investigaciones de nuevas moléculas con potencial antifúngico.

En el presente estudio, se biosintetizaron AgNPS empleando, como agente reductor de los iones Ag^+ , los metabolitos presentes en el sobrenadante de un cultivo de *Aspergillus terreus*. La biorreducción de las AgNPS obtenidas se monitorearon por espectroscopía ultravioleta-visible, mostrando una absorbancia máxima a 440 nm. También se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido, detectando un tamaño promedio de 55 nm y caracteres morfológicos de nanopartículas esféricas.

Finalmente, los estudios de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier permitieron corroborar la presencia de proteínas como agentes estabilizadores que rodean las AgNPS.

El potencial antifúngico de las AgNPS se evaluó por el método de difusión en agar (con modificaciones) y el método de microdilución en caldo (con modificaciones). Las cepas ensayadas correspondieron a aislamientos clínicos y cepas ATCC.

Las cepas evaluadas mediante el método de difusión en agar fueron: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, y *Candida tropicalis*, (una de cada una) y dos cepas ATCC : *Candida parapsilosis* ATCC 22019 y *Candida krusei* ATCC 6258. Los halos de inhibición obtenidos fueron 15 mm en el caso de *C. albicans*; 13 mm en *C. parapsilosis* ; 17 mm en *C. krusei*. En *C. glabrata* y *C. tropicalis* no se registraron halos de inhibición.

En cuanto al método de microdilución en caldo, se ejecutó siguiendo los lineamientos del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) en su documento EDEF 7.3.1 con modificaciones. Las cepas ensayadas fueron: 3 cepas de *C. albicans*, 3 cepas de *C. glabrata*, 3 cepas de *C. parapsilosis*, 3 cepas de *C. tropicalis* y 3 cepas de *C. krusei*. También se ensayaron 1 cepa *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019. Los resultados de concentración inhibitoria mínima (CIM) obtenidos fueron de 64 µg/mL de AgNPS en todas las cepas ensayadas de *C. albicans*. *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* y para la *C. parapsilosis* ATCC 22019, mientras que la CIM obtenida frente a *C. krusei* fue (aislamientos clínicos y ATCC) de 32 µg/mL

En el presente estudio también se realizaron estudios de citotoxicidad en donde las AgNPS mostraron un efecto citotóxico dependiente de la dosis en células hepáticas normales.

ABSTRACT

Nanotechnology is a relatively new science, which is in increasing development due to its wide range of applications in different areas. In recent decades, nanotechnology has focused on the study and research of metallic nanoparticles, mainly silver nanoparticles (AgNPS). Their biosynthesis has received great attention due to its wide variety of medical applications, among which its potential antimicrobial effect stands out.

Lately, an increase in microorganisms resistant to antimicrobials in conventional use has been observed. Likewise, opportunistic fungal infections increased dramatically. Although the main causative agents continue to be *Candida* and *Aspergillus*, the spectrum of fungal pathogens has changed and diversified. Azoles and polyenes have been the mainstay in antifungal therapy for years, however, the resistance to fluconazole manifested by different pathogenic strains, and the high toxicity of amphotericin B, prompted investigations of new molecules with antifungal potential.

In the present study, AgNPS were biosynthesized using, as a reducing agent for Ag⁺ ions, the metabolites present in the supernatant of a culture of *Aspergillus terreus*. The bioreduction of the AgNPS obtained was monitored by ultraviolet-visible spectroscopy showing a maximum absorbance at 440 nm. They were also characterized by scanning electron microscopy, detecting an average size of 55 nm and morphological characters of spherical nanoparticles. Finally, Fourier transform infrared spectroscopy studies allowed us to corroborate the presence of proteins as stabilizing agents that surround the AgNPS.

The antifungal potential of AgNPS was evaluated by the agar diffusion method (with modifications) and the broth microdilution method (with modifications). The tested strains corresponded to clinical isolates and ATCC strains.

The strains tested by the agar diffusion method were: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida tropicalis*, (one of each) and two ATCC strains: *Candida*

parapsilosis ATCC 22019 and *Candida krusei* ATCC 6258. The inhibition halos obtained were 15 mm in the case of *C. albicans*; 13 mm in *C. parapsilosis* ; 17 mm in *C. krusei*. In *C. glabrata* and *C. tropicalis*, no inhibition halos were recorded.

Regarding the broth microdilution method, it was carried out following the guidelines of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) in its document EDEF 7.3.1 with modifications. The tested strains were: 3 strains of *C. albicans*, 3 strains of *C. glabrata*, 3 strains of *C. parapsilosis*, 3 strains of *C. tropicalis* and 3 strains of *C. krusei*. 1 strain *C. krusei* ATCC 6258 and *C. parapsilosis* ATCC 22019 were also tested. The minimum inhibitory concentration (MIC) results obtained were 64 µg/mL of AgNPS in all *C. albicans* strains tested. *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and for *C. parapsilosis* ATCC 22019, while the MIC obtained against *C. krusei* was 32 µg/mL (clinical isolates and ATCC).

Cytotoxicity studies were also performed in the present study where AgNPS showed a dose-dependent cytotoxic effect on normal liver cells.



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La nanotecnología es una ciencia relativamente nueva. Tiene múltiples aplicaciones en otras ciencias y tecnologías, reúne distintas áreas científicas y se ve favorecida por enfoques interdisciplinarios. La nanotecnología consiste en el estudio, análisis, estructuración, formación, diseño y operación de los nanomateriales (NM) (1).

Los NM son partículas con una o más dimensiones en la nanoescala, cuyo tamaño puede variar desde 1 nm a 100 nm. Se pueden clasificar según su origen, como NM naturales (cenizas generadas por un volcán); NM accidentales (humo de soldadura o procesos de combustión) y NM artificiales. Éstos últimos son producidos por el hombre y pueden presentar propiedades mecánicas, ópticas, eléctricas y catalíticas, entre otras (2). Los NM artificiales a su vez, pueden clasificarse según sus dimensiones en la nanoescala en:

- NM cerodimensionales (0D): con sus tres dimensiones en el rango de la nanoescala.
- NM unidimensionales (1D): una de sus dimensiones se encuentra en la nanoescala y dos de sus dimensiones en el orden de las micras.
- NM bidimensionales (2D): dos dimensiones en la escala nanométrica y la otra dimensión en el orden de las micras.
- NM tridimensionales (3D): no hay dimensiones en la nanoescala ya que todas las dimensiones están a microescala.

Como se representa en la figura 1, las nanopartículas (NPS) pertenecen a los NM cerodimensionales (3).

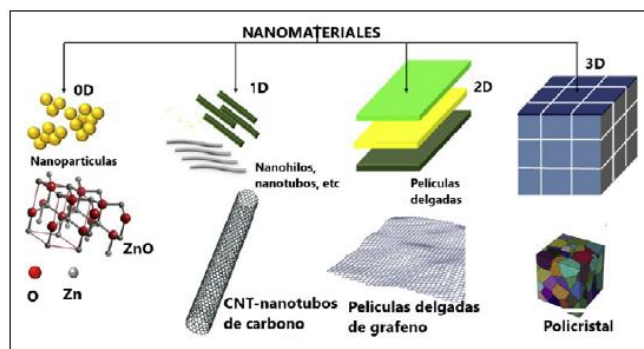


Figura 1. Representación gráfica de los distintos tipos de NM. Fuente: “Efecto de la nanoestructura sobre las propiedades térmicas y magnéticas de nanomateriales tipo 2D y 0D” (2)

En los últimos años la nanotecnología tuvo un acelerado desarrollo. A través del estudio de los NM generó nuevas alternativas de diagnóstico y tratamiento de enfermedades de alto impacto en la población mundial (4). Principalmente se abocó a la investigación de las propiedades antimicrobianas de las NPS, descubriendo moléculas capaces de contrarrestar infecciones en el ser humano (5)(6).

En la actualidad, la resistencia antimicrobiana es un fenómeno mundial emergente y constituye uno de los problemas de salud más graves (7). Por este motivo, surge la necesidad de contrarrestar la proliferación de microorganismos resistentes, los cuáles son producto, en parte, del mal uso y abuso de antibióticos. Esta situación conlleva a la urgencia de implementar nuevas y numerosas estrategias para prevenir, solucionar o al menos tratar de retrasar este proceso.

El incremento en el número de microorganismos que no pueden ser tratados mediante terapias convencionales, ha llevado a diversas organizaciones como la Organización Mundial de la Salud y Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) a la búsqueda de una solución (7)(8). En respuesta a la mencionada problemática, se ha impulsado una intensa labor de investigación para la búsqueda, identificación y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Una buena alternativa, sería el uso de NPS metálicas. Se ha comprobado que las NPS de plata, oro, titanio, hierro, aluminio y cobre poseen un marcado efecto antifúngico (9)(10).

La plata ha sido empleada durante miles de años por el ser humano en aplicaciones diversas como ser joyería, utensillos, moneda, fotografía, o explosivos. Igualmente la plata es conocida desde hace tiempo por sus propiedades antimicrobianas y desinfectantes (11).

Según datos históricos recopilados, en la antigüedad, Hipócrates, padre de la medicina moderna, usaba recipientes de plata para conservar el agua y el vino. Otro dato que reafirmó su potencial uso medicinal, fue el empleo de polvo de plata para la aplicación en la curación de heridas y tratamiento de úlceras (11).

En el año 1884, un obstetra alemán presentó el nitrato de plata al 1% como una solución ocular, para la prevención de la oftalmía neonatal gonocócica, que es quizás, el primer uso medicinal científicamente documentado de la plata. Durante la primera guerra mundial (1914-1918), los compuestos de plata resultaron muy útiles como antisépticos para tratar las heridas (12)(13).

En la década del 40', el descubrimiento de la penicilina y otros antibióticos, motivó una disminución del uso de la plata en la terapia contra infecciones. Sin embargo, en los últimos años, como consecuencia de la creciente resistencia microbiana y, gracias al avance de la ciencia moderna, la plata está recuperando su importancia como potencial agente antimicrobiano bajo la forma de nanopartículas de plata (AgNPS) (10)(13).

En la actualidad, se utilizan pocos nanoproductos con fines médicos, no obstante, las AgNPS demostraron tener una variedad de efectos terapéuticos (14). Existen diversos trabajos en los cuales se comprueba su efecto antifúngico como así también su efecto antibacteriano (15)(16).

En este sentido, las AgNPS fueron ampliamente aceptadas para ser usadas en catéteres médicos e implantes cardiovasculares. Actúan limitando la formación de biofilm sobre superficies y por ende reducen la tasa de infecciones intrahospitalarias en pacientes internados (17). Por otro lado, se comprobó, que ciertos apósitos para heridas

impregnados con AgNPS no sólo promovían la curación de úlceras crónicas, sino que también reducían el recuento bacteriano en el lecho de la herida con un marcado efecto antiinflamatorio (18)(19).

Otras de las aplicaciones medicinales documentadas de las AgNPS se observaron en los instrumentos dentales. Existen evidencias que su incorporación en los rellenos endodónticos, proporcionan un efecto antibacteriano significativamente mejorado frente a bacterias tales como *Streptococcus milleri*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* (18)(20)(21).

Las AgNPS también demostraron ser prometedoras en la lucha contra infecciones virales (22). Revelaron tener actividad antiviral contra el virus de la hepatitis B (23), Virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (HIV) (24), virus respiratorio sincitial, virus de la viruela de monos, entre otros (25). El advenimiento de la pandemia por SARS-CoV-2 a fines del año 2019, impulsó el incremento de investigaciones cuyo fin fue evaluar el potencial antiviral de las AgNPS sobre el SARS-CoV-2, obteniéndose resultados satisfactorios tanto *in vitro*, como *in vivo* (26)(27). En virtud de dicho potencial antiviral, se confeccionaron prendas textiles impregnadas con AgNPS con el fin de destruir el virus de SARS-CoV-2, las cuales fueron testeadas en la población general. Entre ellas se impregnaron barbijos con AgNPS comprobándose que disminuían marcadamente el contagio (28).

Por otro lado, los efectos secundarios de la terapia contra el cáncer y su escasa tolerancia, impulsaron la búsqueda de nuevos fármacos de origen natural. Tal es así, que se realizaron varias investigaciones las cuales, proponen a las AgNPS como agentes prometedores alternativos, para ser empleadas en el tratamiento de dicha enfermedad (29).

Los métodos de síntesis de las NPS metálicas se dividen principalmente en dos enfoques. En el enfoque denominado de arriba hacia abajo (*top-down*) en donde se

desintegra material para generar las nanoestructuras requeridas, mientras que en el enfoque de abajo hacia arriba (*bottom-up*), se ensamblan átomos y moléculas individuales en nanoestructuras más grandes para generar materiales de tamaño nanométrico (figura 2A) (30).

Además de estos enfoques, los métodos de síntesis se clasifican en físicos, químicos y biológicos. Los métodos de síntesis química y física suelen ser mas laboriosos y peligrosos en comparación con los de síntesis biológica.

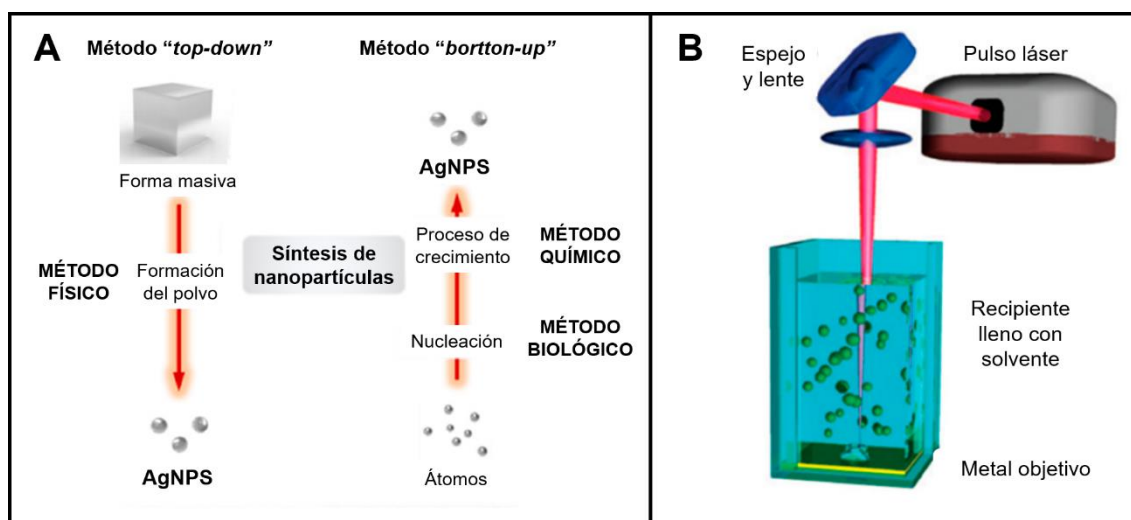


Figura 2. Rutas para la síntesis de NPS: **A-** Enfoque de arriba hacia abajo (“top-down”) y de abajo hacia arriba (“bottom-up”). **B-** Proceso por síntesis física.–Fuente : “Nanopartículas de Plata: Síntesis y Aplicación para Nanomedicina”(30)

Los principales métodos de obtención de las AgNPS por síntesis física son las técnicas de evaporación/condensación y ablación con láser. Ambos procedimientos permiten sintetizar grandes cantidades de AgNPS con alta pureza y sin el uso de productos químicos que liberen sustancias tóxicas. Sin embargo, la aglomeración, el elevado consumo de energía y tiempo, sumado a la complejidad de los equipos requeridos, aumenta su costo (figura 2B) (30). La técnica de evaporación/condensación utiliza un tubo de horno a presión atmosférica para producir las NPS. Mientras que la síntesis láser, emplea la ablación láser de los metales en solución sin reactivos químicos, que conduce a coloides de NPS puros. Ésta técnica presenta como desventaja, el requerimiento de equipos operador dependiente de alto costo.

Los métodos de síntesis química permiten obtener NPS a gran escala y con tamaño homogéneo. En general, éstos se llevan a cabo mediante la utilización de los siguientes componentes: un precursor metálico (AgNO_3), un agente reductor (borohidruros, ascorbato, citrato) y un agente estabilizador. En primer lugar, se produce la reducción del precursor metálico. Como se muestra en la figura 3A, el ión plata (Ag^+) se reduce en una solución acuosa y recibe un electrón de un agente reductor para cambiar a un estado de valencia cero (Ag^0), seguido de la nucleación y crecimiento (30). Estas dos últimas etapas se rigen por varios parámetros de reacción que incluyen la temperatura, pH, concentración, tipo de precursor metálico, agentes reductores y agentes estabilizadores. Esto conduce a una aglomeración gruesa en grupos oligoméricos para producir AgNPS coloidales (30). La estabilización de las NPS durante el proceso de síntesis es fundamental. La estrategia más común es utilizar agentes estabilizadores que puedan ser absorbidos en la superficie de las AgNPS, evitando así su aglomeración (30).

Aunque los métodos de síntesis química son uno de los más utilizados para la obtención de AgNPS, el mayor inconveniente se presenta debido a que los químicos utilizados en el proceso son tóxicos y pueden ser dañinos para la salud humana y el medio ambiente (31).

Con el objetivo de desarrollar procedimientos ecológicos para la síntesis de NPS que no utilicen químicos tóxicos, la síntesis biológica (también conocida como síntesis verde), últimamente ha recibido gran atención.

El uso de sistemas biológicos para la síntesis de NPS inorgánicas ofrece las siguientes ventajas: son fáciles de realizar, son estables durante mayor períodos de tiempo, son económicos y amigables con el medio ambiente ya que evitan el uso de disolventes orgánicos y reactivos tóxicos. Diversos sistemas biológicos, como ser bacterias, hongos y plantas, pueden ser utilizados para la biosíntesis de NPS (figura 3B). Los hongos (levaduras y hongos filamentosos) pueden considerarse “biofábricas” naturales ya que son capaces de acumular metales intracelularmente, como así también

pueden sintetizarlos extracelularmente por mecanismos biológicos y fisico-químicos. Además son fáciles de aislar y cultivar (32).

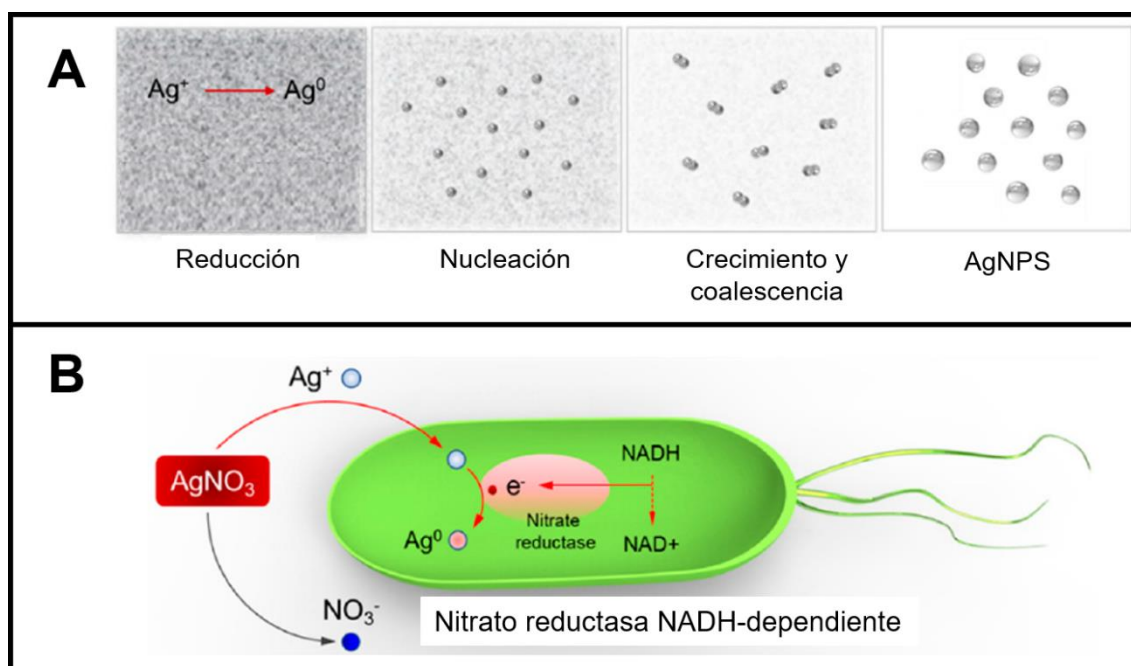


Figura 3. Rutas para la síntesis de NPS: **A-** Fundamento de síntesis química. **B-** Posible mecanismo de síntesis biológica: La biorreducción se inicia mediante la transferencia de electrones a través de la reductasa dependiente de NADH. Los electrones resultantes se dirigen a los iones Ag^+ que se reducen a AgNPs. Fuente : “Nanopartículas de Plata: Síntesis y Aplicación para Nanomedicina” (30)

Dentro del Reino Fungi, los hongos del género *Aspergillus* presentan una distribución cosmopolita. Son capaces de colonizar una gran variedad de sustratos en diferentes nichos ecológicos. En general, son frecuentes en climas tropicales y subtropicales. En menor medida, se los encuentra en climas fríos. Suelen ser contaminantes comunes de varios sustratos, en especial alimentos y granos, y pueden encontrarse en distintos tipos de suelos (salinos, cultivados, desérticos y de pastoreo). Sin embargo, pueden actuar como patógenos oportunistas y producir infecciones fúngicas en el hombre y otros mamíferos (33)(34).

El género *Aspergillus* tienen gran capacidad para producir metabolitos secundarios de bajo peso molecular con sofisticada estructura y diversas funciones biológicas. Por

su importancia industrial, biotecnológica y terapéutica, estos metabolitos son considerados de gran interés para la comunidad científica (35)(36).

A lo largo de los años se han descrito una diversa cantidad de metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Aspergillus*. Entre ellos se identificaron ácidos, aminoácidos, proteínas, enzimas, micotoxinas, entre otros. (35). Particularmente, *Aspergillus terreus* es capaz de producir un metabolito secundario muy importante desde el punto de vista terapéutico, que es la lovastatina, muy usada en el tratamiento de la hipercolesterolemia. Este hongo es muy “explotado” científicamente debido a su importante maquinaria metabólica, lo cual indica que su potencial biosintético va mucho más allá de la lovastatina .(36)

En este sentido, investigaciones recientes han puesto su foco en la obtención de AgNPS a partir de *Aspergillus terreus*, obteniendo resultados muy prometedores (37)(38)(39)(40)(41)(42).



CAPÍTULO 2

*JUSTIFICACIÓN
HIPÓTESIS
OBJETIVOS*

2.1. JUSTIFICACIÓN

De los aproximadamente 1,5 millones de especies de hongos, se ha informado que alrededor de 300 presentan factores de virulencia hacia los humanos (43). Los patógenos fúngicos pueden causar desde infecciones superficiales (ej. Candidiasis oral y vaginal) hasta afecciones crónicas (ej. aspergilosis pulmonar, asma) e invasivas, potencialmente mortales (ej. fungemias y meningitis). A nivel mundial, se estima que por año mueren 1.350.000 personas debido a infecciones causadas por hongos. Algunas de las especies perteneciente a los géneros *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* son las principales responsables de las infecciones invasivas (43)(44).

En la actualidad, las “candidiasis” (infecciones causadas por hongos del género *Candida*) plantean un problema de creciente preocupación médica. La incidencia de estas infecciones está aumentando debido a la inmunosupresión causada por enfermedades debilitantes, terapias inmunosupresoras, quemaduras extensas, traumatismos, desórdenes autoinmunes, entre otros.

Estos factores de riesgo, sumado a desarrollos tecnológicos y procedimientos invasivos, cuya finalidad es curar o aumentar la supervivencia de pacientes con enfermedades mortales, trajo aparejado un cambio en la población hospitalaria, donde el grupo de pacientes gravemente enfermos, inmunodeprimidos y debilitados aumentó dramáticamente (43)(45).

Un gran número de especie del género *Candida* puede estar involucrada en la candidiasis, pero más del 90% de los episodios son ocasionados por levaduras del complejo *C. albicans* (*C. albicans*, *C. dubliniensis* y *C. africana*), complejo *C. parapsilosis* (*C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis* y *C. metapsilosis*), *C. tropicalis* y complejo *C. glabrata* (*C. glabrata sensu stricto*, *C. bracariensis* y *C. nivariensis*). Las levaduras del género *C. albicans* son las responsables del 40-60% de los casos de candidiasis en todo el mundo. En América Latina, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* ocupan el segundo y

tercer lugar, respectivamente, mientras que la incidencia de *C. glabrata* es relativamente baja (4-7%).

Según estudios multicéntricos realizados en nuestro país, *C. albicans* continúa siendo el agente más común de especies causantes de candidemia (38,3%), seguidas *C. parapsilosis* (26%), *C. tropicalis* (15.4%) y por último *C. glabrata* (4,3%). Esta situación coincide con lo reportado en Latinoamérica. En contraste, en países como Estados Unidos, Alemania y Venezuela, *C. glabrata* ocupa el segundo lugar, mientras que en Chile parece estar incrementándose. Probablemente la diferencia en la epidemiología de estos países, se deba al uso prolongado de terapias profilácticas con fluconazol (FCZ) (44)(45)(46)(47).

Actualmente, hay tres clases principales de antifúngicos (ATF) de uso clínico para el tratamiento de las candidemias. Entre ellos se encuentran los polienos (anfotericina B), los agentes azólicos y lipopéptidos (equinocandinas), pero, en algunas ocasiones, su uso se encuentra restringido.

Uno de los escenarios donde se presenta esta situación es cuando las especies implicadas tienen limitada sensibilidad a los ATF, tal es el caso de *C. krusei*, (actualmente reconocida con el nombre taxonómico *Pichia kudriavzevii*) intrínsecamente resistente al FCZ, en tanto, *C. glabrata sensu stricto* es dosis dependiente al FCZ.

La existencia de especies del género *Candida* que no responden a la terapia con anfotericina B (AMB) es rara, sin embargo, su uso se encuentra condicionado debido a la nefrotoxicidad de la misma. (43)

Con respecto a las equinocandinas (caspofungina, micafungina, anidulafungina y rezafungina), tienen actividad fungicida contra la mayoría de las especies de *Candida*, incluyendo especies resistentes a los azoles, éstas son recomendadas para tratamiento de las candidemias. Sin embargo, *C. parapsilosis sensu stricto* puede presentar una sensibilidad intrínseca disminuida a estos ATF (43)(47).

En la actualidad las infecciones fúngicas por especies del género *Candida* con distintos patrones de sensibilidad, presentan una amenaza clínica cada vez mayor. La aparición y diseminación de aislamientos de cepas resistentes son cada vez más notificados. En este contexto, es importante destacar la emergencia de *Candida auris*, resistente a múltiples ATF. En los últimos años ha sido protagonista de brotes en distintas partes del mundo y se ha relacionado a infecciones invasivas con elevada mortalidad difíciles de erradicar (43).

Por lo anteriormente mencionado, surge la necesidad de desarrollar nuevos ATF. En este sentido, las AgNPS podrían considerarse una alternativa prometedora de tratamiento, requiriendo investigaciones que evalúen su actividad antifúngica como así también posibles efectos tóxicos a fin de que sean seguros para la salud humana y para el medio ambiente (40)(46)(48)(49).

2.2. HIPÓTESIS

Las AgNPS sintetizadas a partir de *Aspergillus terreus* poseen actividad antifúngica frente levaduras del género *Candida* spp.

2.3. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad antifúngica *in vitro* de AgNPS biosintetizadas a partir de *Aspergillus terreus* frente a levaduras aisladas de muestras clínicas.

2.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener las nanopartículas a partir de un aislado de *Aspergillus terreus*.
2. Realizar la caracterización físico-química de las nanopartículas de plata mediante espectroscopía de absorción de luz ultravioleta visible, microscopía electrónica de barrido y espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier.
3. Evaluar la actividad antifúngica de las AgNPS mediante el método de difusión en agar y microdulción en caldo, frente a aislados clínicos de levaduras del género *Candida*.
4. Evaluar el efecto citotóxico de las AgNPS en líneas celulares normales.



CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS



El presente trabajo fue realizado en la División Micología del Laboratorio de Salud Pública y Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI-CONICET) de la Provincia de San Miguel de Tucumán, Argentina.

3.1. MICROORGANISMO SELECCIONADO PARA LA BIOSÍNTESIS DE AgNPS

La obtención de las AgNPS se realizó a partir de un cepa de *Aspergillus terreus*, perteneciente a la colección de cultivos del Laboratorio de Micología. La misma se identificó presuntivamente siguiendo las claves de identificación fenotípica, mediante la observación de las características microscópicas y macroscópicas de las colonias desarrolladas en medios Agar Czapek Levadura con 20% de sacarosa (CYA: K_2HPO_4 1 g, Concentrado de Czapek 10 ml, Extracto de Levadura 5 g, sacarosa 200 g, agar 15 g, agua destilada 1 L) y Agar Extracto de Malta (MEA: extracto de malta en polvo 20 g, peptona 1 g, glucosa 20 g, agar 20 g, agua destilada 1 L) (50)(51).

La identificación definitiva se corroboró por espectrometría de masa y biología molecular.

La espectrometría de masas, basada en la metodología MALDI TOF (de sus siglas del inglés: *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight*) identificó al agente como *Aspergillus terreus* 84VML (score 1.8). Los resultados se leyeron empleando la base de del proveedor Bruker Daltonics® (Alemania): *Maldi biotyper DBUpdate BDAL V10.0* y *MALDI Biotyper DBUpdate_Fungi_577 V3.0*.

Mediante biología molecular, a través de la secuenciación parcial de TUB2; CAM se confirmó el aislamiento como *Aspergillus terreus sensu stricto*. Dicha determinación fue realizada por el servicios de miceliales de Instituto ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”.

Previo al proceso de obtención de las AgNPS, la cepa de *Aspergillus terreus* se repicó en agar Sabouraud glucosado de BRITANIA® en placa de Petri y fue incubado a 28°C durante 5 días.

3.2. PRODUCCIÓN DE AgNPS

3.2.3. OBTENCIÓN DE BIOMASA

El primer paso para la biosíntesis de las AgNPS fue la obtención de la biomasa fúngica. A partir de un cultivo puro del hongo, de cinco días de incubación en agar Sabouraud, se preparó un inóculo en agua destilada estéril con Tween-80. La suspensión de conidios se ajustó a una concentración final de 10^6 conidios/mL. Luego se inoculó 10 mL de la suspensión en 100 mL de Sabouraud caldo contenido en un Erlenmeyer de 500 mL. Esta mezcla fue incubada en agitación a 150 rpm durante siete días a 30°C. Posteriormente, la biomasa obtenida fue sometida a tres lavados exhaustivos con agua ultrapura estéril marca GT-LAB®. Los lavados se realizaron por resuspensión en agua y posterior filtración.(figura 4)

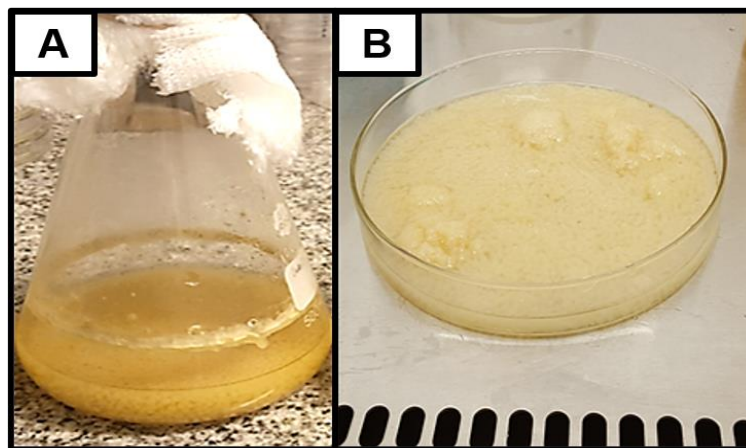


Figura 4. **A-** Biomasa fúngica obtenida tras 7 días de incubación de suspensión conidios del hongo en Sabouraud a 150 rpm. **B-** Proceso de lavado de la biomasa fúngica con agua ultrapura.

3.2.4. BIOSÍNTESIS DE AgNPS

La obtención de AgNPS se realizó según el método de síntesis de *Ammar* y *El-Desouky* (40). Se pesó 10 g de la biomasa fúngica y se incubó en Erlenmeyer con 100 mL de agua ultrapura estéril, bajo condiciones de agitación a 150 rpm por 72 hs. Después de la incubación, la biomasa se filtró al vacío con papel de filtro Whatman N° 1 (figura 5A). Luego se mezclaron 50 mL de filtrado celular (rico en metabolitos fúngicos) con una solución acuosa de 50 mL de AgNO_3 (2 mM) llegando a una concentración final de 1 mM (figura 5B). La mezcla resultante nuevamente se incubó 72. hs en agitación al abrigo de la luz (figura 5C). Trascurrido ese tiempo la producción de AgNPS se evidenció principalmente por cambio de color de la solución de amarillo ámbar a marrón oscuro, obteniéndose de esa manera la solución inicial de AgNPS (figura 5D).

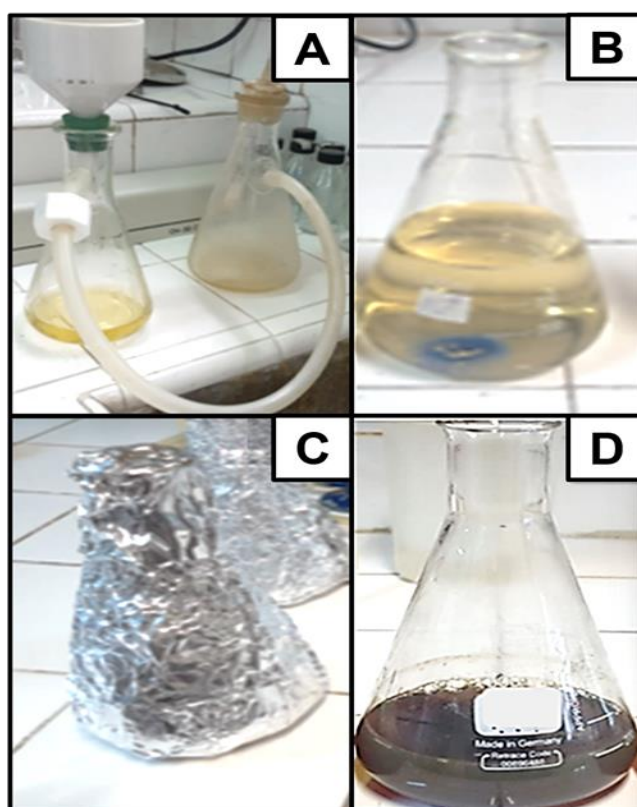


Figura 5. **A-** Proceso de filtrado al vacío de la biomasa fúngica. **B-** Mezcla de la solución de metabolitos fúngicos con la solución de AgNO_3 , concentración final 1 mM. **C-** Solución de metabolitos fúngicos y AgNO_3 listos para ser incubados al abrigo de la luz. **D-** Solución inicial de AgNPS obtenidas

Controles de ensayo: paralelamente a la mezcla del filtrado celular con la solución de AgNO_3 , se incubaron dos Erlenmeyer controles. En uno de ellos (control 1) se incubó AgNO_3 y agua ultra pura estéril; el otro se incubó (control 2) con mezcla de filtrado celular y agua ultrapura estéril. Tras 72 hs. de incubación de dichos controles no se evidenció cambio de color en los mismos

3.3. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LAS AgNPS

La caracterización de las AgNPS es fundamental para controlar la síntesis, y conocer las aplicaciones posteriores que se les pueden atribuir. Para ello, se utilizan una variedad de técnicas instrumentales diferentes. En este trabajo se realizó la caracterización mediante espectroscopía de absorción de luz ultravioleta visible (UV-Vis), microscopía electrónica de barrido y espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (52).

3.3.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN DE LUZ ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Entre las fascinantes propiedades de las NPS metálicas se destaca la presencia de un plasmón de superficie localizada (conocido por sus cifras en inglés SPR: *surface plasmon resonance*) cuya naturaleza cuántica depende del tamaño, forma, naturaleza química y estructura cristalina de las NPS. La espectroscopia de luz UV-Vis es una técnica útil y fiable para la caracterización primaria de las NPS sintetizadas ya que permite evidenciar el SPR.

El SPR es una especie de huella dactilar que indica inequívocamente la presencia de las AgNPS y contribuye a la caracterización de las mismas (53). Particularmente las AgNPS, muestran un intenso SPR en los intervalos de longitud de onda de 410 a 520 nm aproximadamente (figura 6) (54).

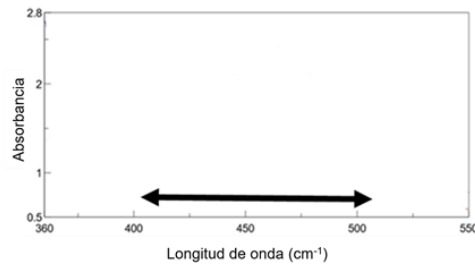


Figura 6. Rango de longitud de onda donde se puede manifestar el pico de SPR de las AgNPS

El fenómeno de SPR ocurre porque los electrones de la superficie de la NPS metálica oscilan al interactuar con una onda electromagnética e induce un momento dipolar sobre la partícula en un intervalo de tiempo (figura 7). Cuando el componente eléctrico (línea azul) de la onda electromagnética (de un haz de luz visible) incide sobre la NPS, oscila a la misma frecuencia de los electrones, ocurriendo el fenómeno de resonancia de SPR (54)(55).

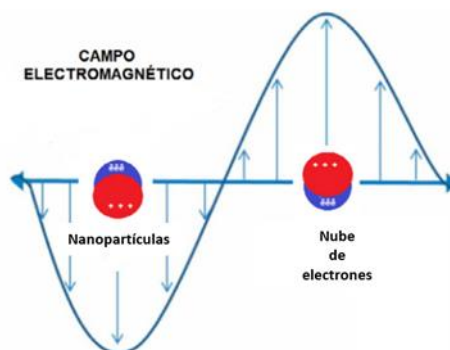


Figura 7. Representación del efecto oscilante de los electrones de superficie en NPS metálicas y su interacción resonante con la luz (línea azul). Fuente: "Estudio teórico del plasmón en nanoesferas de oro" (55)

El equipo que se utilizó para el análisis espectral fue un espectrofotómetro UV-Vis (*Libra S80; Biochrom Ltd, UK*) perteneciente a PROIMI-CONICET. Las mediciones fueron realizadas entre los 350 a 550 nm de el rango de longitud de onda .

3.3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El microscopio electrónico de barrido (SEM, de sus siglas en inglés, *scanning electron microscopy*,) permite obtener imágenes de alta resolución. Como fuente de radiación utiliza un haz de electrones acelerado por un elevado potencial eléctrico. Este haz es direccionado y focalizado por una serie de lentes hacia el lugar donde se encuentra la muestra a analizar.

La imagen se obtiene a partir de señales emitidas por la muestra y se va formando a medida que el haz de electrones se desplaza sobre una porción de su superficie. Este barrido se realiza línea por línea en una zona rectangular.

La señal detectada puede ser analizada y amplificada tanto en su forma analógica como en su forma digital y finalmente es procesada convenientemente. El SEM forma una imagen virtual que se visualiza en una pantalla de computadora. La visualización de la muestra permite determinar aspectos morfológicos y tamaño de las AgNPS (56). El equipo utilizado fue un microscopio JEOL JSM-35 CF perteneciente al Centro Integral de Microscopía Electrónica, ubicado en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Tucumán (CIME-CONICET-UNT).

3.3.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJO CON TRANSFORMADA DE FOURIER

La espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) es una técnica analítica versátil de gran aplicación. La misma permite hacer una identificación rápida de los grupos funcionales de sustancias en estado gaseoso, líquido o sólido. Es una técnica utilizada para determinar qué biomoléculas están implicadas en la síntesis de AgNPS. La FTIR es capaz de proporcionar exactitud y reproducibilidad con una relación señal-ruido favorable. Es posible detectar pequeños cambios en la absorbancia en el orden de 10^{-3} , lo cual ayuda a que la caracterización sea más precisa.

Para la caracterización de las AgNPS sintetizadas en este trabajo se utilizó un espectrómetro infrarrojo (Perkin Elmer 1600 FTIR) perteneciente a PROIMI. El empleo

del mismo, permitió detectar la estructura molecular e identificar las posibles interacción entre la Ag y las moléculas bioactivas que pueden ser responsable de la síntesis y estabilización de AgNPS (52).

3.4. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Para evaluar el potencial antifúngico de las AgNPS, primero se realizó el método de difusión en agar.

El método de difusión en agar, da una idea acerca del efecto inhibitorio de una determinada sustancia antifúngica, manifestándose con la presencia o ausencia de halo de inhibición ; es decir aporta resultados cualitativos expresados en milímetros (mm).

Fundamentado en investigaciones previas, publicadas en la literatura,(57)(58),se realizaron modificaciones al método original (Método de Kirby-Bauer) (59), para adaptar el ensayo a este trabajo.

3.4.1. CEPAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

El potencial antifúngico de AgNPS sintetizadas a partir de *Aspergillus terreus* se evaluó frente a distintas especies del género *Candida* . Se usaron los siguientes aislados clínicos : *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* ; y dos cepas ATCC: *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019

La identificación definitiva a nivel de género y especie de los aislamientos clínicos se realizó mediante espectrometría de masa usando el equipo MALDI-TOF (*Bruker Daltonics*®). Los resultados se leyeron empleando la base de datos, previamente mencionada en el inciso 3.1.

Una vez identificadas fueron almacenadas en el cepario de la División Micología del Laboratorio de Salud Pública.

Las cepas en estudio fueron repicadas en medio Sabouraud glucosado agar 18–24 hs. antes de la realización de la técnica con el fin de lograr que se encuentren en su fase logarítmica de crecimiento.

3.4.2. MEDIO DE CULTIVO

El medio de cultivo que se utilizó fue el Agar Mueller-Hinton (MH), con glucosa al 2% y 0,5 µg/mL de azul de metileno para una mejor visualización de los halos de inhibición.

Una vez preparado se fraccionó en placas de Petri de 9 cm de diametro, logrando una profundidad de 4 mm de agar. Luego, se conservó en heladera en bolsas de plástico herméticamente cerradas hasta su uso. Al momento de ser usadas, las placas fueron dejadas a temperatura ambiente y con la ayuda de un sacabocado se realizó una perforación de 6 mm en el medio.

3.4.3. PREPARACIÓN Y SIEMBRA DEL INÓCULO

Para la preparación del inóculo se partió de un cultivo de 24-48 hs., en Sabouraud glucosado agar a 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). De este cultivo, se tocaron cinco colonias y se suspendieron en 5 mL de solución salina estéril (8,5 g/L NaCl; 0,85%). La suspensión se homogeneizó durante 15 segundos y la turbidez se ajustó a 0,5 de la escala McFarland (equivalente a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL).

Se procedió a la siembra del inóculo mediante la técnica de dispersión con hisopo. La misma consistió en sumergir un hisopo de algodón estéril en el inóculo. El exceso de líquido se eliminó girando el hisopo varias veces contra las paredes interiores del tubo. El inóculo se extendió por la superficie de la placa 3 veces seguidas. En cada repetición, se giró la placa 60°, de forma de asegurar la distribución uniforme del inóculo y luego se incubó la placa por 15 minutos a 35 °C (+2°C).

3.4.4. SOLUCIÓN DE AgNPS

A partir de la solución inicial de AgNPS (obtenidas en el inciso 3.2.4) se tomaron alícuotas de 1,5 mL. Se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se sembró 50 μ L del precipitado en el pocillo central de la placa. (concentración aproximada de 30 mg/L) (figura8)

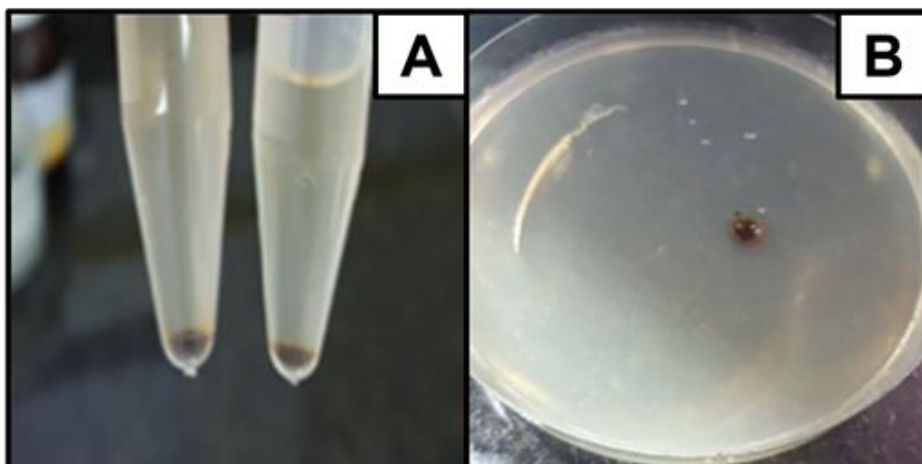


Figura 8: A.-AgNPS concentradas en el fondo del eppendorf tras el proceso de microcentrifugación. B- placa de MH inoculadas con AgNPS

Posteriormente las placas se incubaron a 35°C (\pm 2°C) durante 24 hs. A excepción de *C. parapsilosis* que se incubó 48 hs.

3.4.5. LECTURA VISUAL DE LA ZONA DE INHIBICIÓN

Transcurrido el tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición alrededor del pocillo central con ayuda de una regla. Se consideró como inhibición, la distancia existente entre el centro del pocillo hasta la zona periférica donde confluían las colonias de las levaduras. No se tuvieron en cuenta las colonias intra halos.

3.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA

3.5.1. CEPAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

La actividad antifúngica de las AgNPS mediante el empleo del método de microdilución en caldo se evaluó en las siguientes especies de *Candida* : *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*. De cada especie, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) en 3 aislados clínicos diferentes.

Estas cepas fueron recuperadas a partir de muestras clínicas pertenecientes al cepario del laboratorio de micología. Primero se evaluó la CIM a ATF convencionales y posteriormente la CIM a las AgNPS. En éste ultimo caso los ensayos se realizarón por triplicado.

La identificación definitiva de las cepas ensayadas se realizó por medio de espectrometría de masa, mediante el empleo del equipo MALDI-TOF. Se repicaron 24 hs antes en Sabouraud glucosado agar (48 hs en el caso de *C. parapsilosis*). Como control de calidad se utilizó *C. krusei* ATCC 6258 y *C. parapsilosis* ATCC 22019.

3.5.2. DETERMINACIÓN DE LA CIM MEDIANTE VITEK® 2 COMPACT (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia)

Se determinó la CIM a los ATF convencionales mediante el sistema semi-automatizado Vitek 2®. Este equipo permite determinar por espectrofotometría, el crecimiento de las levaduras, realizar su identificación y establecer la CIM correspondiente (60).

Las tarjetas del sistema Vitek 2 (AST YSO1) empleadas para las pruebas de sensibilidad, contienen diluciones seriadas de los siguientes ATF: AMB, FCZ, voriconazol (VCZ), caspofungina (CAS) y micafungina (MIC).

Para llevar a cabo la determinación, el inóculo de trabajo fue preparado en 3 mL de solución salina (solución fisiológica/agua destilada 1:1) a partir de un cultivo puro de no más de 24 hs de crecimiento. La suspensión se ajustó a una escala de turbidez de McFarland entre 1,8-2,2, empleando el equipo DensiCheck®. Cada suspensión fue diluida apropiadamente transfiriendo 280 µL a otro tubo con 3 mL solución salina (60). Siguiendo las instrucciones del fabricante, el inóculo preparado se dispensó en la tarjeta AST YSO1 a través de un tubo de poliestireno estéril. Los cassettes fueron colocados en el instrumento Vitek 2; las tarjetas se llenaron e incubaron en el equipo y luego se leyeron por espectrofotometría. El tiempo de incubación varió de 11,7 a 26,5 hs. (promedio 15,5 hs.), en función de la tasa de crecimiento en el pocillo libre de droga. Los resultados de CIM se expresaron en µg/mL, de acuerdo a lo procesado por el software del aparato (60).

3.5.3. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA MEDIANTE MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

El método de microdilución en caldo permite conocer cuál es la concentración más baja del antifúngico capaz de inhibir el desarrollo de un microorganismo. Aporta resultados cuantitativos en términos de CIM, expresado en unidades de masa.(61)

Actualmente existen dos protocolos estandarizados para la ejecución del método de microdilución. Uno es el documento M27 - 4ª Edición del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (62), y otro es el EDEF 7.3.1 del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST)(63). Ambos protocolos son fiables y reproducibles, sin embargo, son bastante laboriosos y no aplicable a la mayoría de los laboratorios de rutina. Son similares entre sí, pero presentan algunas diferencias metodológicas que se detallan en la tabla 1 (64).

Tabla 1. Similitudes y diferencias en las técnicas de microdilución en caldo propuestas por CLSI en su documento M-27 y EUCAST en su documento EDEF 7.3.1

Método	Medio de cultivo	Supl.de glucosa(%)	Placas	Inóculo (Ufc/mL)	Tiempo y T° de Incubación	Lectura
EDEF7.3.1	RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato	2	96 pocillos fondo plano	$0,5 \times 10^5$ - $2,5 \times 10^5$	24 hs.	Espectrofotométrica
M-27 4° Ed	RPMI 1640 con glutamina y sin bicarbonato	0,2	96 pocillos fondo redondo	$0,5 \times 10^3$ - $2,5 \times 10^3$	24-48 hs.	Visual

Una de las discrepancias más notorias entre ambos métodos es que el EDEF 7.3.1 adiciona al medio de cultivo glucosa hasta alcanzar una concentración final de 20 g/L. Las levaduras que tienen la capacidad de asimilar glucosa como fuente de carbono, (las del género *Candida*,) se ven favorecidas a mayores concentraciones de azúcar, permitiendo su desarrollo en menor tiempo de incubación. Esto facilita la lectura de las placas a las 24 hs. de incubación (61)(64).

Además, EUCAST utiliza un inóculo de $0,5$ - $2,5 \times 10^5$ UFC/mL cuya preparación es más fácil y exacta, ya que la dilución que hay que realizar para llegar al mismo es menor (1/10) que la dilución requerida según CLSI para alcanzar las 10^3 UFC/mL. La elección de este tamaño de inóculo tiene como ventaja aumentar la posibilidad de detectar clones resistentes dentro de una población heterogénea, ya que la probabilidad de la aparición de mutantes resistentes en una población de microorganismos aumenta con el tamaño de la misma. Por lo tanto, es de esperar que se inhiba mejor una población grande de microorganismos que una pequeña (64).

A diferencia de EUCAST, quien recomienda la lectura de las placas con espectrofotómetro, CLSI recomienda la utilización de placas con pocillos de fondo redondo y una lectura visual bajo iluminación normal usando un espejo. Los pocillos de

las diluciones deben compararse con los pocillos controles de crecimiento libre de drogas.

La lectura de la CIM de modo visual es operador dependiente y se complejiza cuando se tratan de ATF fungiestáticos (azoles). Estos ATF detienen el crecimiento de los hongos pero no los mata, lo que conlleva, a que en todos los pocillos se observen distinto grado de turbidez. De este modo, la lectura de la CIM es subjetiva, constituyendo una limitación al momento de elegir el punto de corte. Esto no ocurre en el caso de los ATF fungicidas, como ser la AMB, la cual inhibe completamente el crecimiento de los microorganismos (61)(64).

Por ende en este trabajo se tomó como referencia el documento EDEF.7.3.1 para la realización de la técnica de microdilución, con los respectivos ajuste para que los ensayos sean posible de realizar.

3.5.4. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE

Se partió de la solución inicial de AgNPS, obtenida según inciso 3.2.4. Se volcó 150 mL de la misma en una placa de Petri 15 cm de diámetro. Luego se la recubrió con papel metalizado y se dejó secar en estufa a 50° C 24 hs. De esta manera se obtuvieron las AgNPS en estado sólido. Se pesaron 0,0128 g. en balanza analítica y se resuspendieron en 10 mL de agua ultrapura estéril logrando la concentración final de 1280 µg/mL .

3.5.5. MEDIO DE CULTIVO

A diferencia de lo que establece EUCAST en su protocolo EDEF 7.3.1, y tomando como referencia publicaciones previas (65)(66)(67), donde se realizaron ciertas modificaciones, en el presente trabajo se usó como medio de cultivo caldo Sabouraud al 2% de glucosa ajustado a pH 7.

3.5.6. PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

A partir de la SM, se prepararon diluciones seriadas siguiendo los pasos que se representan en el esquema de la figura 9. Como diluyente se utilizó caldo Sabouradoud El rango de concentraciones ensayadas se correspondió con el rango de concentraciones empleadas para evaluar la CIM frente a FCZ (0,125 a 64 $\mu\text{g/mL}$).

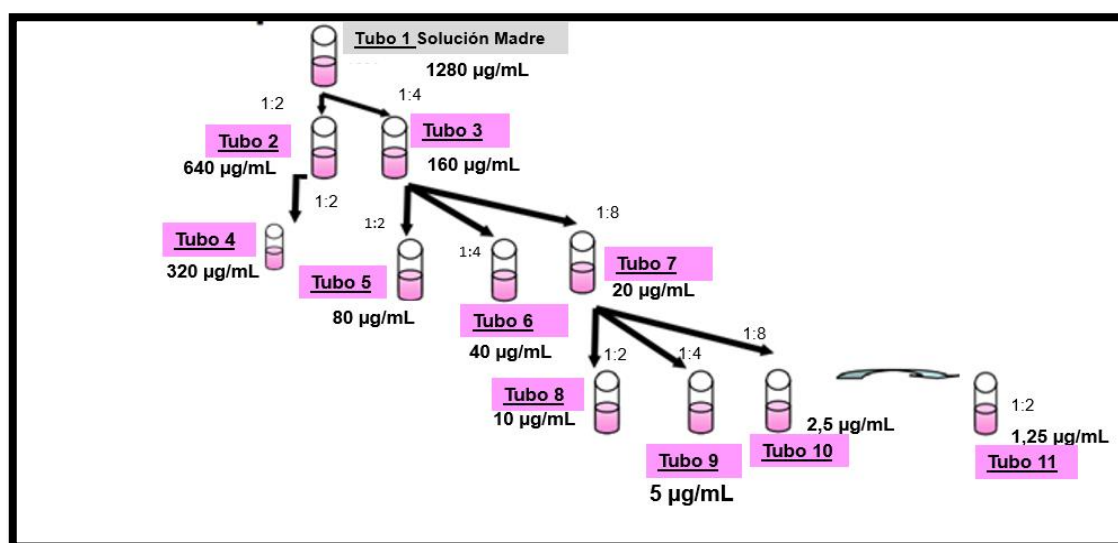


Figura 9. Esquema de diluciones seriadas a partir de la SM para obtener las distintas concentraciones del antifúngico a ensayar (AgNPS)

Al terminar las diluciones todos los tubos contenían 1 mL, excepto el tubo n° 11 (2 mL). De este último se desechó 1 mL con el fin de igualar los volúmenes, lográndose de esa manera (tubos 2 al 11), una concentración 10 veces superior al rango deseado. Seguidamente, se realizó una dilución 1/5 añadiendo a todos los tubos 4 mL de caldo

Sabouraud, de esta manera la concentración del antifúngico en los tubos superó 2 veces la concentración final deseada: 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tubo 2) a 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tubo 11) (tabla 2).

Tabla 2. Rango de concentraciones de antifúngico obtenidas (AgNPS) luego de realizar las diluciones seriadas a partir de la SM.

	CONCENTRACIÓN FINAL ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
TUBO 1 (SM)	1280
TUBO 2	128
TUBO 3	64
TUBO 4	32
TUBO 5	16
TUBO 6	8
TUBO 7	4
TUBO 8	2
TUBO 9	1
TUBO 10	0,50
TUBO11	0,25

3.5.5. ENSAYO DE MICRODILUCIÓN

Se utilizaron placas estériles de 96 pocillos fondo plano. Se agregaron 100 μL de las diferentes concentraciones de AgNPS, siguiendo los siguientes pasos:

- El contenido del tubo N°2 se depositó en una cubeta o en una placa de Petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales) se tomaron 100 μL y se llenaron los pocillos de la columna 2 (2A - 2H).
- Con el contenido del tubo N°3 se llenaron los pocillos de la columna 3 (3A- 3H).
- Con el contenido del tubo N°4 se llenaron los pocillos de la columna 4 (4A - 4H).
y así sucesivamente hasta la columna 11 (figura 10).

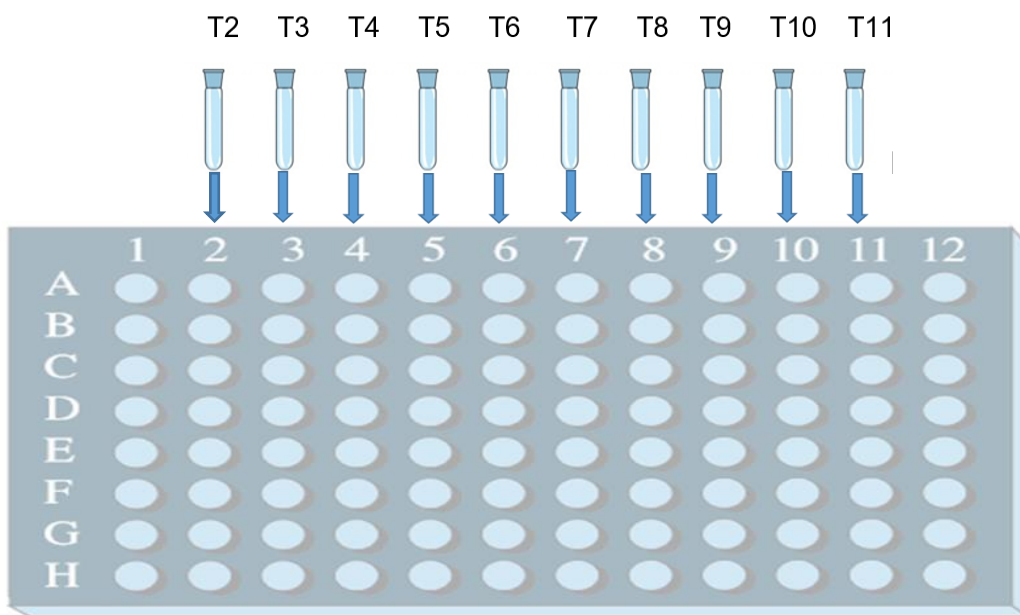


Figura 10. Esquema de llenado de placa con las distintas concentraciones de AgNPS para evaluar la actividad antifúngica por la técnica de microdilución en caldo.

- Los pocillos de la columna 1A - 1H se llenaron solamente con 200 μL de medio de cultivo (caldo Sabouraud). Estos pocillos se usaron como control de esterilidad (CE).

- Los pocillos de la columna 12A - 12H se llenaron con 100 μ L de Sabouraud caldo sin antifúngico. Estos pocillos se usaron como control de crecimiento de las levaduras (CC).
- Una vez llenas las placas se envolvieron con papel fiilm para evitar la evaporación y se congelaron -40°C hasta el momento de su uso.

3.5.7. PREPARACIÓN DEL INÓCULO

La suspensión de cada levadura se preparó minutos antes de ser inoculadas en las placas de microdilución. A partir de un cultivo de 18 hs. se tocaron cinco colonias y se suspendieron en solución salina estéril (NaCl 0,85%). La suspensión resultante se agitó en vórtex (a 600 rpm). La densidad de la misma se ajustó a la transmitancia 0,5 de la escala de McFarland, lo cual equivale a una suspensión que contiene entre $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Luego se realizó una dilución 1/10 para obtener un inóculo de $0,5$ a $2,5 \times 10^5$ UFC/mL.

El día del ensayo se sacaron las placas con las diluciones de AgNPS del congelador y se dejaron a temperatura ambiente por una hora . Se tuvo la precaución de inocular las mismas dentro de los 30 minutos posteriores a la preparación del inóculo, con el fin de mantener la viabilidad celular.

En los pocillos de las columnas 2 a las 11 se inocularon 100 μ L del Inóculo, lo cual produjo una dilución $\frac{1}{2}$.

En los pocillos de la columna 12 (CC), también se añadieron 100 μ L del inóculo, mientras que en los pocillos de la columna 1 (CE) no se añadió inóculo.

En la figura 11 se muestra el rango de concentración final de solución de AgNPS obtenida tras inocular la suspensión de levadura, expresado en $\mu\text{g/mL}$.

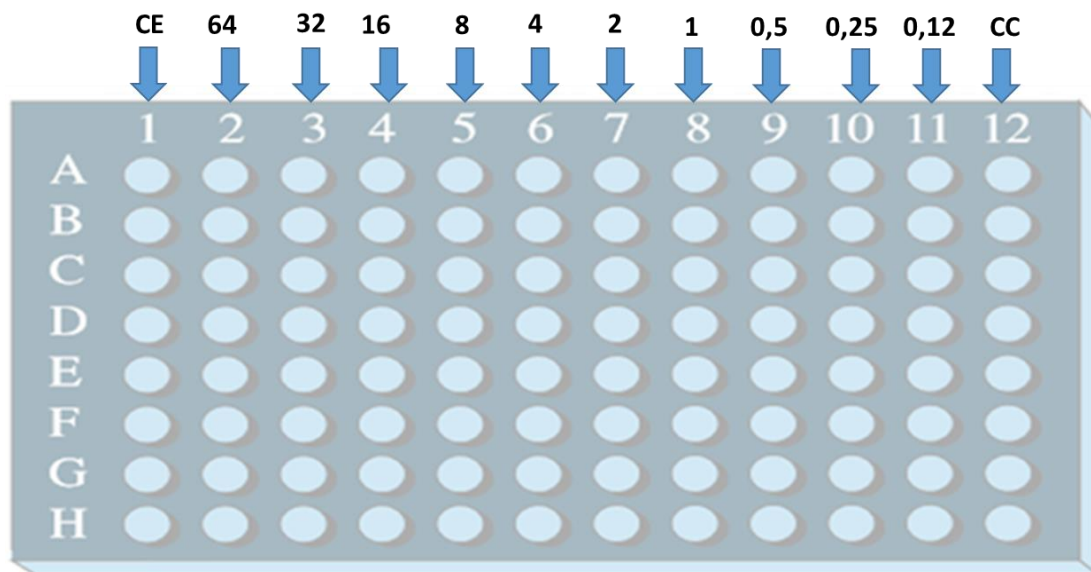


Figura 11. Esquema representativo del rango de concentración final de AgNPS resultante luego de colocar el inóculo en los respectivos pocillos, expresado en $\mu\text{g/mL}$. CE = Control de esterilidad, CC = Control de crecimiento.

Las placas se taparon con papel film para evitar evaporación y se incubaron en estufa a 35°C durante 24 hs., salvo en el caso de *C. parapsilosis* que fueron incubadas durante 48 hs.. Transcurrido el tiempo de incubación se retiraron de la estufa cuidadosamente, se retiró el papel film y se procedió a la lectura de los resultados y determinación de la CIM para cada especie de levadura ensayada.

3.5.8. LECTURA DE LAS PLACAS

EUCAST, en su documento EDEF 7.3.1, recomienda la lectura espectrofotométrica mediante el empleo de un lector de ELISA. La longitud de onda adecuada para medir la absorbancia de la placa es de 530 nm, aunque también se pueden leer a 405 o 450 nm (63). Para realizar el cálculo y determinar la CIM, la absorbancia del blanco (control de esterilidad) debe restarse al resto de los pocillos y tomar como referencia la absorbancia del control de crecimiento para calcular el 50% o 90% de inhibición. (63)

En coeficiente de inhibición apropiado para la interpretación de los resultados, no se pudo definir antes de la lectura de los mismo. Al tratarse de una sustancia inexplorada

(AgNPS), se desconocía como iba a ser su comportamiento in vitro frente a las levaduras. No sucede lo mismo en el caso de ATF convencionales ya estudiados como ser el caso del FCZ, en donde se sabe que el coeficiente de inhibición es al 50 %, debido al efecto de su crecimiento residual.

3.6. ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD

Para futuras aplicaciones de las AgNPS como ATF, es importante comprender su factor de biocompatibilidad para asegurar que el material antimicrobiano se dirija hacia las células patógenas, sin causar ningún efecto tóxico sobre células normales.

La citotoxicidad de las AgNPS sintetizadas se evaluó en células hepáticas normales (IHH) mediante un ensayo colorimétrico que permitió determinar el porcentaje de viabilidad celular en función de la dosis y del tiempo. (68) El fundamento de la técnica se basa en la biorreducción de una sal de tetrazolio (MTT) a formazán. Esta metodología es ampliamente usada en investigación científica referida a estudios de citotoxicidad (69) (70)(71).

El reactivo utilizado fue el Promega Cell Titer 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. El mismo proporciona un método rápido y conveniente para determinar número de células viables en proliferación, citotoxicidad, unión celular, ensayos de quimiotaxis y apoptosis. La técnica fue llevada a cabo siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante

Dicho estudio fue tercerizado y llevado a cabo por Laboratorio de Hepatología molecular *Hans Popper* en la Universidad de Medicina de Viena, Italia.



CAPÍTULO 4

RESULTADOS



4.1. MICROORGANISMO ELEGIDO PARA LA BIOSÍNTESIS DE AgNPS

La identificación del hongo elegido para la producción de las AgNPS se realizó en base a métodos fenotípicos, espectrometría de masa y Biología molecular.

Luego de 5 días de incubación en los medios apropiados, se observó el desarrollo de colonias de aspecto algodonoso denso de color canela-café. Tras el análisis microscópico, se observaron cabezuelas conidiales columnares y biseriadas con métulas angostas compactas que cubrían las $\frac{3}{4}$ partes de la vesícula. Sobre las métulas se visualizaron conidios globosos a elipsoidales, lisos de entre 2-2,5 μm de diámetro. En base al análisis de las características fenotípicas se lo identificó como *Aspergillus* sección *Terrei* (figura 12).

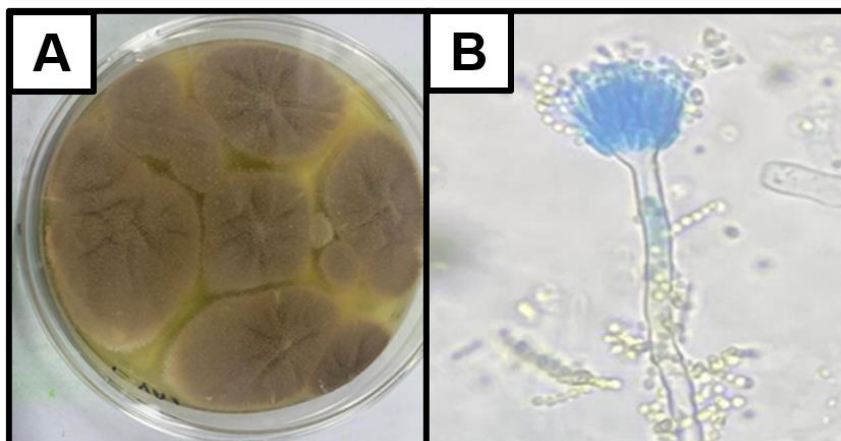


Figura 12. A- Colonia de *Aspergillus* sección *Terrei* elegido para la biosíntesis de AgNPS en medio CYA. B- Microfotografía (40x) de *A.* sección *Terrei*.

Por medio de espectrometría de masa y biología molecular se realizó la identificación definitiva como *Aspergillus terreus sensu stricto*.

4.2. BIOSÍNTESIS DE AgNPS

Luego de incubar agua rica en metabolitos provenientes de *Aspergillus terreus* junto con la solución de AgNO_3 , se obtuvieron las AgNPS. Un método poco sofisticado, pero bastante útil para evidenciar la biosíntesis de las mismas, fue el examen visual o la prueba de cambio de color, lo cual indicó que la obtención de las NPS metálicas fue exitosa

(figura 13 A-B) (72). Este cambio de color está relacionado con la reducción de los iones de plata que se generaron durante la producción de AgNPS. Paralelamente se incubaron, bajo las mismas condiciones de trabajo, dos matraces Erlenmeyer como controles. El Control 1 contenía una mezcla de agua rica en metabolitos fúngicos y agua ultrapura; y el control 2, mezcla de solución de AgNO_3 y agua ultrapura. El objetivo de evaluar los controles tuvo como fin verificar que los metabolitos fúngicos fueron los responsables de la reducción de la Ag^+ en el proceso de biosíntesis de las AgNPS. Tal es así, que en ninguno de los controles se observó oscurecimiento del medio (figura 13 C).

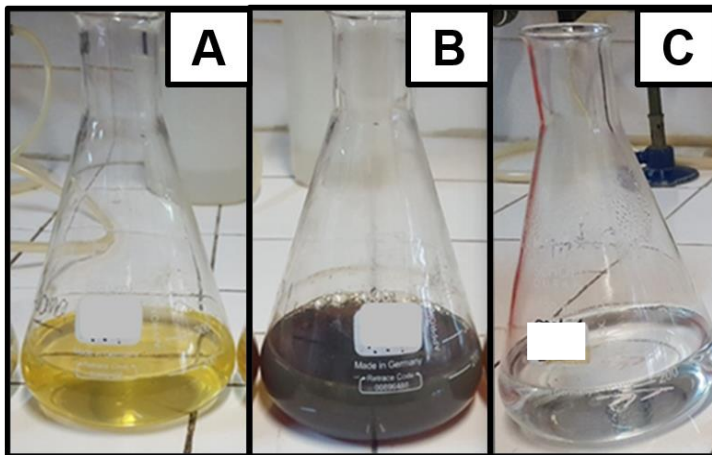


Figura 13. **A-** Mezcla de solución rica en metabolitos fúngicos y AgNO_3 antes de la incubación. **B-** Solución de AgNPS obtenidas tras la reacción de bio-reducción. **C-** Uno de los matraces Erlenmeyer controles sin cambio de color tras la incubación.

4.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LAS AgNPS

4.3.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN DE LUZ ULTRAVIOLETA-VISIBLE

Luego de la obtención de las AgNPS se procedió a la caracterización mediante la espectroscopía de absorción de luz UV-Vis. Como se muestra en la figura 14, la resonancia del SPR se registró con un pico amplio y fuerte a los 440 nm.

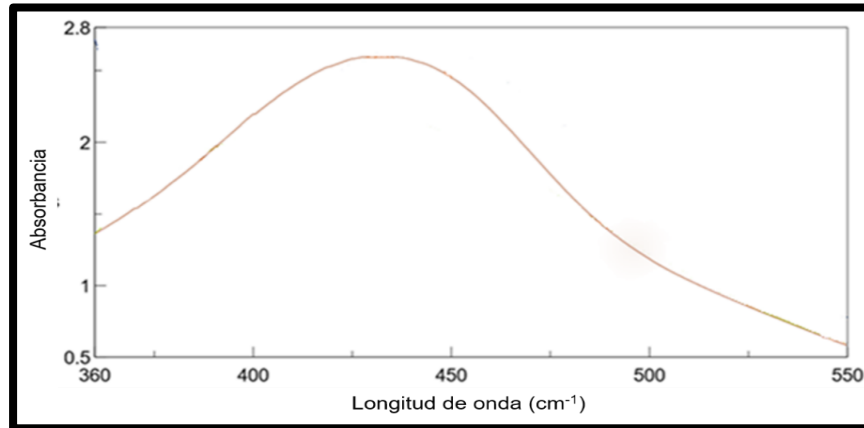


Figura 14. Espectro UV-Visible de AgNPS obtenidas a partir de los metabolitos de *Aspergillus terreus*. Absorbancia en función de la longitud de onda (cm⁻¹)

4.3.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Mediante SEM, se corroboró la producción de AgNPS, se observó su morfología y se confirmó su tamaño. Las micrografías obtenidas por SEM revelaron la presencia de AgNPS esféricas cuyo tamaño variaba entre 35 a 70 nm con un promedio de 55 nm aproximadamente (figura 15).

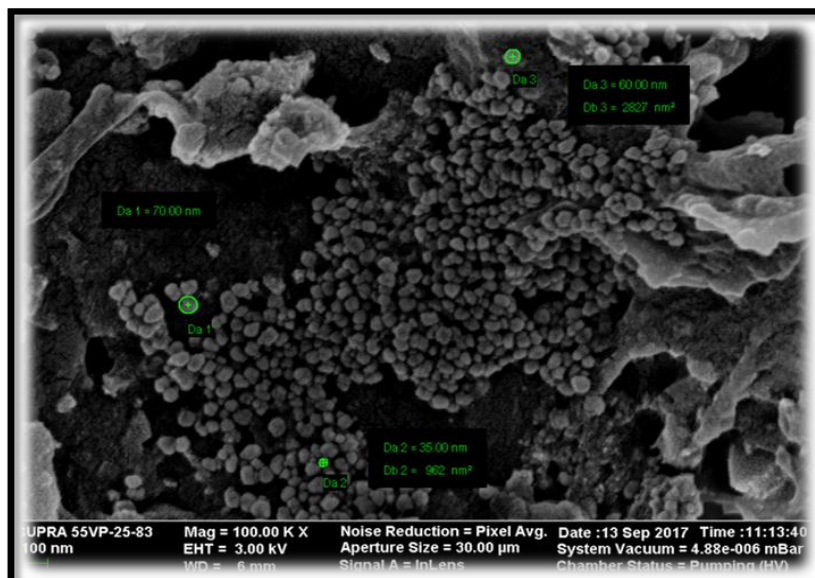


Figura 15. Microfotografía por SEM de las AgNPS sintetizadas a partir de *Aspergillus terreus*. Se observa además material amorfo que rodea las AgNPS.

En base a los resultados obtenidos a partir de las imágenes brindadas tras el análisis microscópico, se pudo observar que las AgNPS biosintetizadas fueron heterogéneas en cuanto al tamaño. Este amplio rango de tamaño se correlaciona con el ancho de la curva obtenida en la lectura del SPR por espectroscopía UV-vis.

4.3.3. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER

Con el fin de poder identificar posibles interacciones entre la plata y moléculas bioactivas que estarían implicadas en la síntesis de nanopartículas y su estabilización, se evaluó el espectro FTIR (figura 16). Su análisis mostró la presencia de diferentes grupos funcionales. El pico registrado a los 1100 cm^{-1} indica la presencia de alcoholes secundarios. Por otro lado, los picos observados entre los 1200 y 1300 cm^{-1} se asocian a los estiramientos C-O normalmente presentes en alcoholes primarios.

El pico obtenido a 1400 cm^{-1} podría estar relacionado con el grupo COO y representa el estiramiento simétrico del grupo carboxilo presente en los residuos de aminoácidos. Las vibraciones registradas a 1030 y 1600 cm^{-1} pueden corresponderse, respectivamente a los estiramientos N-H presentes en grupos aminas y grupos carboxilos de las proteínas.

Por otra parte, alrededor de 1500 cm^{-1} se observó un pico que se corresponde con estiramiento C-C perteneciente a grupos aromáticos, mientras que a 2900 cm^{-1} se detectó una señal característica del enlace C-H presente en los grupos metilenos de las proteínas.

El pico registrado alrededor de los 3500 cm^{-1} podría asociarse también a vibraciones del grupo amina de proteínas.

Finalmente, el espectro FTIR mostró diversos picos en la región de 500 a 1000 cm^{-1} que podrían estar asociados a diferentes grupos funcionales unidos a AgNPS relacionados con otros metabolitos producidos por *Aspergillus terreus*.

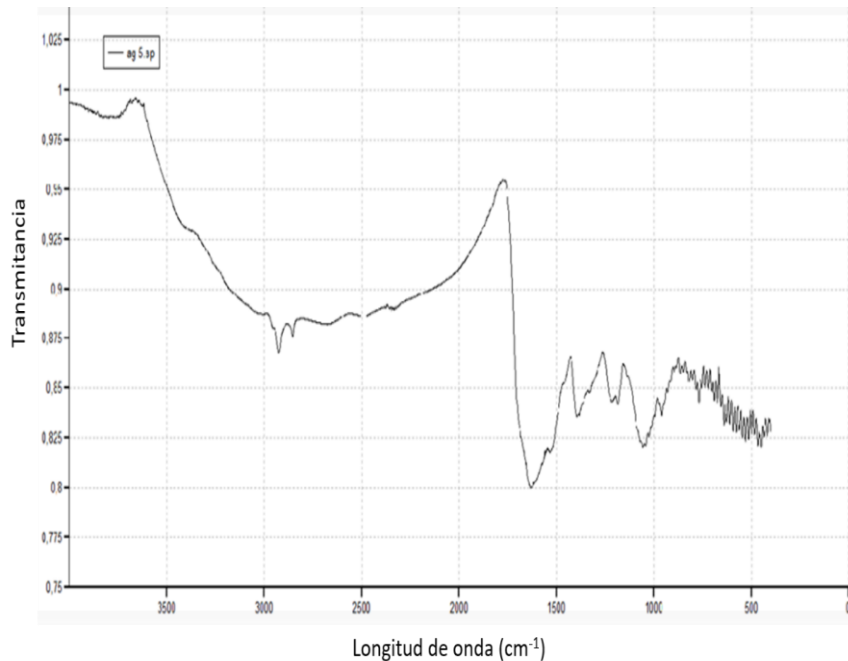


Figura 16. Análisis FTIR de AgNPS. Picos obtenidos a partir de la solución de nanopartículas producidas a partir de *Aspergillus terreus*.

4.4. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

4.4.1. RESULTADO DE CIM A ANTIFÚNGICOS CONVENCIONALES DE LAS LEVADURAS ENSAYADAS

Los resultados de CIM a los ATF convencionales de las levaduras ensayadas se leyeron a través del software del equipo Vitek 2® luego de 18- 24 hs. de proceso. Los mismos se detallan en la tabla 3.

El sistema Vitek 2® realiza la técnica de microdilución según la metodología del CLSI, (61) por lo tanto, la interpretación categórica de la CIM se realizó según los puntos de corte especie específicos definidos en el documento M-60 2° edición del CLSI (73).

Tabla 3: Resultados de CIM a distintos ATF expresados en µg/mL

	AMB	FCZ	VCZ	CAS	MIC
<i>C. albicans 1</i>	1	≤1 (S)	≤0,12 (S)	≤0,25 (S)	≤0,06 (S)
<i>C. .albicans 2</i>	0,5	8 (R)	≤0,25 (I)	≤0,25 (S)	≤0,06 (S)
<i>C. albicans 3</i>	1	≤1 (S)	≤0,12 (S)	≤0,25 (S)	≤0,06 (S)
<i>C. glabrata 1</i>	0,5	4 (SDD)	≤0,12	≤0,25 (I)	≤0,06 (S)
<i>C. glabrata 2</i>	0,5	>=64 (R)	1	≤0,25 (I)	≤0,06 (S)
<i>C. glabrata 3</i>	0,5	≤1 (SDD)	0,25	≤0,25(I)	≤0,06 (S)
<i>C. parapsilosis 1</i>	0,5	≤1 (S)	≤0,12 (S)	1 (S)	0,5 (S)
<i>C. parapsilosis 2</i>	≤0,25	≤1 (S)	≤0,12 (S)	0,5 (S)	≤1 (S)
<i>C. parapsilosis 3</i>	< =0,25	≤1 (S)	≤0,12 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)
<i>C. tropicalis 1</i>	1	8 (R)	1 R	≤0,25 (S)	≤0,06 (S)
<i>C. tropicalis 2</i>	0,5	≤1 (S)	≤0,12 (S)	≤0,25 (S)	≤0,06 (S)
<i>C. tropicalis 3</i>	0,5	≤1 (S)	≤0,12 (S)	≤0,25 (S)	≤0,06 (S)
<i>C. krusei 1</i>	2	-----	≤0,12 (S)	≤0,25 (S)	0,12 (S)
<i>C. krusei 2</i>	0,5	-----	≤0,12 (S)	≤0,25 (S)	0,12 (S)
<i>C. Krusei 3</i>	0,5	-----	≤0,12 (S)	≤0,25 (S)	0,12 (S)

“S”: sensible; “SDD”: sensible dosis dependiente; “I”: intermedio; “R”: resistente

4.4.2. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Una vez caracterizadas y confirmada la biosíntesis de las AgNPS se procedió a corroborar su efecto antifúngico. Los resultados obtenidos por el método de difusión en agar se presentan en la siguiente tabla (tabla 4) y en la figura 17.

Tabla 4. Medidas para los halos de inhibición (mm) obtenidos por medio de la técnica de difusión en agar para las diferentes cepas ensayadas.

CEPAS	Halo (mm)
<i>C. albicans</i>	15
<i>C. glabrata</i>	0
<i>C. tropicalis</i>	0
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	13
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	17

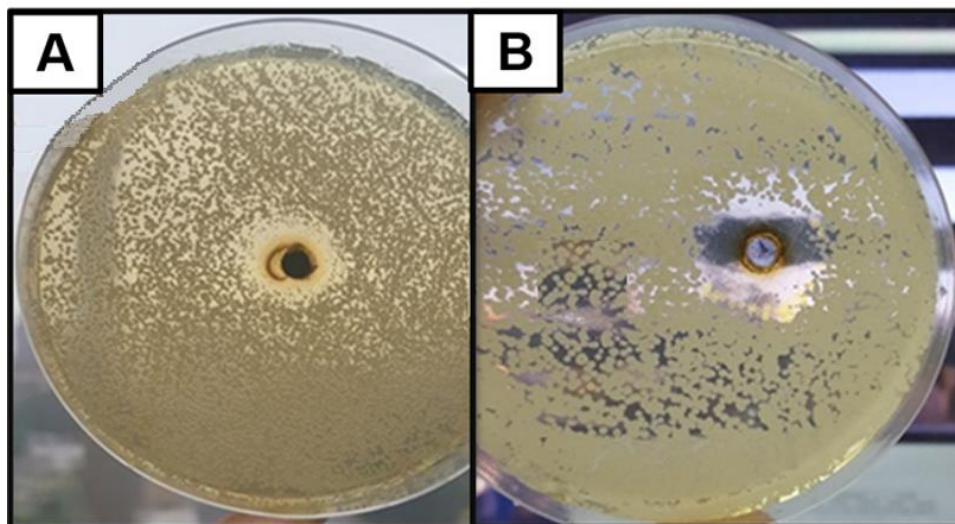


Figura 17. A. Halo de inhibición observado en *C. parapsilosis* ATCC 22019. B. Halo de inhibición observado para *C. krusei* ATCC 6258

4.4.3. MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

Bajo las condiciones de ensayo establecidas en materiales y métodos, se llevó a cabo el método de microdilución en placa, el cual reveló que las cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y *C. tropicalis* presentaron una CIM igual a 64 µg/mL, mientras que la CIM frente a *C. krusei* fue de 32 µg/mL.

Para determinar la CIM se tuvo en cuenta la concentración más baja del antifúngico que produjo reducción visible en el crecimiento del microorganismo, comparado con el pocillo control.

Los resultados obtenidos en todas las repeticiones realizadas se representan en la tabla 5 y figuras 18, 19 y 20.

Vale la pena destacar que el cálculo de la CIM mediante la absorbancia de los pocillos no fue posible ya que se registró un “ruido” que dificultó la interpretación y lectura de los resultados. Las AgNPS tienen la propiedad de generar un plasmón de superficie localizada. Esta resonancia plasmónica genera un campo electromagnético muy intenso localizado en la superficie de la partícula metálica (55). Entre las limitaciones citadas en el manual del equipo (MINDRAY-94 A) se enfatiza que es importante prevenir el ruido electromagnético, ya que puede causar interferencia con las propiedades del sistema y alterar la lectura en los pocillos dando resultados erróneos. En base a lo expuesto se puede inferir que estas propiedades eléctricas y magnéticas propias de las AgNPS impidieron la lectura espectrofotométrica. Motivo por el cual, se procedió a la lectura visual. Al observar el comportamiento de las AgNPS frente a las levaduras se consideró, que lo más apropiado para realizar la lectura, era considerar el 90% de inhibición, en comparación con el pocillo control libre de AgNPS (CC). Dicho esto, la CIM se definió como la concentración más baja de AgNPS que inhibió el crecimiento fúngico visible en un 90 %.

Tabla 5. Resultados de CIM obtenidos a partir de la técnica de microdilución para las distintas cepas ensayadas expresados en $\mu\text{g/mL}$

Levadura	CIM ₉₀ 1	CIM ₉₀ 2	CIM ₉₀ 3
<i>C. albicans</i> 1	64	64	64
<i>C. albicans</i> 2	64	64	64
<i>C. albicans</i> 3	64	64	64
<i>C. glabrata</i> 4	64	64	64
<i>C. glabrata</i> 5	64	64	64
<i>C. glabrata</i> 6	64	64	64
<i>C. tropicalis</i> 7	64	64	64
<i>C. tropicalis</i> 8	64	64	64
<i>C. tropicalis</i> 9	64	64	64
<i>C. parapsilosis</i> 10	64	64	64
<i>C. parapsilosis</i> 11	64	64	64
<i>C. parapsilosis</i> 12	64	64	64
<i>C. krusei</i> 13	32	32	32
<i>C. krusei</i> 14	32	32	32
<i>C. krusei</i> 15	32	32	32
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	32	32	32
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	64	64	64

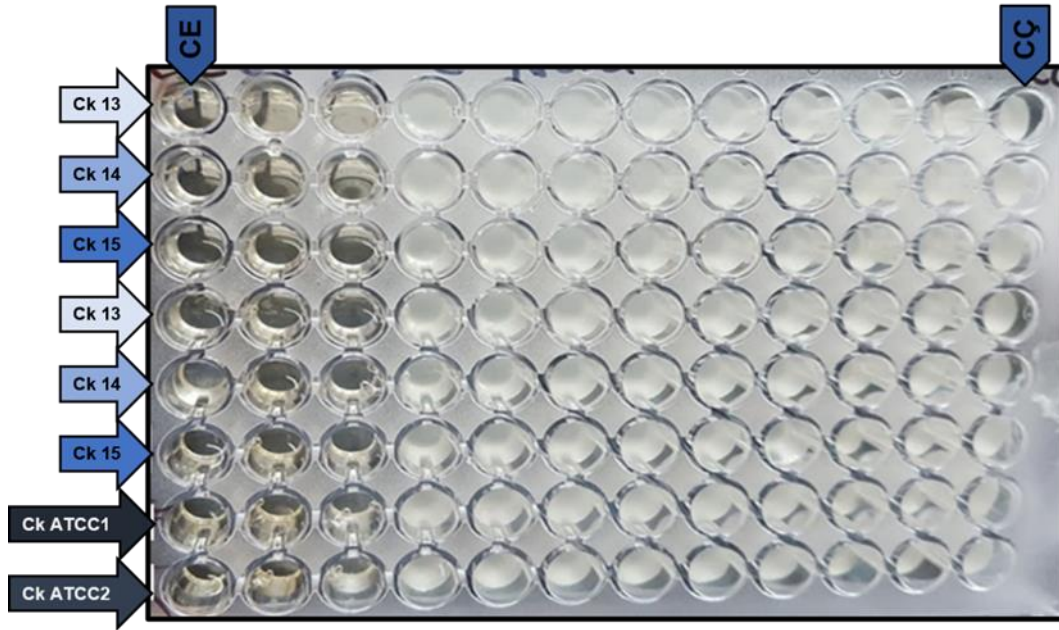


Figura 18: CIM 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a *C. krusei* (Ck.). Cepas ensayadas Ck 13; Ck.14; y Ck.15 ubicadas en las filas de la 1 a las 6 respectivamente. *C.krusei* ATCC 6258 en fila 7 y 8

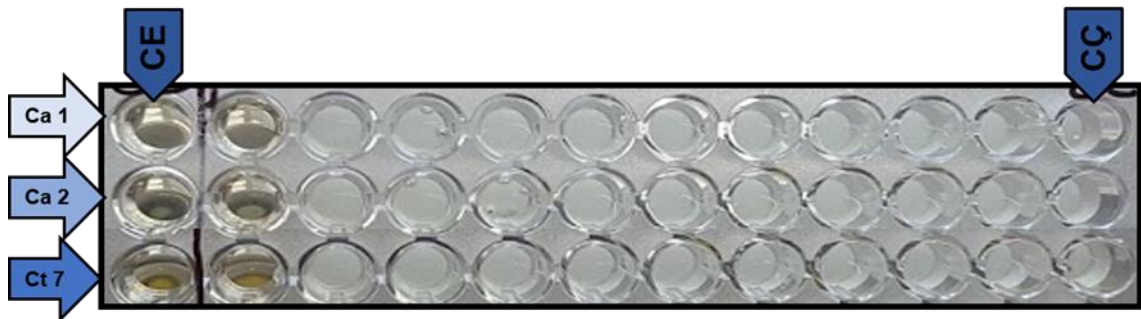


Figura 19: CIM 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a *C. albicans* (C.a). Cepas ensayadas: Ca.1 y Ca.2 en fila 1 y 2 respectivamente; *C. tropicalis* 7 (Ct.) en fila 3

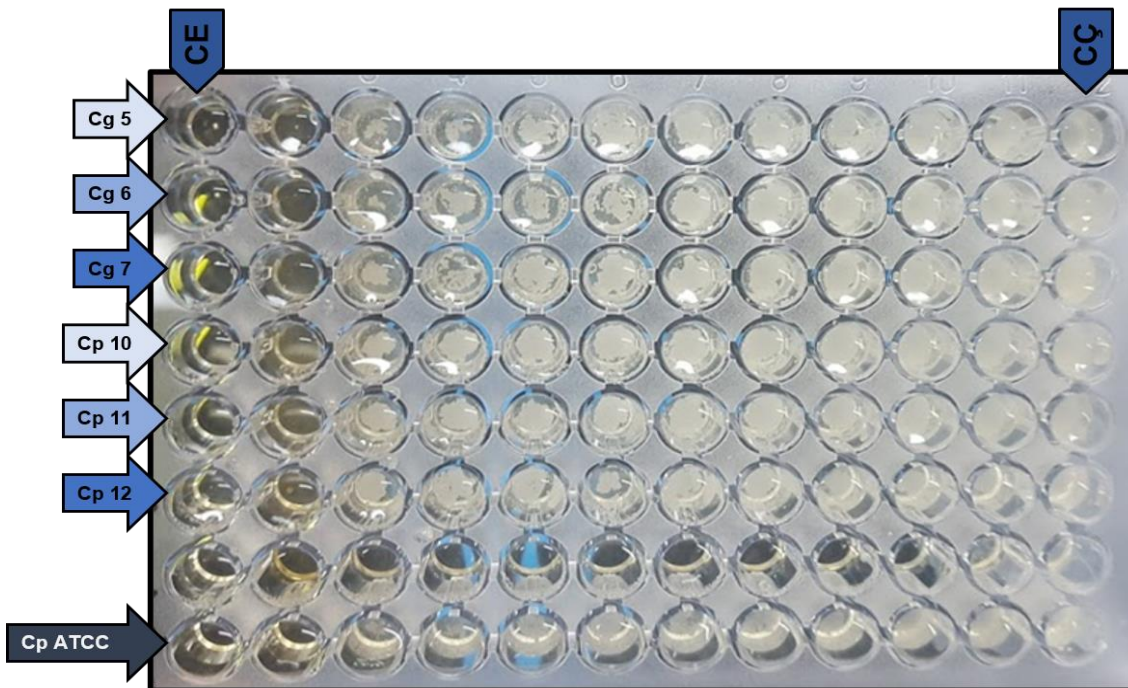


Figura 20. CIM 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cepas ensayadas: *C. glabrata* (Cg) 5, 6 y 7 en las filas 1, 2 y 3; *C. parapsilosis* (Cp) 10, 11 y 12 en las filas 4, 5 y 6; *C. parapsilosis* ATCC 22019 en la fila 8.

4.5. CITOTOXICIDAD

Con respecto a los estudios de citotoxicidad de AgNPS en células hepáticas normales (línea IHH), se observó que a 24 y 48 hs. de incubación, la presencia de las AgNPS alteró la viabilidad celular. En efecto, mientras que a las 24 hs de incubación en ausencia de AgNPS, la viabilidad celular se mantuvo al 100%, cuando las células se enfrentaron a una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AgNPS la viabilidad celular se redujo aproximadamente un 30%. Cuando la concentración de las AgNPS se incrementó a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la viabilidad celular descendió casi a un 50 %, siendo aún mayor cuando se empleó una concentración de 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AgNPS (figura 21). A partir de este comportamiento se puede inferir que luego de 24 hs. de exposición de las células normales a las AgNPS, la viabilidad celular se vió afectada de modo dosis-dependiente.

Por otro lado, a las 48 hs. de incubación de las células normales en ausencia de AgNPS, la viabilidad celular no se vió afectada, sin embargo, cuando se enfrentaron a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ la viabilidad celular se redujo a menos del 50 %. Posteriormente, ante un aumento de la concentración de las AgNPS (hasta 100 $\mu\text{g/mL}$) no se registró una marcada disminución de la viabilidad celular (figura 21). Por lo tanto, se considera que a las 48 hs. de incubación la disminución de la viabilidad celular no fue dependiente de la dosis, sino que estuvo más condicionada por el tiempo de exposición

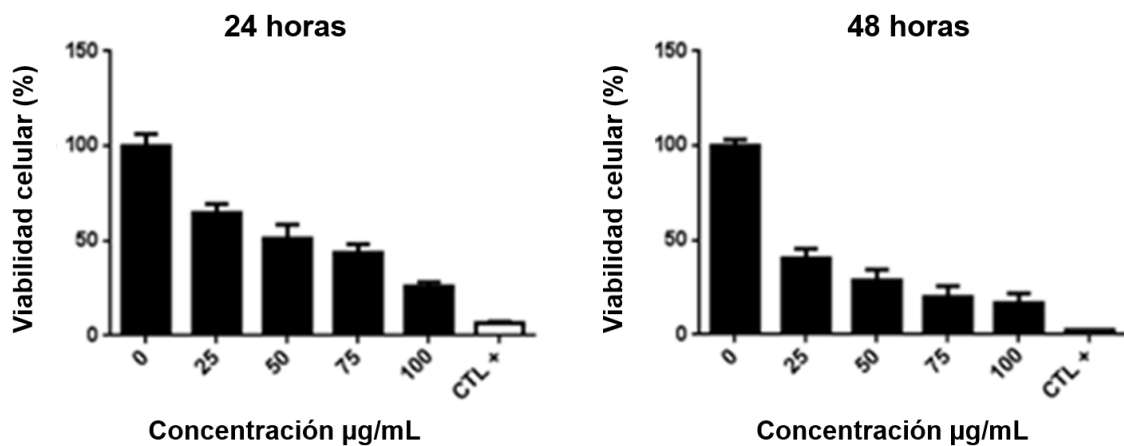


Figura 21. Representación de la viabilidad celular en función concentración de AgNPS a las 24 hs y 48 hs de incubación. CTL + = control positivo (Tritón X100 0,1%).



CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

CONCLUSIÓN

5.1. DISCUSIÓN

La biosíntesis de NPS metálicas se volvió dominante en el campo de la nanotecnología, debido a sus propiedades antimicrobianas. Hoy en día, en el escenario de patógenos emergentes, resistentes a los antibióticos, la plata está recuperando su importancia como potencial agente antimicrobiano, bajo la forma de AgNPS.

Últimamente hay una creciente demanda en desarrollar procedimiento ecológico para la obtención de AgNPS que no utilicen químicos tóxicos en sus protocolos de síntesis. Por este motivo, se generó un gran interés en el uso de estos sistemas también conocidos, como “síntesis verde”. Estos métodos ofrecen ventajas porque son fáciles de realizar, más económicos y “amigables con el medio ambiente” ya que no utilizan productos tóxicos. En este sentido, varios sistemas biológicos, como ser los hongos, se investigan continuamente para la síntesis de diferentes tipos de NPS metálicas, entre ellas, la de plata (10).

Los hongos se consideran mejores productores de NPS con respecto a las bacterias debido a que el micelio del hongo puede soportar determinadas condiciones tales como presión de flujo, agitación, y además son fáciles de cultivar. Asimismo, se sabe que los hongos segregan cantidades mucho más altas de sustancias bioactivas, lo que los hace más adecuados para la producción a gran escala. A su vez, los hongos son capaces de acumular iones metálicos por mecanismos fisiológicos, químicos y biológicos mediante unión a metabolitos y polipéptidos específicos (74).

En la literatura existen varias publicaciones en donde se investigó la obtención de AgNPS a partir de distintos hongos filamentosos (37)(38)(75)(76). Tomando como referencia dichas publicaciones, este trabajo se enfocó en impulsar las maquinarias metabólicas de un aislado de *Aspergillus terreus*, para la obtención de las AgNPS. Mediante la incubación de la biomasa (con agua ultrapura estéril) y bajo condiciones de agitación, (150 rpm durante 72 hs.) se activaron dichas vías metabólicas con el fin de

obtener agua rica en metabolitos fúngicos, las cuales fueron las responsables de la biosíntesis de las AgNPS.

Estudios anteriores demostraron que la elevada actividad enzimática presente en el extracto fúngico, participaría en la síntesis activa de las AgNPS (42)(75). En este sentido, la nitrato reductasa dependiente de NADH podría ser un factor clave para la formación de AgNPS por parte del *Aspergillus terreus*. La NADH reductasa es una coenzima involucrada en reacciones redox y puede usarse como agente reductor en muchas reacciones *in vivo* (42), por lo tanto, se podría inferir que esta enzima, liberada por *Aspergillus terreus*, sería la responsable de la síntesis de las AgNPS mediante la reducción de los iones de Ag^+

5.2. BIOSÍNTESIS DE AgNPS Y CARACTERIZACIÓN

El primer indicio de la obtención exitosa de las AgNPS, fue el cambio de color obtenido en el proceso de biosíntesis. A partir de la solución inicial de AgNPS, se realizó la caracterización necesaria mediante las técnicas apropiadas. Una de ellas fue la espectroscopía de absorción de luz UV-vis. Mediante esta técnica se puso de manifiesto el SPR específico de las AgNPS (54).

Al analizar la curva obtenida en el presente trabajo, (figura 14) la cual se extendió desde los 360 nm hasta los 550 nm, con un pico intenso a los 440 nm, se puede inferir que el ancho de la curva estaría relacionado con el amplio rango del tamaño de AgNPS obtenidas en el ensayo. En caso de haber obtenido AgNPS de tamaño más homogéneo, la curva del espectro UV-Vis, hubiese sido más angosta y confinada a un estrecho rango de longitudes de onda. El pico del plasmón puede mostrar un desplazamiento hacia la zona roja del espectro UV-Vis (longitudes de onda más alta) cuando las AgNPS presentan un tamaño mayor y en caso contrario muestra un desplazamiento hacia zona azul (longitudes de onda más baja) (figura 22) (54)(55).

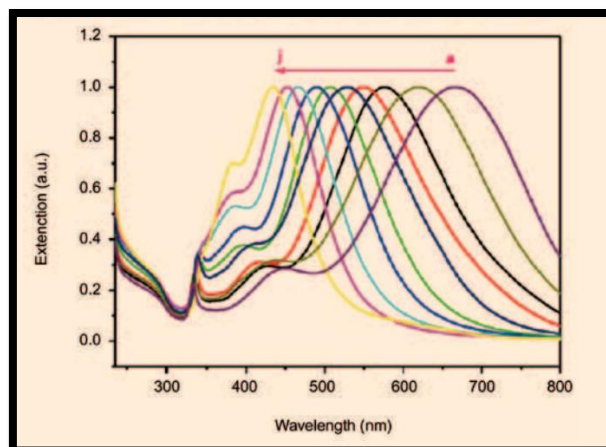


Figura 22: Espectros de UV-vis de soluciones de AgNPS con diferentes tamaños. Fuente “Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología” (54)

En Egipto, en el año 2013, *Khalil N.* observó, por medio de un espectrofotómetro UV-Vis, que la reducción de iones de plata a AgNPS por *A. terreus* tuvieron una tasa de absorbancia más alta que otras de especies de *Aspegillus* tales como *A. flavus*, *A. nidulans* y *A. niger*, registrando un pico a los 420 nm (38). En otro trabajo realizado en el mismo país, en el año 2021, *Lofty W, y col.*, comprobaron que el SPR de las AgNPS micosintetizadas, a partir de un aislado de la tierra de *A. terreus* se manifestó entre 300 y 600 nm del espectro con un pico a los 420 nm (37). Mientras que, en el año 2014, en la India, *Kulkarni P, y col.*, quienes también realizaron la caracterización de las AgNPS sintetizadas a partir de un aislamiento de *A. terreus*, registraron un SPR con un pico intenso a 400 nm del espectro UV-Vis (41).

El pico del SPR obtenido en el presente trabajo se aproxima al registrado por *Ammar y El-Desouky (40)* el cual se manifestó a los 430 nm del espectro UV-Vis. Al analizar estos resultados se puede concluir que los valores registrados fueron consistentes con los datos publicados en la bibliografía y entran dentro del rango de absorbancia característico para este tipo de NPS.

La caracterización de las AgNPS mediante microscopía electrónica aportó información acerca de la forma y el tamaño de las mismas.

La importancia de conocer el tamaño y forma de las AgNPS radica, en que estas características condicionan sus propiedades. Así lo confirmaron, *Morones y col.* quienes comprobaron que los efectos antimicrobianos de las AgNPS dependen del tamaño, como así también, de la tasa de liberación de los iones de Ag^+ (53).

El tamaño nanométrico de las NPS y su forma esférica le confieren características físico-químicas específicas. Cuanto más pequeñas y redondas son, tienen una mayor relación superficie/volumen, lo cual le confiere una mayor reactividad. En este sentido *Martinez Gutierrez y col.* evaluaron el efecto antimicrobiano de AgNPS de distintos tamaños y como resultado demostraron que una disminución del tamaño a 20-25 nm, aumenta considerablemente la actividad antifúngica, en comparación con las de mayor tamaño (80-90 nm) (77). Los átomos de la superficie son más reactivos que los átomos en el centro, esto explica el hecho de que, a menor tamaño de las AgNPS, su penetración en las células sería mayor, como así también su efecto antifúngico.

Los tamaños de AgNPS obtenidas, a partir de aislados de *Aspergillus terreus*, reportados en la literatura reflejan resultados bastante variables. Según datos publicados por *Ammar y El-Desouky*, (40) obtuvieron, AgNPS de 10 a 18 nm de diámetro, en contraste con *Khalil N*, quien obtuvo AgNPS comprendidas en un mayor rango de tamaño, entre 20-140 nm (38). Por otro lado, el equipo de *Lofty W*, lograron AgNPS de tamaño medio, entre 7-23 nm (37), similar al tamaño reportado por *Kulkarni P, y col.* (20-35 nm). En comparación al presente estudio, las AgNPS obtenidas en el presentaron tamaños similares.

En base a información publicada en la literatura son muchos los factores los cuales pueden condicionar el tamaño de las AgNPS. Estos factores incluyen: concentración de biomasa, sustrato, tiempo de exposición, pH, temperatura, velocidad de mezclado, concentración del AgNO_3 , tamaño del inóculo, etc.

En este sentido se puede inferir que, mediante la modificación de dichos factores se podría optimizar la producción de AgNPS con el fin de obtener AgNPS de menor tamaño. *Lofty W, y col.*(37) comprobaron en su trabajo de investigación que las variables más importantes que influyeron en el tamaño de las AgNPS fueron la concentración de AgNO_3 y el pH. Determinaron que, aumentando hasta 4 veces la concentración de la sal, disminuía considerablemente el tamaño de las AgNPS.

En cuando a los datos aportados por el espectro FTIR, permitieron corroborar la identidad de las moléculas bioactivas que intervinieron en la síntesis de las AgNPS. Estos resultados son consistentes con los reportados por otros autores quienes también sintetizaron AgNPS por métodos biológicos a partir de *Aspergillus terreus* (37)(38). Los picos relacionados con los enlaces amidas de las proteínas y con la presencia de aminoácido refuerzan la teoría que son las proteínas las que podrían estar involucradas en la unión, protección y estabilización de las AgNPS además de otorgarles diferentes propiedades biotecnológicas. Además, se identificó la presencia de alcoholes y compuestos fenólicos los cuales también estarían involucrados en la reducción de la Ag^+ y estabilización de las AgNPS tal como lo expresó previamente *Lofty W, y col.* en su trabajo (37).

5.3. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

En la bibliografía existe innumerables estudios en los cuáles se evaluó la actividad antifúngica de AgNPS obtenidas a partir de síntesis verde. Los resultados reportados en dichas publicaciones fueron muy variados.

En Brasil en el año 2015 *Ishida K, y col.* (75) obtuvieron AgNPS a partir de *Fusarium oxysporum* y evaluaron el efecto antifúngico en distintas cepas de género *Candida*, por el método de difusión en agar y por el método de microdilución en caldo. Con respecto al método de difusión en agar las cepas ensayadas fueron: *C. albicans* ATCC 10231; *C.*

albicans ATCC 24433; *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 13803 *C. krusei* ATCC 6258 y *C. glabrata* ATCC 2001.

En *C. albicans* ATCC 10231 registraron un halo de 13 mm y en *C. albicans* ATCC 24433 un halo de 15 mm. Cuando evaluaron el potencial antifúngico en *C. glabrata* ATCC 2001 registraron un halo de 8 mm. En el caso *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 13803 y *C. krusei* ATCC 6258 no registraron halo. La concentración de AgNO₃ de la suspensión de AgNPS fue de 1 mM, o sea la misma concentración empleada en el presente estudio.

Por otro lado, Li G, y col. (42) en el año 2012 en China, biosintetizaron AgNPS a partir de un aislado de *Aspergillus terreus*, y evaluaron la actividad antifúngica frente a *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. tropicalis* JLCC 30394. Ellos registraron halos de inhibición en todas las cepas ensayadas: 9 mm, 10 mm, 9 mm y 10 mm respectivamente. A diferencia del trabajo realizado por el equipo de Ishida, partieron de una concentración de AgNO₃ de 5 mM..

Al comparar los resultados de los dos trabajos previamente citados, con los resultados alcanzados en el presente estudio, se puede observar que los halos obtenidos fueron próximos. Análogamente, en los tres casos se registraron halos cuando se ensayaron cepas de *C. albicans*, sin embargo, las diferencias se observaron en las otras cepas.

En coincidencia con el trabajo de Ishida K, y col., en el presente trabajo no se registraron halos en *C. tropicalis* y *C. glabrata* pero si se registraron halos en *C. parapsilosis* y *C. krusei*,

En mi opinión, las discrepancias podrían corresponderse a numerosas causas, por un lado, la diferente concentración de AgNO₃ empleada, o el distinto tamaño de las AgNPS obtenidas en cada caso. La naturaleza química de las AgNPS, podrían haber

condicionado la difusión en el medio agarizado o quizás la modificación realizada al método original de difusión en agar.

En la bibliografía hay varios trabajos reportados (57)(58)(59) en donde realizó la modificación al método original (método de difusión en agar) denominado “método de difusión en pozo”. Según las publicaciones, este método modificado se usó para evaluar el potencial antifúngico de sustancias desconocidas. Incluso algunos trabajos compararon los resultados obtenidos con el método de difusión en pozo y método de difusión en agar (con discos) y no registraron diferencias significativas.

Con respecto al método de microdilución en caldo, los resultados obtenidos confirmaron el efecto inhibitor previamente observado con el método de difusión en agar, sin embargo, los valores de CIM hallados fueron superiores a los reportados por otros autores.

Los resultados de CIM conseguidos por *Ishida K, y col. (75)* oscilaron entre 0,84 y 1,68 $\mu\text{g/mL}$, observándose los resultados más altos en las cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, mientras que los resultados de CIM más bajos (0,84 $\mu\text{g/mL}$) se observaron en *C. krusei* y *C. parapsilosis*.

Qian Y, y col. (78) sintetizaron AgNPS a partir de un hongo endofítico *Epicoccum nigrum* y su efecto antifúngico se evaluó sobre las siguientes cepas: *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258 y *C. tropicalis* JLCC 31384, obteniéndose valores de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,125 $\mu\text{g/mL}$, 0,125 $\mu\text{g/mL}$ y 1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. En coincidencia a los dos trabajos recientemente citados, en este ensayo los valores de CIM más bajos se registraron cuando se evaluó el efecto de las AgNPS sobre *C. krusei* ATCC 6258.

Los valores de CIM obtenidos en el presente ensayo se aproximan más a los reportados por *Khatoon N, y col. (79)* quienes evaluaron el efecto antifúngico de AgNPS en *C. albicans* ATCC 9002, *C. glabrata* ATCC 90030 y *C. tropicalis* ATCC 750. Los

resultados de CIM reportados por ellos fueron: 60 µg/mL, 30 µg/mL y 30 µg/mL respectivamente.

Al comparar los diferentes valores obtenidos, se puede inferir que la discrepancia de los mismos puede deberse al diferente potencial antifúngico de las AgNPS obtenidas en cada caso. Además, como ya se mencionó previamente, la actividad antifúngica depende principalmente del tamaño, por lo que no sorprendería su incidencia en las diferencias apuntadas anteriormente. Los tamaños promedios de AgNPS registrados por el equipo de *Ishida K*, *Qian Y*, y *Khatoon, N.* fueron de 55 nm, 15 nm y 5 nm respectivamente. Por otro lado, la diferente maquinaria metabólica de los agentes utilizados como biosintetizadores, podrían haber condicionado su tamaño.

Es importante destacar que tanto el equipo de *Ishida K*, como el de *Qian Y*, se fundamentaron en el protocolo de CLSI con un inóculo menor. Si bien, *Khatoon N*, y *col.* no detallan el protocolo en el cual se basaron, pero por el inóculo que usaron y otros detalles metodológicos que detallan en su trabajo, se puede inferir que se fundamentaron en EUCAST, y coincidentemente, obtuvieron valores de CIM próximos a los reportados en el presente ensayo.

Por otro lado, cuando se compararon los resultados de CIM de las AgNPS frente a las levaduras ensayadas, con los valores de CIM a los ATF convencionales se observaron notorias diferencias, siendo mucho más altas las CIM a las AgNPS.

Sin embargo, en la literatura existen varios estudios los cuáles manifiestan que las AgNPS tienen excelente efecto antifúngico, debido a los bajos rangos de CIM obtenidos.

Lotfali E, y *col.* (80) evaluaron la actividad antifúngica de las AgNPS frente a cepas de *C. glabrata*, sensible dosis dependiente al FCZ (CIM 2 y 8 µg/mL). Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, en tanto que la CIM de las AgNPS frente a estas cepas fue inferior a la registrada con el FCZ. Dichos valores oscilaban entre 0,125 µg/mL y 0,5 µg/mL.

En un trabajo similar, *Nasrollahi A, y col. (48)*, evaluaron el potencial antifúngico de las AgNPS en aislados de *C. albicans* resistentes al FCZ (8 -16 µg/mL) y con CIM a la AMB de 1-4 µg/mL. Favorablemente la CIM de las AgNPS frente a las cepas de *C. albicans* ensayadas resultó inferior (0,5-2 µg/mL).

Al analizar estos resultados se podría decir, que en estos ensayos las AgNPS mostraron un potencial antifúngico superior a los ATF convencionales ensayados, lo que no se pudo comprobar en el presente trabajo.

5.4. MECANISMO DE ACCIÓN

Resulta curioso conocer cuál sería el mecanismo por el cual las AgNPS son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos. Algunas investigaciones realizadas a nivel de la ultraestructura revelaron que el blanco de las AgNPS en las levaduras sería la membrana plasmática y la pared celular, inhibiendo el proceso de gemación (75).

Chwalibong A, y col.(81) demostraron que las AgNPS pueden auto-ensamblarse e interactuar con las levaduras, produciendo de esa manera, la desintegración de la membrana plasmática y pared celular con fuga de material citoplasmático. La unión a la membrana plasmática, estaría mediada por la interacción entre las AgNPS a proteínas que contiene fósforo y azufre presentes en la misma. En el interior de la célula, las AgNPS estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales causan peroxidación de los lípidos de la membrana, contribuyendo con la disrupción de la misma. Tal es así que *Hwang I, y col. (82)* también demostraron que las AgNPS poseen efecto antifúngico a través de la apoptosis. Ante la exposición a las mismas, las levaduras del género *Candida* acumulan ROS, lo cual produce una reducción del potencial de membrana mitocondrial, alterado la cadena respiratoria, producen externalización de la fosfatidilserina, fragmentación del ADN nuclear y activación de las caspasas.

Como se sabe, la plata es conocida como uno de los agentes antimicrobianos más antiguos. La plata, en su forma iónica cura enfermedades infecciosas causadas por distintos microorganismos, sin embargo, las AgNPS tienen ventaja sobre la plata iónica ya que muestran toxicidad reducida y mayor potencial antimicrobiano. Esta preeminencia se debe a la gran área de superficie que presentan las AgNPS, lo que proporciona un mayor contacto con los microorganismos (75). En la bibliografía existen estudios en donde comparan efecto antifúngico de AgNO_3 y AgNPS sobre algunas cepas, obteniéndose resultados pocos satisfactorios (38)(42). En otro trabajo se comparó el efecto antimicrobiano de las AgNPS con nitrato de plata y cloruro de plata, y coincidentemente el mismo reveló que los AgNPS tienen una mayor potencia antimicrobiana que los iones de plata libres (14).

5.5. CITOTOXICIDAD

Así como las AgNPS afectan la viabilidad de las células fúngicas, las células normales de mamíferos también pueden verse afectadas por las mismas. En estas células el efecto citotóxico estaría relacionado a la pérdida de viabilidad celular, fragmentación del ADN, y posterior apoptosis. En la literatura existen publicaciones que aseguran que las AgNPS obtenidas por síntesis verde parecen ser menos geno/citotóxicas in vivo que las AgNPS sintetizadas químicamente, como así también aseguran que las células humanas tienen una mayor resistencia los efectos tóxicos de las AgNPS en comparación con otros organismos (75).

El hígado es el órgano responsable del proceso metabólico del cuerpo, de hecho, la mayoría de los medicamentos se modifican o metabolizan en el hígado. Estudios anteriores, informaron que el hígado parecía ser un sitio importante de acumulación de las AgNPS (83).

Firouz F, y col. (71) comprobaron el efecto citotóxico de AgNPS en células hepáticas normales de ratón (HepG2) observando una disminución de la viabilidad dosis

dependiente luego de 24 hs. de incubación. Demostraron que la citotoxicidad inducida por las AgNPS fue resultado del estrés oxidativo. También comprobaron que las AgNPS redujeron el contenido de ATP de las células, causando daño en las mitocondrias, con aumento de las ROS, de forma dosis dependiente. Por otro lado *Mahdy M, y col.* (84) evaluaron la citotoxicidad de las AgNPS en células hepáticas de rata albina, mediante la observación de cambios histológicos que experimentaron las células a la exposición. Como resultado comprobaron que las AgNPS fueron capaces de producir alteraciones histológicas en las células por mecanismos asociados al estrés oxidativo. Los resultados de citotoxicidad arrojados por estos dos trabajos mencionados son consistentes con los obtenidos en el presente estudio en el cual se llegó a la conclusión que presentan cierto grado de toxicidad.

Un gran número de publicaciones han demostrado que, además de la concentración de las AgNPS, la citotoxicidad también depende de otros factores, como ser el tamaño, forma, estado de agregación, entre otros (22)(85). Cuanto más pequeñas son, tienen más capacidad para penetrar en los sistemas biológicos normales. Considerando la forma, las AgNPS esféricas son más fácil de ser endocitadas que las de formas tubulares, por lo tanto, las AgNPS esféricas son menos tóxicas ya que están menos tiempos en el torrente sanguíneo. Se ha demostrado que todas estas propiedades afectan la distribución y el depósito de las nanopartículas en los distintos sistemas de órganos (84). Sin embargo, se descubrió que, modificando las propiedades superficiales mediante el uso de diferentes materiales de recubrimiento, se pueden reducir potencialmente su toxicidad. Una opción podría ser el uso del polietilenglicol, el cual reduciría la toxicidad de las NPS alterando las interacciones con las proteínas (86). Otra alternativa para su posible uso sistémico podría ser el uso de dispositivos que produzcan una liberación controlada de las mismas. También se podría pensar en formulaciones para tratamiento tópicos, desinfectantes de superficies, o antifúngicos para otros sectores de la industria como ser el sector del agroindustrial.

Vale la pena destacar que todos los ATF presentan con frecuencia efectos secundarios y colaterales, por lo que su margen terapéutico es estrecho, limitando su aplicación en la práctica clínica. Por citar algunos ejemplos, la AMB convencional produce toxicidad a nivel renal; el uso de los azoles, entre ellos el FCZ e itraconazol (ITZ), se asocia a menudo a alteraciones hepáticas. El VCZ además puede producir fotosensibilidad y taquicardia. Con respecto a las equinocandinas se registraron alteraciones hepáticas y leve alteración de la función renal (87). Se conocen centenares de moléculas con actividad frente a los hongos, pero sólo una decena son aplicables al tratamiento de las micosis sistémicas. Cada antifúngico presenta características farmacológicas y microbiológicas diferentes, las cuales deben tenerse en cuenta a la hora de la elección del antimicrobiano según el caso clínico (86).

5.6. CONCLUSIÓN

Se pudo concluir que la cepa de *Aspergillus terreus* seleccionada fue capaz de sintetizar AgNPS a través de sus metabolitos intracelulares, mediante un proceso de bajo costo, y amigable con el medio ambiente.

Se realizó la caracterización, observándose AgNPS de forma esférica, con un tamaño promedio de 55 nm. La cobertura biológica de las mismas, indicó la presencia de proteínas, fenoles, alcoholes y otros metabolitos que participaron en la síntesis y estabilización de las AgNPS.

Mediante los métodos empleados, se comprobó que presentaron potencial antifúngico frente a las cepas del género *Candida* ensayadas. Por este motivo, los resultados obtenidos en el presente estudio justifican investigaciones adicionales a fin de optimizar su efecto antifúngico, como así también se necesitan estudios para establecer el perfil de seguridad y evaluación de los efectos citotóxicos para alcanzar posibles formulaciones farmacéuticas para el tratamiento de la micosis.

BIBLIOGRAFIA

1. Malik S, Muhammad W Y. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. *Molecules*. 2023 Enero 9; 28(2): p. 661.
2. Laux P, et Al. Nanomaterials: certain aspects of application, risk assessment and risk communication. *Archives of Toxicology*. 2018 Enero; 92(1): p. 121-141
3. Zambrano G. Efecto de la nanoestructura sobre las propiedades térmicas y magnéticas de nanomateriales tipo 2D y 0D. *Rev. acad. colomb. cienc. exact. fis. nat.*. 2021 Junio 15; 44(170): p. 153-68.
4. Boisseau P, Loubaton B. Nanomedicine, Nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*. 2011 Junio 7; 12(6): p. 620-636.
5. Khan I, Khan M, Umar MN, Oh DH. Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. *IET Nanobiotechnology*. 2015 Diciembre; 9(6): p. 396-400.
6. Ahmed S, Annu, Ikram S, Salprima Tudha S. Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2016 Agosto; 161: p. 141-153.
7. Quiñones Pérez D. Antimicrobial resistance: evolution and current perspectives in the context of the "One health" approach. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2017 Diciembre; 69(3): p. 1-17.
8. Valdez Fernández-Baca L M. Resistencia antibiótica. *Rev Med Hered*. 2003 Octubre; 14(4): p. 155-7.
9. Souza A C, Amaral A C. Antifungal Therapy for Systemic Mycosis and the Nanobiotechnology Era: Improving Efficacy, Biodistribution and Toxicity. *Front Microbiol*. 2017 Marzo; 7(8): p. 336.
10. Anbazhagan S, Azeez S, Morukattu G, Rajan R, Venkatesan K, Thangavelu K. Synthesis, characterization and biological applications of mycosynthesized silver nanoparticles. *Biotech*. 2017 Septiembre 19; 7(333).
11. Klases H J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*. 2000 Marzo; 26(2): p. 131-8.
12. Chen X, Schluesener H J. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. *Toxicology Lett*. 2008 Enero 1; 176(1): p. 1-12.
13. Cardoso P C. Nanopartículas de plata: obtención, utilización como antimicrobiano e impacto en el área de la salud. *Rev. Hosp. Niños*. 2016 Marzo; 58(260): p. 19-28.
14. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian A M. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*. 2010 Noviembre; 28(11): p. 550-588.
15. Wan G, Lingao R, Yin Y, Yang T, Ge M, Cheng X. Effects of silver nanoparticles in combination with antibiotics on the resistant bacteria *Acinetobacter baumannii*. *Int J Nanomedicine*. 2016 Agosto 12; 11(-): p. 3789-800.
16. Markowska K, Grudniak A M, Wolska K. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim Pol*. 2013; 60(4): p. 523-30.
17. Ghanbari H, Viatge H, Kidane A G, Burriesci G, Tavakoli M, Seifalian A M. Polymeric heart valves: new materials, emerging hopes. *Trends Biotechnol*. 2009 Junio; 27(6): p. 359-67.
18. Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing M M. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int J Nanomedicine*. 2014 Mayo 16; 9: p. 2399-407.

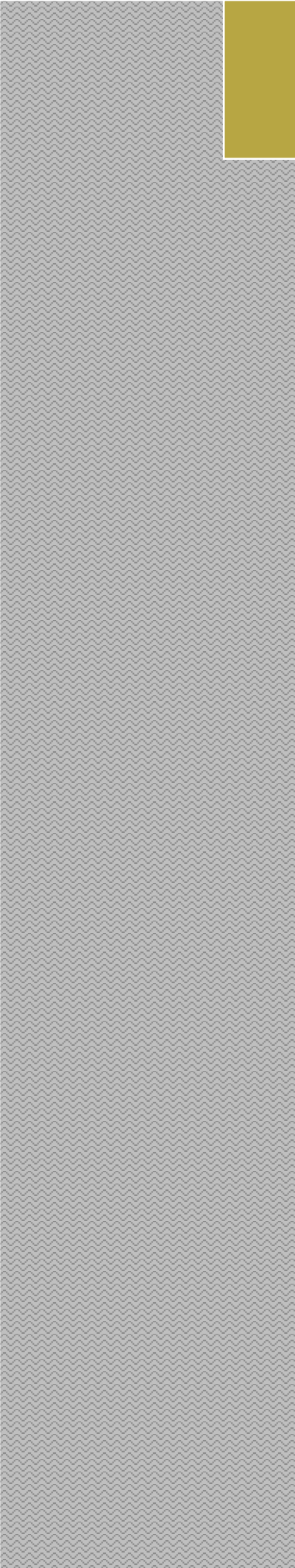
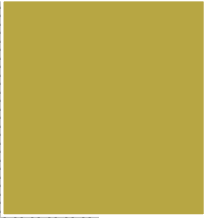
19. Sibbald R G, Contreras-Ruiz J, Coutts P, Fierheller M, Rothman A, Woo K. Bacteriology, Inflammation, and Healing: A Study of Nanocrystalline Silver Dressings in Chronic Venous Leg Ulcers. *Advances in Skin & Wound Care*. 2007 Octubre; 20(10).
20. Yoshida K, Tanagawa M, Matsumoto S, Yamada T, Atsuta M. Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials. *Eur J Oral Sci*. 1999 Agosto; 107(4): p. 290-6.
21. Sreenivasalu P K P, Dora C P, Swami R, Jasthi V C, Shiroorkar P N, Nagaraja S et al. Nanomaterials in Dentistry: Current Applications and Future Scope. *Nanomaterials*. 2022 Mayo 14; 12(10): p. 1676.
22. Mikhailova E O. Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application. *J Funct Biomater*. 2020 Diciembre; 11(4): p. 84.
23. Lu L, Wai-Yin Sun R, Chen R, Hui C K, Ho C M, Luk J M et al. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir Ther*. 2008; 13(2): p. 253-62.
24. Sun R W, Chen R, Chung N, Ho C M, Steve Lin C L, Che C M. Silver nanoparticles fabricated in Hepes buffer exhibit cytoprotective activities toward HIV-1 infected cells. *Chemical Commun*. 2005 Septiembre 16; 28(40).
25. Rogers J V, Parkinson C V, Choi Y W, Speshock J L, Hussain S M. A Preliminary Assessment of Silver Nanoparticle Inhibition of *Monkeypox Virus* Plaque Formation. *Nanoscale Res Lett*. 2008 Abril 09; 3(129).
26. Pilaquinga F, Morey J, Torres M, Seqqat R, Piña M. Silver nanoparticles as a potential treatment against SARS-CoV-2: A review. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2021 Febrero 27; 13(5).
27. Jeremiah S S, Miyakawa K, Morita T, Yamaoka Y, Ryo A. Potent antiviral effect of silver nanoparticles on SARS-CoV-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020 Noviembre 26; 533(1): p. 195-200.
28. Kumar A, Nath K, Parekh Y, Enayathullah M G, Bokara K K, Sinhamahapatra A. Antimicrobial silver nanoparticle-photodeposited fabrics for SARS-CoV-2 destruction. *Colloid and Interface Science Communications*. 2021 Noviembre; 45: p. 100542.
29. Zhang D, Ma X L, Gu Y, Huang H, Zhang G W. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Potential Applications to Treat Cancer. *Front Chem*. 2020 Octubre 29; 8(799).
30. Lee S H, Jun B H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *Int. J. Mol*. 2019; 20(4): p. 865.
31. Chugh D, Viswamalya V S, Das B. Green synthesis of silver nanoparticles with algae and the importance of capping agents in the process. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021; 19(126).
32. Li P J, Pan J J, Tao L J, Li X, Su D L, Shan Y et al. Green Synthesis of Silver Nanoparticles by Extracellular Extracts from *Aspergillus japonicus* PJ01. *Molecules*. 2021 Julio 24; 26(15): p. 4479.
33. Sabino R, Gonçalves P, Martins Melo A, Simões D, Oliveira M, Francisco M et al. Trends on *Aspergillus* Epidemiology—Perspectives from a National Reference Laboratory Surveillance Program. *J. Fungi*. 2021; 7(1): p. 28.
34. Bennett J W. *Aspergillus*: a primer for the novice. *Medical Mycology*. 2008 Marzo 11; 47: p. S5-S12.

35. Vadlapudi V, Borah N, Yellusani K R, Gade S, Reddy P, Rajamanikyam M. *Aspergillus* Secondary Metabolite Database, a resource to understand the Secondary metabolome of *Aspergillus* genus. Scientific Reports. 2017 Agosto 04; 7(7325).
36. Boruta T, Bizukoje M. Induction of secondary metabolism of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in the batch bioreactor cultures. Appl Microbiol Biotechnol. 2016 Abril; 100(7): p. 3009-22.
37. Lofty W A, Alkersh B M, Sabry S A, Ghazlan H A. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by *Aspergillus terreus*: Characterization, Optimization, and Biological Activities. Front. Bioeng. Biotechnol. 2021 Abril 15; 9.
38. Khalil N M. Biogenic silver nanoparticles by *Aspergillus terreus* as a powerful nanoweapon against *Aspergillus fumigatus*. Afr. J. Microbiol. Res.. 2013 Diciembre 31; 7(50): p. 5645-51.
39. Balakumaran M D, Ramachandran R, Balashanmugam P, Mukeshkumar D J, Kalaichelvan P T. Mycosynthesis of silver and gold nanoparticles: Optimization, characterization and antimicrobial activity against human pathogens. Microbiol Res. 2016 Enero; 182: p. 8-20.
40. Ammar H A M, El-Desouky T A. Green synthesis of nanosilver particles by *Aspergillus terreus* HA1N and *Penicillium expansum* HA2N and its antifungal activity against mycotoxigenic fungi. J Appl Microbiol. 2016 Julio; 121(1): p. 89-100.
41. Kulkarni P, Rathod V, Hiremath J, Ninganagouda S, Singh D, Singh Chatrapati A K et al. Biosynthesis and Characterization of Silver Nanoparticles from *Aspergillus Terreus* and its Antibacterial Efficacy against VRSA Strains. International Journal of Engineering Research & Technology (IJERT). 2014 Junio 1; 3(6).
42. Li G, He D, Qian Y, Guan B, Gao S, Cui Y et al. Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*. Int J Mol Sci. 2012; 13(1): p. 466-76.
43. Ksiezopolska E, Gabaldón T. Evolutionary Emergence of Drug Resistance in *Candida* Opportunistic Pathogens. Genes (Basel). 2018 Septiembre 19; 9(9): p. 461.
44. Riera F, Medeot M, Sartori L, Bergallo C, Minoli J, Vilchez V et al. Candidemia epidemiology in Córdoba Argentina. Surveillance study of five institutions. Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba. 2014; 71(2): p. 89-93.
45. Rodero L, Davel G, Soria M, Vivot W, Córdoba S, Canteros C E et al. Multicenter study of fungemia due to yeasts in Argentina. Rev Argent Microbiol. 2005; 37(4): p. 189-95.
46. Tiraboschi I N, Pozzi N C, Farías L, García S, Fernández N B. Epidemiology, species, antifungal resistance and outcome of candidemia in a university hospital in Buenos Aires, Argentina for 16 years. Revista chilena de infectología. 2017 Octubre; 34(5): p. 431-40.
47. Córdoba S, Vivot W, Bosco-Borgeat M E, Taverna C, Szusz W, Murisengo O et al. Species distribution and susceptibility profile of yeasts isolated from blood cultures: results of a multicenter active laboratory-based surveillance study in Argentina. Rev Argent Microbiol. 2011 Julio; 43(3): p. 176-85.
48. Nasrollahi A, Pourshamsian K H, Mansourkiaee P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. International Journal of Nano Dimension. 2010 Noviembre; 1: p. 233-9.
49. Peiris M K, Gunasekara C P, Jayaweera P M, Arachchi N D H, Fernando N. Biosynthesized silver nanoparticles: are they effective antimicrobials? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017 Agosto; 112(8): p. 537-43.
50. Frisvad J C, Hubka V, Ezekiel C N, Hong S B, Nováková A, Chen A J et al. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. Stud Mycol. 2018 Julio 31; 93: p. 1-63.

51. Lass-Flörl C, Dietl A M, Kontoyiannis D P, Brock M. *Aspergillus terreus* Species Complex. Clin Microbiol Rev. 2021 Diciembre 15; 34(4): p. e0031120.
52. Zhang X F, Liu Z G, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. Int. J. Mol. Sci. 2016 Septiembre 13; 17(9): p. 1534.
53. Morones J R, Elechiguerra J L, Camacho A, Holt K, Kouri J B, Tapia Ramírez J et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005 Agosto 26; 16(10): p. 2346-53.
54. Martínez F M, Zuniga G E, Sánchez Lafarga A K. Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología. Mundo nano. Revista interdisciplinaria en nanociencias y nanotecnología. 2013; 6(10): p. 101-8
55. Osorio Anaya A M, Manrique Fajardo J J, Cornejo Sánchez O. Estudio teórico del plasmón en nanoesferas de oro. Rev. Soc. Quím. Perú. 2019 Octubre-Diciembre; 85(4): p. 432-9.
56. Liu J F, Yu S J, Yin Y G, Chao J B. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 2012 Marzo; 33: p. 95-106.
57. Pérez-Delgado O, Vallejos-Campos E C. Actividad antifúngica in vitro del extracto crudo acuoso de Rosmarinas officinalis contra. J. Selva Andina Res. Soc. 2019 Febrero; 10(1).
58. Torres J, Romero H, Santiago A, Apitz Castro R. Susceptibilidad in vitro de *Histoplasma capsulatum* al ajoene usando los métodos de difusión en agar con discos y pozos. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 2006 Junio; 26(1).
59. Rojas J, García A M, López A J. Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2005 Julio; 4(2): p. 28-32.
60. Ochiuzzi M E, Arechavala A, Guelfand L, Maldonado I, Soloaga R. Evaluación de las tarjetas AST-Y501 del sistema Vitek 2 para determinar la sensibilidad a antifúngicos de levaduras del género *Candida*. Rev. argent. microbiol. 2014 Junio 30; 46(2): p. 111-8.
61. Castro Méndez C, García Sánchez E, Martín- Mazuelos E. Updating of in vitro antifungal susceptibility tests. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2019;; p. 32-39.
62. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, M27-4th Edition. 4th ed. 2017. 46 p. ISBN Number: 1-56238-827-4 1-56238-827-4
63. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. Definitive Document E.Def 7.3.1. 2017. 21 p
64. Tapia P Cecilia V. Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. Rev. chil. infectol. 2009 Abril; 26(2).
65. Arredondo Vélez M C, Tamayo Velazquez J J, Valencia Aristizábal K, Zuluaga Jiménez J C. Repositorio Digital Institucional de la Universidad CES. [Online].; 2022 [cited 03 Mayo 2023]. Available from: <https://hdl.handle.net/10946/5959>.
66. Centeno Briceño S, Carrera Jaspe Y Actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de *melissa officinalis* (lamiaceae) sobre *Aspergillus flavus*. Actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de *melissa officinalis* (lamiaceae) sobre *aspergillus flavus*. Saber. 2013 Junio; 25(2): p. 185-92.

67. Andrade-Ochoa S, Chacón-Vargas K F, Sánchez-Torres L E, Rivera-Chavira BE, Nogueira-Torres B, Nevárez-Moorillón G V. Differential Antimicrobial Effect of Essential Oils and Their Main Components: Insights Based on the Cell Membrane and External Structure. *Membranes* (Basel). 2021 Mayo 28; 11(6).
68. Riss T L, Moravec R A, Niles A L, Duellman S, Benink H A, Worzella T J et al. *Cell Viability Assays*. 144065th ed. Sciences EL&CatNCfAT, editor.: Bethesda (MD); 2004.
69. Chávez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Rodrigues EM, Gomes-Cornélio AL, Faria G, Bernardi MIB, Guerreiro-Tanomaru JM. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial activity of poly(vinyl alcohol)-coated silver nanoparticles and farnesol as irrigating solutions. *Arch Oral Biol*. 2017 Diciembre; 84(1): p. 89-93.
70. Acevedo Contreras A, Acosta Torres L S, Morales-Zavala C A., Castaño Meneses V M. Citotoxicidad y efecto antifúngico de nanopartículas de plata para uso odontológico. [En línea]; 2012 [cited 2023 Mayo 5. Available from: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-56912012000200068.
71. Faedmaleki F, Shirazi F H, Salarian A A, Ashtiani H A, Rastegar H. Toxicity Effect of Silver Nanoparticles on Mice Liver Primary Cell Culture and HepG2 Cell Line. *Iran J Pharm Res*. 2014; 13(1): p. 235-42.
72. Rónavári A, Igaz N, Adamecz D I, Szerencsés B, Molnar C, Kónya Z et al. Green Silver and Gold Nanoparticles: Biological Synthesis Approaches and Potentials for Biomedical Applications. *Molecules*. 2021 Febrero 5; 26(4): p. 844.
73. CLSI. *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. 2nd ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
74. Omran B A, Nassar H N, Fatthallah N A, Hamdy A, El-Shatoury E H, El-Gendy N S. Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles mycosynthesized by *Aspergillus brasiliensis*. *J Appl Microbiol*. 2018 Agosto; 125(2): p. 370-82.
75. Ishida K, Ferreira Cipriano T, Miranda Rocha G, Weissmüller G, Gomes F, Miranda K et al. Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014 Abril; 109(2): p. 220-8.
76. Sagar G, Bhosale A. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus niger* and Its Efficacy Against Human Pathogens. *European Journal of Experimental Biology*. 2012 Octubre; 2(5): p. 1654-8.
77. Martínez-Gutiérrez F, Olive P L, Banuelos A, Orrantia E, Nino N, Morales Sanchez E et al. Synthesis, characterization, and evaluation of antimicrobial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010 Octubre; 6(5): p. 681-8.
78. Qian Y, Yu H, He D, Yang H, Wang W, Wan X et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2013 Noviembre; 36(11): p. 1613-9.
79. Nafeesa Khatoon, Abhijeet M, Hammad A, Nikhat M & Meryam S. Biosynthesis, Characterization, and Antifungal Activity of the Silver Nanoparticles Against Pathogenic Candida species. *BioNanoScience*. 2015 Febrero; 5(1).
80. Lotfali E, Toreyhi H, Makhdoomi Sharabiani K, Fattahi A, Soheili A, Ghasemi R, et al. Comparison of antifungal properties of gold, silver, and selenium nanoparticles against amphotericin B-resistant *Candida glabrata* clinical isolates. *Avicenna J Med Biotechnol* [Internet]. 2020.

81. Chwalibog A, Sawosz E, Hotowy A, Szeliga J, Mitura S, Mitura K et al. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. *Int J Nanomedicine*. 2010 Diciembre 6; 2010(5): p. 1085-94.
82. Hwang I S, Lee J, Hwang J H, Kim K J, Lee D G. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS J*. 2012 Abril; 279(7): p. 1327-38.
83. Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U et al. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect*. 2001 Agosto; 109(4): p. 547-51.
84. El Mahdy M M, Slaheldin T A, Sayed Aly H, Mohammed F F, Shaalan M. Evaluation of hepatotoxic and genotoxic potential of silver nanoparticles in albino rats. *Exp Toxicol Pathol*. 2015 Enero; 67(1): p. 21-9.
85. Madni A, Rehman S, Sultan H, Muzamil Khan M, Ahmad F, Raza M R et al. Mechanistic Approaches of Internalization, Subcellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanoparticles for Targeting the Small Intestine. *AAPS PharmSciTech*. 2020 Noviembre 22; 22(1): p. 3.
86. Najahi-Missaoui W, Arnold R D, Cummings B S. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *Int J Mol Sci*. 2020 Diciembre 31; 22(1): p. 385.
87. Ruiz Camps I, Cuenca-Estrella M. Antifungals for systemic use. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2009 Junio; 27(6): p. 353-62.



ANEXOS

Mientras se realizó el trabajo de investigación se presentaron trabajos en congresos y jornadas. Los resúmenes se presentan a continuación:

El siguiente trabajo fue presentado en formato de poster, modalidad presencial en Congreso N° 15 Infocus- Curitiba- Brasil realizado en el mes de Noviembre del año 2017.

**BIOSYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES (AgNPS) FROM *Aspergillus* sp.,
EVALUATION OF THE POTENTIAL ANTIFUNGAL EFFECT**

Noblega L^{1.}, Morales A^{2.}, Colombres S^{1.}, Marquez N^{1.}, Orellana N^{1.}, Alvarez C^{1.}, Romero CM^{2.}

1-Laboratorio de Salud Pública División Micología-Mendoza 128. Tucumán CP: 4000.

2-Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI-CONICET). Avenida Belgrano y Pasaje Caseros. Tucumán. luciananoblega@gmail.com

Advances in nanotechnology are a promising alternative in the development of new antimicrobial agents. In this sense, nanomaterials have received much attention from the scientific community because of their effective antifungal characteristics, such as silver nanoparticles (AgNPS). AgNPS are small particles in the range of 1 to 100 nm. These particles have shown low toxicity to human cells, high thermal stability and low volatility, being their main applications as antifungal, antibacterial, in the treatment of wounds, the preparation of dental materials, among others. The objective of the following study was to biosynthesize silver nanoparticles (AgNPS) from strains of the genus *Aspergillus* and to evaluate its antifungal potential against pathogenic yeasts by the diffusion technique. From 3 different species of *Aspergillus* was obtained to obtain fungal biomass. It was washed and placed for 72 hours in ultrapure water to release enzymes or other intermediates in the synthesis of nanoparticles. The water rich in these compounds was separated from the biomass and exposed to a 1 mM AgNO₃ solution to induce AgNPS biosynthesis. After the nanoparticles were obtained the characterization of the same by scanning electron microscopy (SEM) and by

spectrophotometry the surface plasmon band of the aqueous solutions of AgNPS was determined. The antifungal potential was tested against strains of *Candida krusei*, *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* and was carried out by the diffusion method. In all the processed *Aspergillus* strains the presence of AgNPS was evidenced by a color change of the solution inoculated with Ag and biomass in comparison with a control. Electron microscopy allowed to determine that the average particle size produced was about 55 nm and by spectometry the surface plasmon was observed between 400 and 450 nm. The highest production of nanoparticles was observed from the strains of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus* and to a lesser extent *A. flavus*. The antifungal effect of the most promising AgNPS was observed against the strains of *C. krusei* and *C. albicans*. Based on the data obtained we can confirm that all *Aspergillus* strains analyzed were able to synthesize AgNPS. Of the 3 species tested, *A. fumigatus* and *A. terreus* produced higher concentrations of nanoparticles. We consider that the antifungal effect observed mainly to *C. krusei* could be a promising alternative to the infections of this species intrinsically resistant to fluconazole.

Dicho trabajo fue premiado como mejor poster, a continuación, se presentan los certificados:



15th Infocus CURITIBA, BRAZIL
16-18 November 2017

Managing Fungal Infections in Latin America / Promoting Science and Innovation


CERTIFICATE


Certify that

**LUCIANA MARIA NOBLEGA; ANDRES HERNAN MORALES; MARIA SOFIA COLOMBRES; NATALIA MARQUEZ;
NADIA ORELLANA; CHRISTIAN ALVAREZ; CINTIA MARIANA ROMERO**

Attended the 15th INFOCUS - Managing Fungal Infections in Latin America / Promoting
Science and Innovation, held from November 16th - 18th, 2017 in Curitiba - Paraná -
Brazil, as authors of the Poster: BIOSYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES (AGNPS) FROM ASPERGILLUS SP.,
EVALUATION OF THE POTENTIAL ANTIFUNGAL EFFECT.

Curitiba, November 18th, 2017


Flavio Queiroz-Telles
President of INFOCUS 2017


Arnaldo Lopes Colombo MD
President of INFOCUS 2017



15th Infocus CURITIBA, BRAZIL
16-18 November 2017

Managing Fungal Infections in Latin America / Promoting Science and Innovation

CERTIFICATE

15° INFOCUS AWARD CERTIFICATE

This Certificate is presented to


**LUCIANA MARIA NOBLEGA; ANDRES HERNAN MORALES; MARIA SOFIA COLOMBRES; NATALIA MARQUEZ;
NADIA ORELLANA; CHRISTIAN ALVAREZ; CINTIA MARIANA ROMERO**

Attended the 15th INFOCUS - Managing Fungal Infections in Latin America / Promoting
Science and Innovation, held from November 16th - 18th, 2017
in Curitiba - Paraná - Brazil

As authors of the Poster: BIOSYNTHESIS OF SILVER NANOPARTICLES (AGNPS) FROM ASPERGILLUS SP.,
EVALUATION OF THE POTENTIAL ANTIFUNGAL EFFECT

AS FIRST BEST POSTER in the SESSION CLINICAL MICROBIOLOGY

Curitiba, November 18th, 2017


Flavio Queiroz-Telles
President of INFOCUS 2017


Arnaldo Lopes Colombo MD
President of INFOCUS 2017

Colaboración en el trabajo titulado como “**BIOSINTEIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTICULAS DE PLATA POR ACTINOBACTERIAS METALO-RESISTENTES**”. Presentado bajo la modalidad de Presentación oral en las **XXVI Jornadas de jóvenes investigadores AUGM** realizado en la Provincia de Mendoza realizadas el 17,18 y 19 de Octubre de 2018.

A continuación, se presenta el resumen del mismo.

BIOSINTEIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTICULAS DE PLATA POR ACTINOBACTERIAS METALO-RESISTENTES

Pereyra, Julián; Paterlini, Paula, Noblega, Luciana; Álvarez, Analía; Romero Cintia M. _
pereyra.julian.71@gmail.com; paula_paterlini@hotmail.com luciananoblega@gmail.com;
alvanalía@gmail.com; cinromero78@gmail.com

Facultad de Biquímica, Química y
farmaciaUniversidad Nacional de

Tucumán

Resumen

La nanobiosíntesis es una “tecnología verde” con numerosos beneficios por la que se obtienen NPS por procesos biológicos. Las AgNPS tienen una gran importancia debido a sus aplicaciones en medicina para el revelado de imágenes tumorales, liberación controlada de drogas, y fundamentalmente, excelentes propiedades antimicrobianas. El objetivo fue evaluar la capacidad de biosíntesis de AgNPS por *Streptomyces* M7 y caracterizar las mismas y determinar su efecto antimicrobiano.

La actinobacteria metalo-resistente *Streptomyces* M7 fue cultivada durante 72 hs en caldo Tripteína-Soja. Las células separadas del sobrenadante por centrifugación, fueron inoculadas en agua tridestilada (100gL^{-1}) incubadas con agitación 72 hs. Mediante centrifugación se recuperó el sobrenadante (fuente de biomoléculas reductoras) con el que se preparó una solución de AgNO_3 de 0,5 y 1 mM. Las soluciones se incubaron con agitación, 72 hs y se tomaron muestras cada 24 hs, realizando controles apropiados. Se evaluó la síntesis de AgNPS por medición de absorbancia (espectrofotómetro UV-visible, 200-800 nm) y por microscopía electrónica de barrido (MEB). La composición elemental de las AgNPS se evaluó mediante Espectroscopia de Energía Dispersada (EDS).

La muestra tomada a las 72 hs, con una concentración 1 mM AgNO_3 presentó el pico más

alto de absorbancia (DO: 1,48) en comparación a las demás muestras. Esta absorbancia coincide con la reportada para AgNPS. Las imágenes de MEB revelaron la presencia de NPS agregadas, de tamaño heterogéneo entre 17,71 nm (min) y 94,44 nm (max) en el caso de AgNPS. El espectro EDS presentó una fuerte señal para Ag y otros picos más débiles correspondientes a otros elementos. Además, se evaluó la capacidad antimicrobiana de las AgNPS frente a *cándida*.

Palabras clave: Nanotecnología, Nanopartículas, Síntesis biogénica.

Introducción

La nanotecnología es un campo emergente de las ciencias que incluye la síntesis y desarrollo de nanomateriales, cuyo componente fundamental son las NPS (Golinska, et al., 2016). Se utilizan una gran variedad de métodos para la síntesis de NPS con propiedades físico-químicas tales, que pueden ser empleadas en vastos sectores productivos para la obtención de medicamentos, cosméticos, encapsulación de fármacos, biosensores, bioinsecticidas, bioinoculantes, entre otras (Siddiqi, et al., 2016). Las inusuales propiedades de las NPS, se deben fundamentalmente a su pequeño tamaño (<100 nm) por lo que poseen una relación superficie/ volumen mayor que las partículas de su material precursor (Anasame *et al.* 2015).

De acuerdo con su naturaleza química, las NPS pueden ser orgánicas o inorgánicas (Siddiqi, *et al.*, 2016) entre estas últimas, se destaca la importancia de las AgNPS debido a sus aplicaciones en medicina para el revelado de imágenes tumorales, liberación controlada de drogas, y fundamentalmente, excelentes propiedades antimicrobianas, lo que despierta grandes expectativas en la búsqueda de nuevas fuentes de AgNPS debido al incremento drástico de la resistencia microbiana a antibióticos informada por la Organización Mundial de la Salud, recientemente (WHO, 2015).

Los métodos químicos convencionales para la síntesis de NPS presentan ciertas limitaciones ya que se usan tóxicos y altos niveles de energía lo que encarece su producción. Por su parte, la nanobio síntesis es una “tecnología verde” por la que se obtienen NPS mediante procesos biológicos tales como la reducción de una sal metálica por acción de biomoléculas. En este contexto, biomoléculas (en su gran mayoría, proteínas) provenientes de plantas, algas, bacterias, hongos y virus, pueden actuar como agentes reductores y/o estabilizadores para la formación de NPS (Siddiqi, *et al.*, 2016). Las NPS desarrolladas por síntesis biogénica presentan ventajas sobre las producidas por síntesis química debido a la simplicidad de los métodos de producción ya que no requiere altas temperaturas o presión. Además, se trata de procesos de bajo costo, de relativamente fácil escalamiento y en su mayoría inocuos (Borase, *et al.*, 2014).

Las NPS biogénicas son sintetizadas por procesos simples de reducciones metálicas intra o extracelulares propias de mecanismos de detoxificación (Siddiqi y Husein, 2016; Dahoumane, *et al.*, 2016). Las enzimas microbianas pueden seleccionar el ión metálico de la solución precursora y acumularlo en forma elemental, o pueden reducirlo sintetizando NPS. Estas pueden

asociarse con proteínas lo que favorece su estabilidad, previene su agregación y le confiere a las NPS propiedades bioquímicas excepcionales (Golinska, *et al.*, 2016).

Los extractos libres de células/sobrenadantes de cultivo microbiano se utilizan como reductores (Gade, *et al.*, 2008; Bawaskar, *et al.*, 2010) para la producción de NPS, siendo el método extracelular el más popular, debido a que facilita el proceso de *downstream* de recuperación de las NPS. Las actinobacterias constituyen uno de los principales y más diversos phyla del Dominio Bacteria. Los miembros del grupo se destacan por sus propiedades fisiológicas y metabólicas (Goodfellow, *et al.*, 2012). De hecho, el género *Streptomyces* es considerado la principal fuente microbiana de biomoléculas con aplicaciones biotecnológicas incluyendo enzimas extracelulares, antibióticos, NPS, agentes antitumorales, inhibidores enzimáticos, inmunosupresores, fitotoxinas, biopesticidas, biosurfactantes, probióticos, entre otros (Alvarez, *et al.*, 2017). Con relación a la síntesis de NPs el género *Streptomyces* sp ha demostrado presentar capacidad de síntesis de NPS. Alani, *et al.*, (2012) demostrada en una cepa de *Streptomyces hygroscopicus* (Sadhashivam *et al.* 2010) y de AuNPs por una cepa de *Thermomonospora* sp.

(Hulkoti, *et al.*, 2014). A pesar de lo mencionado, son pocos los trabajos que exploten el potencial de las actinobacterias como productoras de NPS metálicas (Alani, *et al.*, 2012; Khot, *et al.*, 2012).

Objetivos

El objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de biosíntesis de AgNPS por la cepa *Streptomyces* M7 y analizar propiedades físico-químicas y biológicas de las NPS obtenidas.

Materiales y Métodos

1- Evaluación de la capacidad de biosíntesis AgNPS por actinobacterias

Se emplearon las cepas de actinobacterias pertenecientes a los géneos *Streptomyces* sp. y disponibles en el cepario del laboratorio de "Biotecnología de Actinobacterias" (PROIMI). La obtención NPS se evaluó siguiendo el protocolo descrito por Alani *et al.* (2012), con modificaciones. Se cultivaron los microorganismos en medio TSB (Alvarez, *et al.*, 2012), con agitación, durante 72 hs. La biomasa desarrollada fue recuperada mediante centrifugado y luego lavada con agua tridestilada estéril. Posteriormente se suspendieron 10 g de biomasa en 100 mL de agua tridestilada estéril, y se incubó durante 72 hs con agitación.

Transcurrido el tiempo mencionado, la suspensión fue centrifugada para

separar la biomasa del sobrenadante.

los sobrenadantes se incubaron con al menos dos concentraciones (1 y 0,5) de AgNO_3 en ensayos independientes. Los frascos se incubaron en la oscuridad, con agitación y se tomaron muestras cada 24 hs durante 72 hs. Se emplearon como controles el sobrenadante proveniente del cultivo de la biomasa sin AgNO_3 y agua tridestilada con AgNO_3 .

La síntesis de NPS fue evaluada mediante los siguientes parámetros: **a)** Aparición de un precipitado en las muestras: mediante centrifugaciones fraccionadas usando ultracentrífuga. La aparición de un precipitado en cada fracción fue interpretada como la síntesis de NPS. Los precipitados (NPS) fueron resuspendidos en agua tridestilada estéril y conservados a $-4\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el momento de estudio. **b)** Medición de absorbancia por UV-vis (200- 800 nm).

2- Caracterización físico-química de las NPs obtenidas.

La forma, tamaño y estructura de las NPS obtenidas fueron estudiadas mediante Microscopía Electrónica de barrido (SEM), Espectroscopia de Energía Dispersada (EDS) y Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). SEM y EDS se realizaron en CIME-CONICET. Los espectros FTIR fueron obtenidos en un equipo Perkin Elmer, (EUA). Previo al análisis, las nanopartículas de plata fueron separadas

por centrifugación a 12,000 rpm y

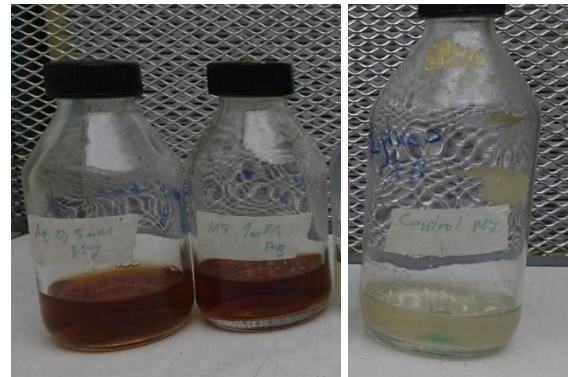


Figura 1. Producción de AgNPs por *Streptomyces* evidenciada por el cambio de color. A) Muestras de AgNPs 0,5 y 1 mM. B) Control: Sobrenadante sin AgNO_3 .

secadas.

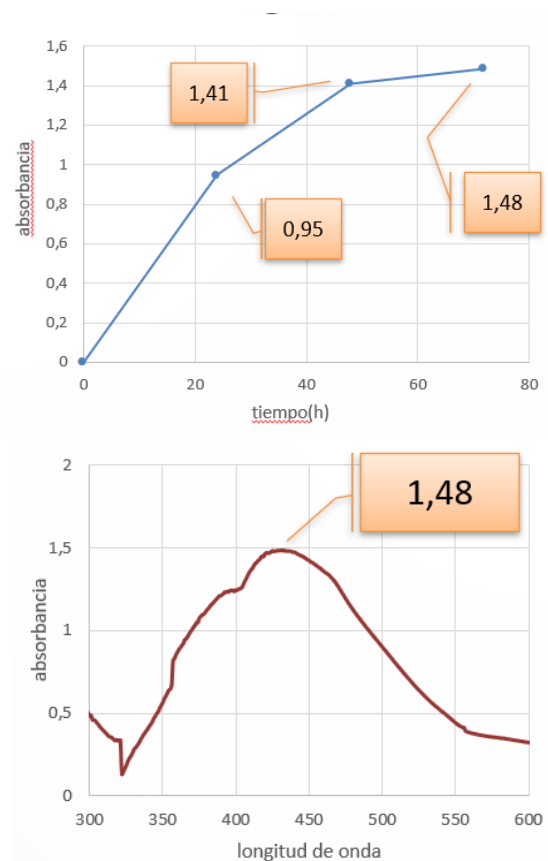


Figura 2. A Producción de AgNPs en función del tiempo. B Espectro UV-visible de muestra AgNPs de 72h.

3- Evaluación del efecto antimicrobiano de las AgNPS

Se realizó la evaluación de la capacidad

antimicrobiana de AgNPs sobre un cultivo de *Candida parapsilosis*. Para ello se utilizó el método de difusión en agar. Las AgNPS fueron evaluadas en una concentración de 0,1 mg/mL.

Resultados y Discusión

1-Evaluación de la capacidad de biosíntesis AgNPS por actinobacterias

La biosíntesis de AgNPS se evidenció por el cambio de color de transparente a pardo (**Fig. 1**) La producción de las NPS fue confirmada mediante espectroscopía UV visible. La muestras presentaron un aumento en las absorbancia entre 400 y 450 nm (**Fig. 2a**). La muestra de AgNPS tomada a las 72 hs, obtenida a partir de una concentración 1 mM de AgNO_3 , presentó el pico más alto de Absorbancia_{433 nm} de 1,48 **Fig. 2b**) en comparación a las demás muestras. Resultados similares fueron reportado por Abdel-Hadi, et al. (2014) para AgNPS sintetizadas a partir del hongo *Aspergillus terreus*.

2- Caracterización físico-química de las NPs obtenidas

Las imágenes de SEM revelaron la presencia de NPS agregadas de forma y tamaño heterogéneo entre 17,71 y 94,44 nm (**Fig. 3**). El espectro EDS presentó una fuerte señal para Ag otros picos más débiles correspondientes a otros elementos en las muestras también

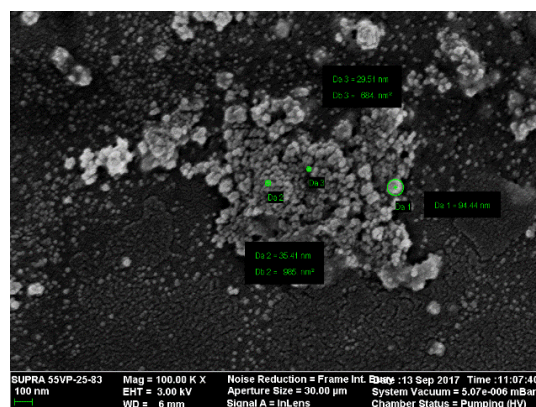


Figura 3. Fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de las AgNPS

fueron detectados (**Fig. 4**). El espectro

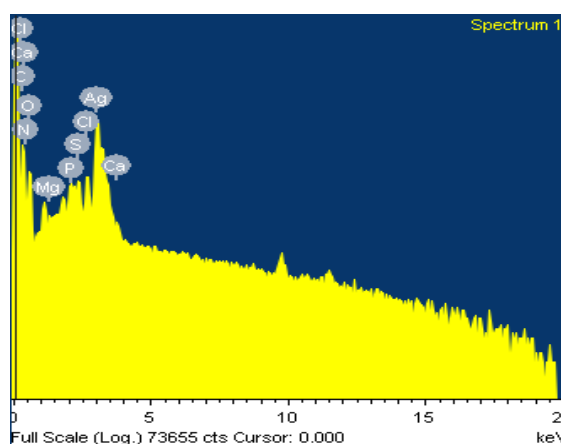


Figura 4. Análisis EDS de las AgNPS.

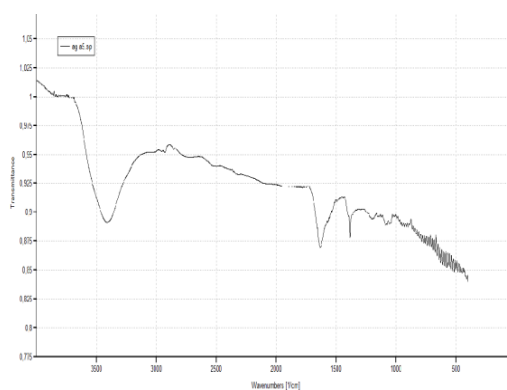


Figura 5. FTIR de las AgNPS.

FTIR presentó picos a 1420 y 3400 cm^{-1} previamente reportado por otros autores para AgNPS (Aguilar Méndez, et al., 2010; V.Gopinath, et al., 2012). Se observó un pico cercano a 1650 cm^{-1}

(Fig.5) Una señal de absorción en esta región puede estar asociada a la presencia de grupos Amida I presente en proteínas. Se sabe las NPS sintetizadas por biogénesis suelen estar asociadas a proteínas producidas en este caso por el mismo microorganismo. Esto podría otorgarle a las NPS propiedades biotecnológicas distintas a las obtenidas por síntesis química.

3- Evaluación del efecto antimicrobiano de las AgNPS

La Fig. 5 muestra el efecto de la incorporación de nanopartículas de plata en el crecimiento de *Candida parasilopsis*. Se observó un halo de inhibición de 36 mm de diámetro. El efecto antimicrobiano de las AgNPS ha sido reportado por diferentes autores, frente a hongos filamentosos, levaduras y bacterias (Aguilar Méndez et al. 2010; Saxena, et al. 2016).

Conclusiones

Se sintetizaron AgNPS a partir de AgNO_3 mediante una tecnología económica y ambientalmente segura a utilizando las biomoléculas producidas por *Streptomyces* M7. Las nanopartículas mostraron importantes propiedades físico-químicas y fundamentalmente mostró actividad antifúngica frente a cepas patógenas del género *Candida*. Estas nanopartículas tienen potenciales

propiedades para su aplicación biotecnológica.

Bibliografía

- A. Alvarez, JM. Saez, J. Dávila Costa, VL. Colín, MS. Fuentes(2016). Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals Chemosphere Amsterdam, 166, 41–62.
- A. Álvarez, ML. Yanez, CS. Benimeli, MJ. Amoroso. (2012) Maize plants (*Zea mays*) root exudates enhance lindane removal by native *Streptomyces* strains Int biodeterioration & biodegradation, 66, 14–18.
- A. Alvarez, SA. Catalano, MJ. Amoroso. (2013). Heavy metal resistant strains are widespread along *Streptomyces* phylogeny, Mol. Phylogenet. Evol, 66,1083–1088.
- Aguilar Méndez M.A., San Martín Martínez, E., Ortega Arroyoa, L., Cobián Portillo, G. (2010). EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE Ahmed Mustafa Abdel-Hadi-, Mohamed Fadl Awad, Nageh Fathy Abo-Dahab and Marwa Farok ElKady. (2014). Extracellular Synthesis of Silver Nanoparticles by AK. Gade, SR. Bonde, AP. Ingle, PD. Marcato, N. Durán and MK. Rai.(2008). Exploitation of *Aspergillus niger* for Synthesis of Silver Nanoparticles, J

- Biobased Mater Bioenergy, 2, 243–245.
- Aspergillus terreus*: Biosynthesis, Characterization and Biological Activity F.Alani, MY. Murray, A. William.(2012). Biosynthesis of silver nanoparticles by a new strain of *Streptomyces* sp. compared with *Aspergillus fumigatus*, World J Microbiol Biotechnol, 28, 1081–1086.
- Gopinath, V., MubarakAli, D., Priyadarshini, S., MeeraPriyadharsshini, N., Thajuddin, N., Velusamy, P. (2012). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: A novel biological approach. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 96 (1), 69-74.
- HP. Borase, BK. Salunke, RB. Salunkhe, CD. Patil, JE. Hallsworth, BS. Kim, SV. Patil. (2014). Plant Extract: A Promising Biomatrix for Ecofriendly, Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles Appl Biochem Biotech, 173(1), 1–29.
- Juhi Saxena, Prashant Kumar Sharma, Madan Mohan Sharma and Abhijeet Singh. (2016). Process optimization for green synthesis of silver nanoparticles by *Sclerotinia sclerotiorum* MTCC 8785 and evaluation of its antibacterial Properties. Saxena *et al.* SpringerPlus. 5:861.
- KS. Siddiqi and A. Husen. 2016. Fabrication of Metal Nanoparticles from Fungi and Metal Salts: Scope and Application. Nano Res Lett, 11, 98.
- LR. Khot, S. Sankaran, J. MariMaja, R. Ehsani(2012). Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A review, EW. Schuster. Crop Prot, 35, 64–70.
- M. Bawaskar, S. Gaikwad, A. Ingle, D. Rathod, A. Gade, N. Duran, PD. Marcato and M. Rai.(2010). A New Report on Mycosynthesis of Silver Nanoparticles by *Fusarium culmorum*, Curr Nanosci, 6,376–380.
- N. Anasane, P. Golinska, M. Wypij, D. Rathod, H. Dahm and M. Rai (2016), Acidophilic actinobacteria synthesised silver nanoparticles showed remarkable activity against fungi-causing superficial mycoses in humans. Mycoses, 59, 157– 166.
- N. I. Hulkoti and T. C. Taranath.(2014) Biosynthesis of nanoparticles using microbes- a review, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 121, 474-483. NANOPARTICULAS DE PLATA. Memorias del XXXI Encuentro Nacional de la AMIDIQ. PM. Mishra, SK. Sahoo, GK. Naik, K. Parida. (2015) Biomimetic synthesis, characterization and mechanism of formation of stable silver nanoparticles using *Averrhoa carambola* L. leaf extract Mater Lett, 160, 566-71. S. Sadhasivam, P. Shanmugam, K. Yun.(2010). Biosynthesis of silver nanoparticle by *Streptomyces hygroscopicus* and antimicrobial activity against medically important pathogenic microorganisms,

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 81, 358–362.

SA. Dahoumane, C. Yéprémian, C. Djédiat, A. Couté, F. Fiévet, T. Coradin, R. Brayne. (2016). Improvement of kinetics, yield, and colloidal stability of biogenic gold nanoparticles using living cells of *Euglena gracilis* microalga, *J Nanopart Res*, 18, 79.

W. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer, HJ. Busse, (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*

World Health Statistic. World Health Organization (WHO), 2015. ISBN 978 92 4.