

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICÓTICA DE *Aspergillus flavus* A
NANOPARTÍCULAS DE PLATA OBTENIDAS POR SÍNTESIS VERDE



LAURA JULIANA CORTES PIRAZAN

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ D.C.

2018

ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICOTICA DE *Aspergillus flavus* A
NANOPARTÍCULAS DE PLATA OBTENIDAS POR SÍNTESIS VERDE



LAURA JULIANA CORTES PIRAZAN

Proyecto de grado requisito para optar por el título de Bacteriólogo y Laboratorista
clínico

Asesor

Sonia Marcela Rosas Arango

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ D.C.
2018

Dedicatoria

La realización de este estudio va dedicado como primera medida a Dios, por llenarme de fuerza, sabiduría y confianza, por sus bendiciones diarias y en especial porque durante este tiempo puso en mi camino a personas maravillosas que me ayudaron con este proyecto,

Dedico este trabajo a mi familia de sangre y adoptiva por incentivar me a realizarme como profesional, a través de sus consejos, lecciones y apoyo emocional, motivándome cada día a alcanzar mis sueños y metas propuestas.

Agradecimientos

Agradezco primeramente a mi asesora de tesis Sonia Rosas, por ser una profesional comprometida con su trabajo, por cada uno de sus conocimientos, sus experiencias y todo su valioso tiempo dedicado y a mi compañera Vivian Lievano por su tiempo, dedicación y esfuerzo para culminar este proyecto.

A la Universidad Colegio mayor de Cundinamarca y a la profesora Liliana Caycedo, por proporcionarnos los materiales y equipos de trabajo necesarios.

A las doctoras Diana Moreno, Diana Neira por su apoyo, cada uno de sus conocimientos, experiencias y todo el tiempo dedicado, para culminar mi trabajo de grado de forma exitosa.

A Wilson por su amor, apoyo incondicional, consejos y cada una de las experiencias vividas, las cuales me han ayudado a crecer en todos los aspectos de la vida.

A mis amigas Carolina, Liza, Erika, Adriana y compañeras de práctica especializada Lorena y Camila por sus preocupaciones, consejos y apoyo emocional.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVO.....	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
ANTECEDENTES	16
1. MARCO TEORICO.....	19
1.1. GENERO <i>Aspergillus</i>	19
1.1.2. Clasificación taxonómica.....	20
1.1.3. Características macro y microscópicas.....	21
1.1.4. Micotoxinas.....	22
1.1.5. Mecanismos de resistencia	24
1.1.5.1. Mutaciones Cyp51A.....	24
1.1.5.2. Mutaciones independientes de Cyp51A.....	25
1.1.6. <i>Aspergillus flavus</i>	25
1.1.6.1. Epidemiología.....	27
1.1.6.2. Cultivo en Agar.....	27
1.1.6.3. Aflatoxinas.....	29
1.2. MICOSIS SUBCUTANEAS	30
1.3. ASPERGILOSIS.....	30
1.3.1. Factores de Riesgo	30
1.3.2. Patogenia.....	31
1.3.3. Manifestaciones clínicas.....	31

1.3.3.1 Aspergilosis broncopulmonar alérgica.....	32
1.3.3.2. Aspergilosis pulmonar crónica.....	32
1.3.3.3. Aspergilosis invasora (AI).....	32
1.3.3.4.1. Traqueobronquitis.....	33
1.3.3.4.2. Aspergilosis invasiva extrapulmonar.	33
1.3.4. Diagnostico.....	34
1.3.5. Tratamiento.	35
1.4. NANOPARTÍCULAS DE PLATA (NPAg).....	36
1.4.1. Generalidades.	36
1.4.2. Propiedades.	37
1.4.3 Síntesis de Nanopartículas de Plata.	37
1.4.3.1. Síntesis Química.	39
1.4.3.2. Síntesis Física.	40
1.4.3.3. Biosíntesis de Nanopartículas de Plata o Síntesis Verde.....	40
1.4.4. Microscopio de fuerza atómica (AFM).....	42
1.5. <i>Moringa oleífera</i>	44
1.5.1. Generalidades.	44
1.5.2. Partes y sus usos.	45
1.5.2.1. Hojas de <i>Moringa oleífera</i>	46
1.5.3. Antioxidantes de <i>Moringa oleífera</i>	48
2. METODOLOGÍA.....	50
2.1. Tipo de investigación.....	50
2.2. Variables	50
2.3. Muestra	50
2.4. Técnicas y procedimientos	51
2.4.1. Recolección de <i>Moringa oleífera</i>	51

2.4.2. Medios de cultivo.....	51
2.4.3. Generación de extractos	51
2.4.3.1. Extracto acuoso de la hoja de <i>Moringa oleífera</i>	51
2.4.3.2. Extracto hidroalcohólico de la hoja de <i>Moringa oleífera</i>	52
2.4.4. Síntesis verde de Nanopartículas de Ag.	52
2.4.5. Valoración del espectro de absorción para el fenómeno de resonancia de plasmones.....	53
2.4.6. Caracterización de las nanopartículas por medio del AFM (Microscopio de Fuerza Atómica).....	53
2.4.7. Prueba de sensibilidad a las nanopartículas de Ag y extractos acuoso e hidroalcohólico de <i>Moringa oleífera</i>	54
3. RESULTADOS.....	57
3.1. Valoración del espectro de absorción para el fenómeno de resonancia de plasmones.....	57
3.2. Caracterización de Nanopartículas de Ag por síntesis verde en el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) Nano Surf EyeScan 2.	58
3.3. Prueba de sensibilidad antimicótica de nanopartículas de Ag por síntesis verde y extractos acuoso e hidroalcohólico de <i>Moringa oleífera</i> sobre la cepa de <i>Aspergillus flavus</i>	61
3.3.1. Tipo de efecto antifúngico en la cepa de <i>Aspergillus flavus</i> de nanopartículas de Ag por síntesis verde.....	63
3.3.2. Análisis estadístico	64
DISCUSIÓN	68
CONCLUSIONES.....	73
REFERENCIAS.....	74

RESUMEN

Aspergillus flavus como otras especies del género tiene una fácil diseminación, ya que las condiciones ambientales tienen que ser extremas para inhibir su crecimiento. No se le ha descrito como un patógeno para las plantas, sin embargo, si causa problemas en las cosechas y almacenamiento, esto se le atribuye a la capacidad de desarrollar metabolitos secundarios como las aflatoxinas características de la especie. En la medicina se le reconoce por ser el segundo agente causal de la Aspergilosis invasiva y otros problemas respiratorios, adicionalmente, se han descrito diferentes mecanismos de resistencia a los antifúngicos comerciales, por lo que el uso de la nanotecnología como una alternativa de tratamiento se identifica por el efecto antimicrobiano de las nanopartículas de plata, por tanto, este estudio se centra en identificar la acción antifúngica de las nanopartículas de plata por síntesis verde, obtenidas del extracto acuoso de las hojas de *Moringa oleífera* en una cepa de *Aspergillus flavus*. El estudio se llevó a cabo caracterizando las nanopartículas de Ag por Microscopia de Fuerza Atómica (AFM), revelando nanopartículas esféricas de 50 a 70nm y un efecto antifúngico en la inhibición de crecimiento del hongo sobre un agar PDA junto con nanopartículas de plata en una concentración de 100 y 50%, durante 9 días. Por último se comparó la efectividad de las nanopartículas de Ag obtenidas por síntesis verde frente al extracto acuoso e hidroalcohólico de *Moringa oleífera*. En conclusión el ensayo demostró una actividad fungistática frente a la cepa de *Aspergillus flavus*.

Palabras clave: Nanopartículas de síntesis de verde, *Aspergillus flavus*, Antifúngico, *Moringa oleífera*

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades producidas por hongos o también llamadas micosis tienen una distribución mundial debido a que los hongos se reproducen por esporas que fácilmente se distribuyen con el aire y su crecimiento se da gracias a las condiciones ambientales naturales de la tierra, así pues el contacto directo con los seres vivos es constante. Aunque los hongos no causan brotes o pandemias, si causan fuertes molestias afectando la calidad de vida del ser vivo, la incidencia de infecciones por hongos ha aumentado significativamente debido al crecimiento en el número de pacientes con comorbilidades, como: la diabetes, enfermedades cardiacas, cáncer, VIH, la obesidad, entre otras; del mismo modo, las infecciones y tratamientos que involucran el deterioro del sistema inmunológico.

Existen diferentes géneros de hongos causales de enfermedades oportunistas, los cuales toman importancia dependiendo su mecanismo de resistencia y fácil diseminación. El género *Aspergillus* se distingue por ser extenso, tener una distribución mundial, un ciclo biológico simple, habita en el agua, el suelo, el aire, el material en descomposición y otras localizaciones, soporta un amplio rango de temperatura (12°C a los 57°C). Incluye más de 250 especies y la mayoría de las infecciones invasivas son ocasionadas por *A. fumigatus* (80 %); el segundo agente en frecuencia es *A. flavus* (15-20 %) y, con menor frecuencia, se observan infecciones por *A. niger*, *A. terreus* y *A. nidulans*^(1,2), se les atribuyen infecciones oportunistas en el hombre y son responsables de algunos problemas de contaminación en productos vegetales.

Existe actualmente un número razonable de agentes antifúngicos en el mercado, junto con algunos derivados de estos fármacos que se han vuelto menos tóxicos, con potencias mejoradas y una farmacocinética mejorada. Sin embargo, sus blancos celulares son limitados debido a la similitud entre hongos y huéspedes⁽³⁾. La literatura describe los factores que favorecen el desarrollo de mecanismos de

resistencia a los antifúngicos, como el uso indiscriminado, el tiempo de tratamiento, la dosificación inadecuada, el acceso de antifúngicos y antibióticos y la existencia de cepas con formación de biofilm⁽⁴⁾. Adicionalmente, el desarrollo de nuevos medicamentos que se pueden aplicar de forma segura en una variedad de pacientes con varias condiciones, ha contribuido a la expansión del uso de antifúngicos para la profilaxis y la terapia empírica. Recientemente se describe que el uso de los fungicidas agrícolas estimula la resistencia adquirida en las especies de *Aspergillus*, y estas cepas resistentes se están extendiendo globalmente⁽⁵⁾. De acuerdo a lo anterior, la nanotecnología gracias a su uso multidisciplinario para el control de microorganismos podría utilizarse como una alternativa al tratamiento antifúngico ya que cumple con las condiciones de baja toxicidad para las células humanas y se ha demostrado en ensayos in vitro la susceptibilidad antifúngica de nanopartículas de plata⁽⁶⁾.

Aspergillus flavus como otras especies del género tiene una fácil diseminación, ya que las condiciones ambientales tienen que ser extremas para inhibir su crecimiento. No se le ha descrito como un patógeno para las plantas, sin embargo, si causa problemas en las cosechas y almacenamiento, gracias a su capacidad de desarrollar metabolitos secundarios como las aflatoxinas, las cuales son características de la especie. Estas aflatoxinas junto con los factores de virulencia de este hongo oportunista causa enfermedades en los seres humanos tanto inmunocompetentes como en los inmunodeprimidos. Recientemente, ha sido descrito como la segunda causa de aspergilosis en pacientes inmunodeprimidos⁽¹⁾.

Se ha evidenciado que las nanopartículas metálicas tienen un efecto antimicrobiano, especialmente las nanopartículas de plata, pues sus propiedades se remontan a la antigüedad donde la plata era utilizada para el tratamiento de heridas, quemaduras y aguas⁽⁸⁾. La producción de nanopartículas de plata, se basa en la reducción de la plata Ag⁺ a Ag⁰, mediante el uso de rutas químicas, físicas, fotoquímicas y biológicas, esta última metodología consiste en utilizar

microorganismos y extractos de plantas (síntesis verde) como agentes reductores⁽⁹⁾.

La síntesis verde de nanopartículas de plata ha demostrado a lo largo de las investigaciones ser un método amigable con el medio ambiente, de bajo costo y de fácil acceso con respecto a las otras metodologías, por lo que, en el presente proyecto se optó por utilizar *Moringa oleífera*, porque se presenta como un árbol con un alto potencial biotecnológico debido a su composición química, los estudios de Bonal et al. y Garcia, ensayos realizados en los últimos 5 años demuestran sus aplicaciones, que van desde su uso como biofortificante, estudios contra la desnutrición y su aplicación como factor antifúngico y antimicrobiano. La naturaleza del Microscopio de fuerza Atómica (AFM) en la que una sonda entra en contacto físico con la muestra, hace de este instrumento una herramienta muy poderosa, puesto que además de ser capaz de realizar imágenes de la muestra, es capaz de medir fuerzas de interacción. Esta última característica es la que lo hace tan particular y diferente cuando se le compara con otras técnicas de obtención de imágenes a escala manométrica ($1 \times 10^9 \text{m}$) incluyendo su predecesor, el microscopio de efecto túnel ⁽¹²⁾.

El propósito del presente estudio fue determinar la sensibilidad antimicótica de nanopartículas de Ag obtenidas por síntesis verde a partir de *Moringa oleífera* sobre una cepa de *Aspergillus flavus*, para ello se decidió caracterizar las nanopartículas de plata obtenidas del extracto acuoso de *Moringa oleífera* por medio del microscopio de fuerza atómica, por consiguiente se realizó el ensayo de sensibilidad antimicótica por la metodología propuesta por Rodríguez Pedroso et al. Por último se comparó la efectividad de las nanopartículas de Ag obtenidas por síntesis verde frente al extracto acuoso e hidroalcohólico de *Moringa oleífera* con el fin de evidenciar el efecto fungicida o fungistático que describen las recientes investigaciones.

La síntesis verde de nanopartículas de plata a partir de *Moringa oleífera* se demostró en el cambio de color de la solución final, esto sucede por el fenómeno

de resonancia de plasmones. La caracterización de nanopartículas de plata se logró gracias a la tecnología del microscopio de fuerza atómica por la cual, se obtuvieron nanopartículas de plata esféricas de tamaño homogéneo y con una buena dispersión. Se evidenció que las nanopartículas de plata a una concentración de 100% y 50% tienen un efecto fungistático sobre la cepa de *Aspergillus flavus*, debido a que después de 9 días de inoculación no se evidenció crecimiento, sin embargo pasado el tiempo de incubación en la prueba fungicida se observó crecimiento a los 3 días de incubación. En cuanto al agar inoculado con 25% de nanopartículas de plata el crecimiento del hongo se vio afectado, ya que solo se obtuvo crecimiento a los 5 días de incubación de colonias amarillas, pequeñas de aspecto aterciopelado características de un cultivo joven. El extracto acuoso y el extracto hidroalcohólico de *Moringa oleífera* no revelaron un efecto tóxico sobre la cepa de *Aspergillus flavus* pues se observó crecimiento de colonias verdes, amplias y de aspecto algodonoso a los 3 días de incubación.

Las nanopartículas de plata por síntesis verde demostraron su efecto fungistático sobre uno de los mohos oportunistas causante de enfermedades graves en los humanos, por lo que podría utilizarse como un coadyuvante para la terapia antifúngica. Adicionalmente, se evidencia que la cantidad de nanopartículas de plata en solución afecta directamente el resultado antimicrobiano. Este estudio incentiva el desarrollo de diversas metodologías que demuestren la capacidad antifúngica de las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde, no obstante aporta conocimientos sobre la verdadera capacidad antifúngica que se describe en la literatura por parte de *Moringa oleífera*.

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Determinar la sensibilidad antimicótica de nanopartículas de Ag obtenidas por síntesis verde a partir de *Moringa oleífera* sobre una cepa de *Aspergillus flavus*, proveniente de la colección del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar las nanopartículas de Ag obtenidas por síntesis verde a partir del extracto acuoso de *Moringa oleífera* por AFM.

- Evaluar la sensibilidad antimicótica de las nanopartículas de Ag en la cepa de *Aspergillus flavus*.

- Comparar la efectividad de las nanopartículas de Ag obtenidas por síntesis verde frente al extracto acuoso e hidroalcohólico de *Moringa oleífera* en la cepa de *Aspergillus flavus*.

ANTECEDENTES

Prasad y Elumalai en el 2011 en India, realizan el primer estudio de biosíntesis de nanopartículas de plata usando extracto de hojas de *Moringa oleífera*, justificando que su uso se debe a los componentes nutricionales y medicinales que se describen en la medicina tradicional de la India. El extracto se obtuvo de hojas secas con agua desionizada que se hirvió durante 20 min, la reducción del ion Ag⁺ se logró mezclando 10 ml de extracto de hojas con 90 ml de una solución acuosa 1mM de AgNO₃ y se calentó a 60 - 80°C durante 20 min.

La síntesis de nanopartículas se observó con el cambio de color de la solución, partiendo de un amarillo a un marrón oscuro y se comprobó con el espectro de luz ultravioleta, el cual tuvo un pico de absorbancia a 430-440nm y el ensanchamiento del pico indicó que las partículas se polidispersaron. La caracterización de las nanopartículas de plata se ejecutó con la tecnología de microscopía electrónica de transmisión, la imagen se forma a partir de la interacción de los electrones transmitidos a través de la muestra, después se amplió y se centró en un dispositivo de formación de imágenes a partir de las cuales se pudo concluir el tamaño promedio de las nanopartículas de Ag fue de aproximadamente 57nm y de forma esférica ⁽¹³⁾.

Ayanbimpe y colaboradores en Jos, Nigeria 2009, utilizaron un extracto etanólico de corteza y de hojas de *Jatropha curcas* y *Moringa oleífera* en organismos como *Trichophyton soudanense*, *T. verrucosum*, *T. tonsurans*, *Cladosporium sp.*, *Microsporium ferrugineum*, *Candida albicans*, *Aspergillus terreus*, *A. niger* y *Penicillium expansum* los cuales fueron aislados clínicos y contaminantes obtenidos del Laboratorio de Micología, mediante la metodología de combinar concentraciones 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 mg/ml⁻¹ del extracto junto con Agar Sabouraud, se observó inhibición de crecimiento durante 3 semanas, los resultados concluyeron que extractos de la corteza de ambas plantas no tuvieron

efecto inhibitorio sobre los hongos y para los extractos de hojas de ambas plantas en la mayor concentración hubo un crecimiento pobre, sin esporulación. Sin embargo, los extractos de hoja de *Jatropha* exhibieron una actividad antifúngica más fuerte pues la inhibición por completo del crecimiento fúngico se dio a la concentración de $0,75 \text{ mg/ml}^{-1}$, mientras que la concentración que logro la inhibición por completo de los contaminantes en los extractos de *Moringa* fue de $1,0 \text{ mg/ml}^{-1}$ (14).

Sánchez García en 2002 en su trabajo de investigación utilizó los extractos acuosos y alcohólicos de las plantas *Agave asperrima* y *Agave striata*, para evaluar su efecto a diferentes concentraciones (25, 50 y 75%) obteniendo la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la producción de aflatoxinas y ácido ciclopiazónico, en las cepas 1273, 1299 y 1059 de *Aspergillus flavus* y 148 y Su-I de *Aspergillus parasitic*. Los resultados in vitro obtenidos en medio líquido (A & M) indicaron que el extracto metanólico de la inflorescencia de *A. asperrima* presentó mayor efecto inhibitorio del crecimiento de los hongos analizados, con una CMI de 0.5 a 2.0 mg/ml en las cepas probadas. En el caso de la inflorescencia de *A. striata*, se presentaron valores de CMI 1.0 a 2.0 mg/ml ligeramente mayores al extracto de *A. asperrima*. Cuando analizaron los extractos de los tallos (escapos) de ambas especies de *Agave* encontramos que las CMI fueron de 15 a 30 mg/ml por lo tanto mostraron una menor actividad inhibitoria (15).

En otro ensayo titulado Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium sp*, Moreno y colaboradores demostraron que la actividad antifungica de los extractos se reflejó por la formación de un halo de inhibición mediante la técnica del pozo en agar con la adición de 50µL del extracto en concentraciones de 100, 200, 400 y 600 mg/ml y la técnica de dilución de extracto en agar, consistió en hacer una mezcla homogénea entre los extractos en concentración de 100 mg/ml y el agar papa dextrosa (PDA) identificando el efecto antifúngico por el crecimiento radial del hongo. Los resultados arrojados por ambas técnicas permitieron detectar

los efectos antifúngicos que presentaron los extractos; destacando especialmente los etanólicos y metanólicos, ya que con ellos se lograron inhibiciones de hasta el 100% en ambas cepas, mostrando concentraciones mínimas inhibitorias que van de 3 a 7 mg/ml ⁽¹⁶⁾.

Raut et al. en 2014 identificaron un método "rápido y verde" para la síntesis de nanopartículas de plata (SNP) utilizando una importante planta medicinal *Withania somnifera*. La actividad antifúngica de las cepas *Candida albicans* (NCIM 3110) *Aspergillus niger* (NCIM 1207) y *Aspergillus flavus*, se evaluó mediante la técnica de difusión de disco, sumergiendo los discos estériles de 6 mm de diámetro en NPAg, extracto de planta y solución de nitrato de plata (1mM). Después de la previa siembra masiva en agar PDA, a las 72 horas de incubación se tomaron medias de inhibición de crecimiento y los resultados arrojados fueron que las nanopartículas por síntesis verde fueron más eficaces contra *A. niger* en comparación con *C. albicans* y *A. flavus* (4,8, 4,1 y 4,9ug/ml para *C. albicans*, *A. niger* y *A. flavus*, respectivamente).

Adicionalmente, determinan que la morfología de las nanopartículas de plata depende de los principales componentes del extracto proveniente de las plantas y las condiciones de síntesis. Por lo tanto, cabe la posibilidad de controlar las propiedades y dimensiones de las nanopartículas cambiando la composición de la mezcla de reacción y/o utilizando una cantidad diferente de biomasa o extracto de planta y concentración de sustrato para lograr la formación de nanopartículas con la forma y el tamaño ⁽¹⁷⁾.

1. MARCO TEORICO

1.1. GENERO *Aspergillus*

El género *Aspergillus* fue reconocido inicialmente en 1729 por Micheli en Florencia, Italia, que marcó el punto de partida de la micología como ciencia en su obra "Nova Plantarum Genera". La denominación del género se debe a la similitud morfológica de la cabeza conidial con un "aspergillus" (instrumento religioso utilizado para dispersar el agua bendita)⁽¹⁸⁾. Se reconoce a Link (1809) como al autor que validó al género (CINB), a pesar que Micheli fue el primero que lo describió ⁽¹⁹⁾.

Es un organismo filamentoso, hialino, saprofita, anamórfico (asexual) que se reproduce por esporas llamadas conidias, aunque se han descrito formas teleomíticas (sexuales), es de distribución mundial, se encuentra en el agua, el suelo, el aire, el material en descomposición y otras localizaciones, en un amplio rango de temperatura (12°C y los 57°C), humedad y aerobiosis^(20,21). Sin embargo, algunas especies, producen deterioro y contaminación de ciertos sustratos alimentarios, en especial alimentos, granos, suelos (salinos, cultivados, desérticos y de pastoreo), bosques subtropicales deciduos y ambientes internos, entre otros ^(18,19). Este hongo tiene un ciclo biológico muy simple en el cual se forman esporas para su reproducción y tras la germinación de estas esporas se forman las hifas que serán las formas invasivas del hongo. La simplicidad del ciclo biológico favorece una alta capacidad del hongo para la esporulación y, como consecuencia, la presencia de concentraciones altas de esporas en el aire⁽²²⁾.

El género *Aspergillus* no se han considerado como causa de enfermedades en las plantas, sin embargo, algunas especies son responsables de algunos problemas de contaminación en productos vegetales ya sea en precosecha, cosecha, post

cosecha y almacenamiento (*A. niger*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. alliaceus*, entre otros)⁽²³⁾.

Tienen una considerable importancia para la sociedad debido a la capacidad que presentan algunas de sus especies de producir enzimas y ácidos orgánicos. *Aspergillus niger*, es la principal especie utilizada para la producción de ácidos orgánicos, básicamente ácido cítrico y ácido glucónico. En la producción industrial de enzimas, esta especie también ha sido utilizada como productora de catalasa. *Aspergillus oryzae*, que ha sido empleada, entre otras aplicaciones, para la producción de α -amilasa, enzima de amplio uso en la industria panadera ^(18, 24,25)

Adicionalmente son reconocidos por ser productores de micotoxinas, que son metabolitos secundarios producidos y secretados por el hongo durante el proceso de degradación de la materia orgánica, como mecanismo de defensa frente a otros microorganismos⁽²⁶⁾.

1.1.2. Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Clase: Eurotiomycetes

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Género: *Aspergillus*

Especie: Incluye más de 250 especies, de las cuales a 20 se les atribuyen infecciones oportunistas en el hombre, aunque algunas de ellas solo ocasionalmente. Las especies de mayor interés clínico son *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus ustus* ⁽²⁷⁾.

La clasificación del género *Aspergillus* en subgéneros y secciones está basada fundamentalmente en cuatro características: presencia de teleomorfo, presencia o ausencia de métulas; disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula y coloración de las colonias ⁽²⁷⁾.

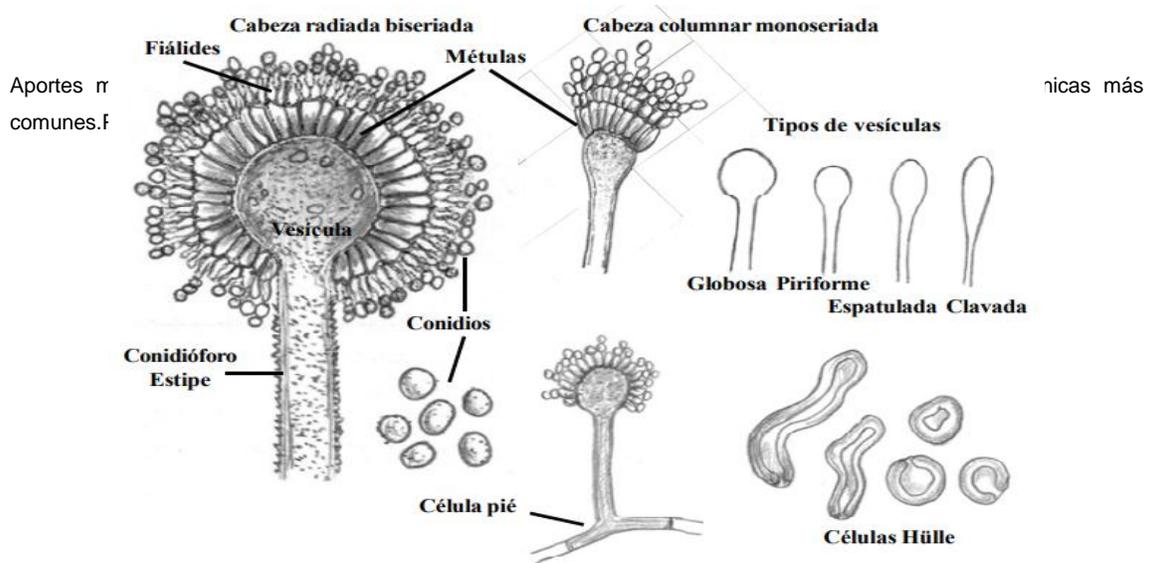
1.1.3. Características macro y microscópicas. Cuando se encuentra a *Aspergillus* sobre los alimentos o en cajas Petri cultivadas para su identificación, las diferentes especies se diferencian en tamaño, tasa de crecimiento, textura (aterciopelada, granular, algodonosa) y color de la colonia: verde-amarillento (*A. flavus*), negro (*A. niger*), marrón (*A. terreus*). La coloración aparece casi siempre en todas las estructuras aéreas, tanto en el micelio como en las cabezas conidiales ^(19,26).

Con respecto a su identificación microscópica, se tiene en cuenta que *Aspergillus* es un género anamórfico que produce esporas asexuales (conidios, mitosporas) sobre estructuras especializadas características que se componen de un: conidióforo (estipe) que se dilata en el ápice, formando una vesícula de diferentes formas. Las vesículas pueden variar en tamaño y forma, desde esféricas (globosas), clavadas, piriformes y espatuladas.

La vesícula nace sobre un corto o largo pie, usualmente aseptado, liso o rugoso y que se une a la hifa portadora generalmente en ángulo recto mediante una estructura en forma de T invertida llamada célula pie, que forma parte integral del estipe. La célula pie y el estipe son comúnmente llamados conidióforos, que apicalmente terminan siempre en una vesícula dilatada, la cual puede dar origen en su superficie a 1 o 2 tipos de estructuras (monoseriados), que son las célula conidiógenas, o presentar una segunda estructura bajo las fiálides llamadas métulas (biseriadas) que pueden sostener 1 a 10 fiálides c/u. Algunos miembros del género pueden producir células de gruesa pared y de variado tamaño (siempre

mayores que los conidios o mitosporas), llamadas células de Hülle, generalmente entremezcladas con el micelio o asociadas a las formas sexuales del género. Si bien es cierto que su función parece ser protectora, pueden actuar también como propágulos de dispersión (Fig. 1) ^(19,27).

Figura 1. Estructuras morfológicas en el género *Aspergillus*: cabezas radiadas y columnares, tipos de vesículas, célula pie, células Hülle



Actualmente se consideran 11 géneros teleomórficos dentro del género anamórfico *Aspergillus*. Chaetosartoria (Sección Cremei), Dichlaena y Eurotium (Sección *Aspergillus*, Emericella (Sección Nidulantes, Fennellia (Sección Flavipedes), Hemicarpenales, Sclerocleista y Warcupiella (Sección Ornati), Neopetromyces (Sección Circumdati), Neosartorya (Sección Fumigati, Petromyces (Sección Flavi⁽¹⁹⁾.

1.1.4. Micotoxinas. Los mohos crecen sobre los materiales vegetales produciendo el deterioro de los mismos. Forman metabolitos secundarios que actúan como antibióticos favoreciendo la prevalencia del moho frente a otros microorganismos,

muchos de los cuales son tóxicos para plantas y/o animales. Estos metabolitos que enferman o matan a los animales que los consumen se conocen como micotoxinas, son compuestos ubicuos que difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas y la afección se llama micotoxicosis. Las micotoxinas son específicas. Cuanto más compleja es la ruta biosintética de estos metabolitos secundarios, más restringido es el número de especies de hongos productores (Cuadro 1). La contaminación directa con un moho y la consecuente producción de toxina puede ocurrir durante la producción, el transporte, el estacionamiento o el procesamiento del alimento o forraje. Mientras que la contaminación indirecta se debe a la presencia de un ingrediente previamente contaminado con un moho toxigénico que ya ha desaparecido y cuya micotoxina persistente ⁽²⁸⁾.

El mayor problema reside en la presencia de micotoxinas contaminantes en alimentos y piensos. Donde varias de estas se han identificado y la más importante son las aflatoxinas y la ocratoxina A ⁽²⁹⁾.

Cuadro 1. Algunas micotoxinas descritas en el género *Aspergillus* y su efecto en humanos y/o animales ^(12, 20,23).

<i>Aspergillus</i>	MICOTOXINAS	EFEECTO
<i>A.clavatus</i>	Patulina Citocalasinas	Neurotóxico Inhibe la división celular, la función tiroidea y la secreción de amilasa.
<i>A. parasiticus</i> <i>A. flavus</i>	Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 Ácido ciclopiazónico (<i>A. flavus</i>)	Hepatotóxico, inmunotóxico y cancerígeno
<i>A. niger</i> <i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina A Ácido penicílico	Nefrotóxico Hepatotóxico y cancerígeno
<i>A. niveus</i> <i>A. terreus</i> <i>A. oryzae</i>	Citrinina Citroviridina Territrems Ácido ciclopiazónico	Nefrotóxico Afección cardíaca Desórdenes gastrointestinales y neurológicos

<i>A. versicolor</i> <i>A. nidulans</i>	Esterigmatocistina	Hepatotóxico
--	--------------------	--------------

Las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, por su poder carcinogénico son consideradas las más hepatotóxicas⁽³¹⁾, por el riesgo en salud humana y animal, debido a la contaminación de productos en pre-cosecha: maíz, algodón, soja, maní, nueces y por ciertos residuos que aparecen en la leche debido al consumo por los animales de piensos contaminados. La ocratoxina A es una potente nefrotoxina que además posee propiedades carcinogénicas, teratogénicas e inmunotóxicas en ratas y posiblemente en humanos. Puede contaminar alimentos, tales como granos, legumbres, café, frutas secas, cerveza, vino y carnes: las especies más productoras pertenecen a la sección *Circumdati* y *Nigri* ⁽³²⁾.

1.1.5. Mecanismos de resistencia

1.1.5.1. Mutaciones Cyp51A. Hasta ahora, la mayoría de las cepas resistentes a azoles (fluconazol, voriconazol, posaconazol) se han asociado con mutaciones puntuales o sobreexpresión de *cyp51A* y su promotor (TR34/Leu98His; TR46/Tyr121Phe/Thr289Ala) que se ha encontrado en el medio ambiente y aislamientos clínicos de 22 países ⁽⁵⁾. El *cyp51A* codifica una 14 α -esterol-desmetilasa, una enzima clave en la ruta de biosíntesis de ergosterol, principal componente de las membranas celulares de hongos. La inhibición de la 14 α -desmetilasa es fungistática en las levaduras y fungicida en mohos ⁽³³⁾. Los triazoles se unen con uno de los átomos de nitrógeno del anillo de triazol al átomo

de hierro en el grupo hemo ubicado en el sitio ⁽³⁴⁾, de esta forma, se bloquea la desmetilación 14 α del lanosterol y el ergosterol no se sintetiza, alterando la fluidez de la membrana lo que genera la muerte de las células fúngicas ^(35,36). Otros mecanismos probados de resistencia en *A. fumigatus* son aminoácidos Cyp51A sustituciones en Gly54, Gly138, Met220, Gly448; En *A. flavus* 50 y *A. terreus* 51 mutaciones puntuales en Cyp51 han sido descritos ⁽⁵⁾.

1.1.5.2. Mutaciones independientes de Cyp51A. La sobreexpresión de *cyp51B*, sobreexpresión de bombas de eflujo que son proteínas de casete de unión a ATP (ATP), regulación positiva de genes transportadores ABC y MSF, transportadores secundarios que usan el protón fuerza a través de la membrana plasmática. Hasta la fecha, solo se sabe que cinco genes transportadores están relacionados con la resistencia: *AfuMDR1*, *AfuMDR2*, *AfuMDR3*, *AfuMDR4* y *AtrF*. Por último, un vínculo demostrado entre los transportadores y la resistencia azoles fue la expresión de *cdr1B*. La formación de biofilms es también un factor de resistencia para las especies de *Aspergillus*, que forman matrices extensas de exopolisacáridos^(5,36).

1.1.6. *Aspergillus flavus*. Descrito por Link en 1809, conocido como una especie asexual que solo produce esporas sexuales, conidios y cuerpos fructíferos asexuales de hibernación, esclerocios. Recientemente, la etapa sexual de *A. flavus* ha sido reportada y clasificada como *Petromyces flavus* ⁽³⁷⁾.

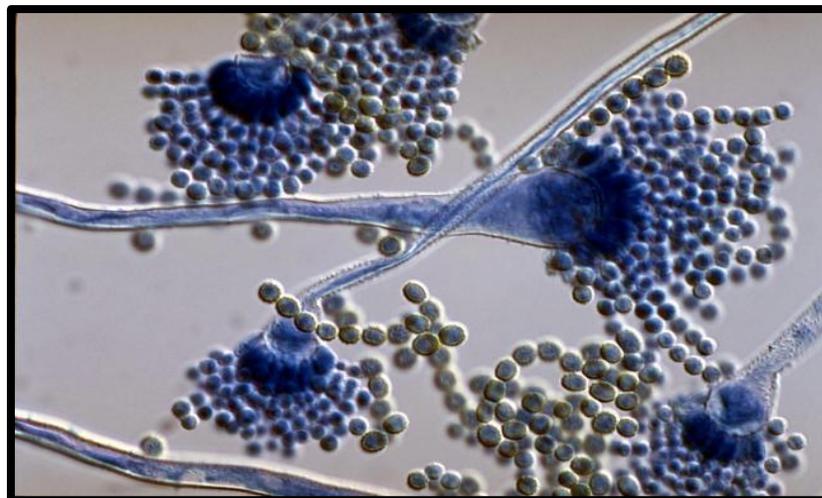
Se presenta como un saprófito en los suelos de todo el mundo y causa complicaciones en varios cultivos agrícolas importantes, como el maíz (pudrición de la mazorca), el maní (moho amarillo) y la semilla de algodón, antes y después de la cosecha. El hongo causa enfermedades animales y humanas ya sea a través del consumo de alimento contaminado (Aflatoxicosis y/o cáncer de hígado) o mediante crecimiento invasivo (Aspergilosis), que a menudo es mortal en

humanos que están inmunocomprometidos. *A. flavus* se encuentra con relativa frecuencia en casos de sinusitis, infecciones en la piel y en Aspergilosis invasora⁽²⁾. Produce un metabolito secundario cancerígeno y mutagénico derivado del policétido, la aflatoxina y otros metabolitos secundarios, incluidos el ácido ciclopiazónico (CPA) y el aflatrem⁽³⁸⁾.

A diferencia de la mayoría de los hongos, *Aspergillus flavus* es favorecido por las condiciones secas y cálidas. La temperatura óptima para el crecimiento es 37°C (98.6 F), pero el hongo crece fácilmente entre las temperaturas de 25-42°C ⁽³⁹⁾.

Características microscópicas (Fig. 2): Cabezas conidiales uniseriadas y biseriadas, principalmente radiales; estipes normalmente rugosos, hialinos o de color marrón pálido. Vesícula esférica; mètulas ocupando prácticamente toda la superficie de la vesícula. Conidios globosos o elipsoidales ⁽²⁷⁾.

Figura 2. Morfología microscópica a partir de cultivo de *Aspergillus flavus* con azul de lactofenol.



Conidia of *Aspergillus flavus* mold.

<http://www.clt.astate.edu/mhuss/Aspergillus%20flavus%20pict.jpg>

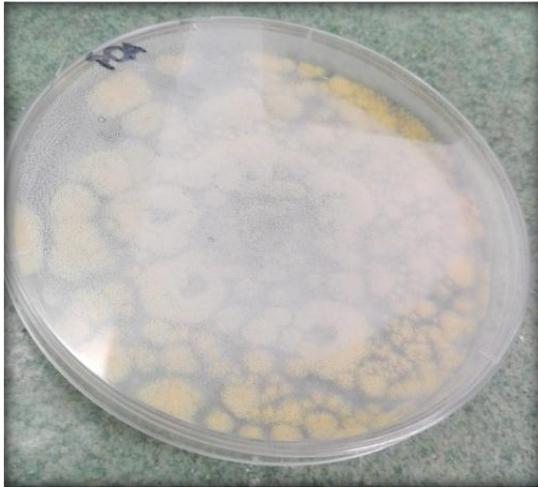
1.1.6.1. Epidemiología. Al igual que otras especies de *Aspergillus*, *A. flavus* tiene un efecto mundial distribución. Esto probablemente sea el resultado de la producción de numerosos conidios aerotransportados, que se dispersan fácilmente por aire movimientos y posiblemente por insectos. La composición de la atmósfera tiene un gran impacto en el crecimiento del moho, siendo la humedad la variable más importante (entre 0.86 y 0.96) La temperatura óptima para *A. flavus* para crecer es 37°C, pero se puede observar crecimiento fúngico en temperaturas que van desde 12 a 48°C y recientemente, ha sido descrito como la segunda causa de aspergilosis en pacientes inmunodeprimidos⁽¹⁾.

Se desconoce la razón por la que, la mayoría de casos de aspergilosis en pacientes inmunocompetentes e inmunosuprimidos son reportados en el oriente medio y Asia occidental, pero se le atribuye a las condiciones ambientales y sociales que sufren los países ⁽⁴⁰⁾.

En dos de las publicaciones revisadas en las que se da cuenta de la incidencia en Estados Unidos de cada una de las especies de *Aspergillus spp.* en niños, se encontró que *A. flavus* es la especie más frecuente, con datos de 65 y 72 % ^(1,2,41). En una revisión bibliográfica en pacientes con afecciones hematológicas, también se encontró que *A. flavus* era el agente más frecuente (79,2 %) ⁽⁴²⁾.

1.1.6.2. Cultivo en Agar. Macroscópicamente, se le ve como un hongo aterciopelado, colonias planas, ilimitadas, pulverulentas, de color amarillo a verde o marrón, con reverso dorado a rojo-marrón con desarrollo promedio 3 a 5 días como se observa en las Fig. 3 y 4.

Figura 3. Cultivo de *Aspergillus flavus* en Agar PDA.

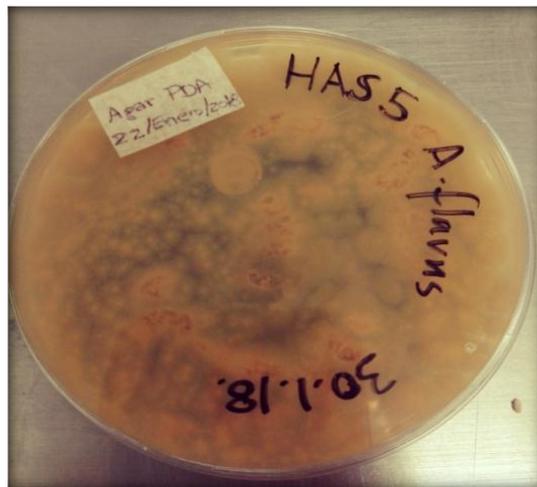


Cortes Pirazan 2018



Cortes Pirazan 2018

Figura 4. Reverso Cultivo de *Aspergillus flavus* en PDA



Cortes Pirazan 2018

1.1.6.3. Aflatoxinas. Estructuralmente, las aflatoxinas son derivados de la difuranocumarina, existiendo cuatro tipos naturales: B1, B2, G1 y G2, de los cuales el B1 es el más abundante y tóxico. Las letras B y G se refieren al color de la fluorescencia (celestes y verdosas) observada bajo luz UV mientras que los subíndices 1 y 2 indican componente mayor y menor respectivamente. Las aflatoxinas M1 y M2 son derivados monohidroxilados de las aflatoxinas B1 y B2, respectivamente, y son excretadas en la leche de los animales que han ingerido alimento contaminado con aflatoxinas^(18,28).

La aflatoxina B1 es el agente cancerígeno natural más potente que se conoce, asociada principalmente al cáncer hepático, por lo que está clasificada como carcinógeno del grupo 1A por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 1982). Actualmente, la legislación Europea establece un límite máximo de 4 µg/kg de aflatoxinas totales en cereales y frutos secos⁽⁴³⁾.

La vía principal de exposición a aflatoxinas en el ser humano es el consumo de alimentos contaminados, como cacahuetes y granos de cereal. Las aflatoxinas se pueden transportar en partículas aerosolizadas y se han detectado en el aire cercano a granjas contaminadas y en el polvo. La exposición significativa a aflatoxinas es poco frecuente en los sujetos que residen en países desarrollados que cuentan con cantidades suficientes de alimentos y normas promulgadas para controlar la concentración de aflatoxina en los mismos. En particular, las tasas de incidencia del cáncer de hígado son entre 2 y 10 veces mayores en los países en vías de desarrollo que en los desarrollados. La aflatoxicosis aguda provoca la muerte, mientras que la aflatoxicosis crónica conlleva alteraciones patológicas más prolongadas, como el cáncer y la inmunodepresión. *A. flavus* es la especie productora de aflatoxinas que aparece con una mayor frecuencia en la actividad agrícola y puede producir hasta 10⁶ mg/Kg⁽⁴⁴⁾.

Se reportó en Venezuela la muerte de más de 500 mascotas (perros y gatos) por el consumo de alimentos concentrados contaminados con aflatoxinas. La

incidencia reportada de aflatoxinas en Colombia oscila normalmente entre el 9 y el 30% ⁽⁴⁵⁾.

1.2. MICOSIS SUBCUTANEAS

Las micosis profundas son infecciones poco frecuentes producidas por hongos, que abarcan las micosis subcutáneas y las micosis sistémicas. Las micosis subcutáneas, incluyen diversas entidades clínicas caracterizadas por la invasión de la piel y el tejido subcutáneo por hongos saprofitos cuyo hábitat es el suelo y las plantas ⁽⁴⁶⁾. Generalmente la puerta de entrada es la inoculación directa con material contaminado: astillas, espinas u otros objetos punzantes; o por inhalación de esporas (p. ej. Construcciones o demoliciones), denominándose así, micosis por implantación ^(47,48).

Las micosis subcutáneas más prevalentes son: esporotricosis, cromoblastomicosis y micetoma. Otras entidades más raras comprenden: Lobomicosis, feohifomicosis, hialohifomicosis y conidiobolomicosis⁽⁴⁷⁾. Las Hialohifomicosis hacen referencia a las entidades clínicas, oportunistas, producidas por hongos hialinos, a excepción de las aspergilosis y la geotricosis ⁽⁴⁹⁾.

1.3. ASPERGILOSIS

Se define como el conjunto de enfermedades producidas por el género *Aspergillus*, donde la especie más representativa es *A.fumigatus*, otras especies también han sido aisladas en diferentes pacientes con aspergilosis, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* o *Aspergillus flavus*^(50,51).

1.3.1. Factores de Riesgo. Aquellas condiciones que comprometen la respuesta inmune a nivel pulmonar y sistémico ante la inhalación de esporas son consideradas como factores de riesgo ⁽⁵⁰⁾. Las cuales incluyen: neutropenia profunda y mantenida, recibir dosis altas de corticosteroides u otras drogas que

produzcan inmunodeficiencia celular severa, trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, neoplasias hematológicas y enfermedad injerto contra huésped. No obstante, en los últimos años estamos atendiendo a un creciente número de formas invasivas de aspergilosis en pacientes con menor grado de inmunosupresión, como son los pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos (UCI), especialmente en aquellos con EPOC^(52,53).

Incluyendo factores ambientales y genéticos, como: El grado de contaminación del aire ambiental y cierta predisposición genética. Con respecto a esta última, se ha puesto de manifiesto la importancia de diferentes polimorfismos genéticos (lectina de unión a manosa [Mannose-binding lectin –MBL–, Toll-like receptor [TLR4-2], lectina-1, plasminógeno, interleucina-10, surfactante pulmonar^(54,55).

1.3.2. Patogenia. La ruta usual de la infección es por vía aérea, por la inhalación de las conidias hasta el pulmón. El tiempo de germinación es variable, desde dos días hasta incluso meses de acuerdo con la especie⁽⁵⁰⁾. La eliminación de conidias inhaladas tiene lugar por células epiteliales de la vía aérea y fundamentalmente por macrófagos alveolares. Éstos realizan el aclaramiento de las conidias y tras reconocer determinados antígenos fúngicos de la pared celular, secretan mediadores inflamatorios que favorecen el reclutamiento de neutrófilos y la activación de la inmunidad celular, determinantes en la eliminación de hifas y en la constitución de la respuesta inmunológica⁽⁵⁶⁾.

1.3.3. Manifestaciones clínicas. El espectro clínico de la aspergilosis abarca las reacciones alérgicas, la colonización asintomática, la infección superficial y la enfermedad invasora. La presentación clínica depende del estado inmune del huésped y de los factores de riesgo asociados que presente; en la medida en que progrese la inmunosupresión será más probable presentar enfermedad invasora^(20,53). Se dividen en manifestaciones alérgicas, crónicas e invasoras.

1.3.3.1 Aspergilosis broncopulmonar alérgica. La patogénesis de la ABPA es una reacción compleja de hipersensibilidad, observada en algunos pacientes con asma o fibrosis quística. Se produce cuando el árbol bronquial es colonizado por *Aspergillus* y conlleva episodios repetidos de obstrucción bronquial, inflamación e impacto mucoso, con fiebre, malestar, expectoración de moldes mucosos oscuros, eosinofilia y en ocasiones hemoptisis que pueden provocar bronquiectasias, fibrosis y compromiso respiratorios^(50,53).

La sinusitis alérgica por *Aspergillus* se presenta en pacientes adultos jóvenes con antecedente de asma o rinitis alérgica, pólipos nasales crónicos y o pacificación en los senos paranasales^(19,20).

1.3.3.2. Aspergilosis pulmonar crónica. La aspergilosis pulmonar crónica incluye varios cuadros clínicos, como el aspergiloma, la aspergilosis crónica cavitada, la aspergilosis crónica fibrosante y la aspergilosis crónica necrotizante. El aspergiloma o aspergiloma simple es una pelota fúngica compuesta por hifas, fibrina, moco y detritus celulares que anidan o colonizan una cavidad pulmonar previa. La aspergilosis crónica cavitada (anteriormente denominado aspergiloma complicado) afecta a pacientes inmunocompetentes que desarrollan una o más cavidades durante varios meses, habitualmente en lóbulos superiores y si progresan pueden llegar a desarrollar formas crónicas fibrosantes⁽⁵⁰⁾.

1.3.3.3. Aspergilosis invasora (AI). Las formas clínicas locales más frecuentes de AI tienen lugar a nivel pulmonar y en los senos paranasales, aunque también pueden afectar al tracto gastrointestinal o a la piel, por inoculación directa ⁽⁵⁰⁾.

1.3.3.4.1. Traqueobronquitis.No es una forma común de aspergilosis invasiva y afecta principalmente a los pacientes inmunodeprimidos y de la cual se han descrito diferentes patrones: la aspergilosis bronquial obstructiva, que se asocia con la producción de tapones mucosos producidos por crecimiento de hifas en la vía aérea, pero con poca afectación mucosa o invasión; la traqueobronquitis ulcerativa, la cual consiste en la invasión focal por hifas en la mucosa traqueobronquial o el cartílago; la traqueobronquitis pseudomembranosa, que se caracteriza por extensa inflamación e invasión del árbol traqueobronquial, con presencia de pseudomembranas y detritos necróticos sobre la mucosa bronquial^(50,57,58).

1.3.3.4.2. Aspergilosis invasiva extrapulmonar.La aspergilosis del SNC puede observarse en el contexto de enfermedad diseminada o como extensión desde una aspergilosis sinusal. La clínica neurológica puede conllevar deterioro cognitivo, déficit focal o crisis comiciales. El compromiso cerebral es la complicación más temida porque la mortalidad es superior al 90%.La endoftalmitis ocular se puede observar en el seno de una aspergilosis diseminada o por extensión corneal secundaria a heridas traumáticas contaminadas. La infección invasiva provoca destrucción de estructuras oculares y grandes déficits funcionales que en ocasiones obligan a la enucleación ^(50,53).

La endocarditis por *Aspergillus spp*, es menos frecuente que la producida por *Candida spp*. y suele asentar sobre válvulas protésicas. La aspergilosis cutánea suele ser primaria, tras inoculaciones locales, traumatismos abiertos, catéteres vasculares, quemaduras, vendajes contaminados, etc.; y más rara vez se produce en el contexto de infecciones diseminadas⁽⁵⁰⁾. La aspergilosis gastrointestinal puede producir invasión local y expresarse como tiflitis, úlceras colónicas, dolor abdominal, y/o sangrado intestinal ⁽⁵⁹⁾.

1.3.4. Diagnóstico. El diagnóstico de la Aspergilosis invasiva es dificultoso debido al riesgo de colonización y contaminación y al bajo valor predictivo de los cultivos de muestras respiratorias, fundamentalmente esputo. La Organización Europea para la Investigación y Tratamiento del Cáncer (EORTC) y el Grupo de Estudio de Micosis Americano (MSG) elaboraron unas recomendaciones diagnósticas para infección fúngica invasiva ⁽⁶⁰⁾.

Estas recomendaciones establecen tres criterios de diagnóstico: Infección probada, confirmación por histología o por cultivo de tejido estéril; Infección probable, A+B+C (al menos un factor de cada grupo); Infección posible, A+ B (al menos un factor de cada grupo), Estas tres categorías se establecen tras analizar tres características en los pacientes⁽⁵⁰⁾:

a) Patología de base

- 3 Episodio reciente de neutropenia (<500/mm³) durante más de 10 días
- Trasplante alogénico de médula ósea
- Uso prolongado de esteroides
- Tratamiento con inmunosupresores de células T, como ciclosporina, tacrólimus, bloqueantes de TNF- α , anticuerpos monoclonales específicos o análogos de nucleósidos
- Inmunodeficiencia severa innata

b) Criterios clínicos y radiológicos

- Infección del tracto respiratorio inferior
- Traqueobronquitis (úlceras, nódulo, pseudomembrana, placa o erosión en estudio broncoscópico)
- Infección senos paranasales
- Infección del sistema nervioso central

c) Criterios microbiológicos (micológicos)

- Análisis directos (citología, microscopía directa o cultivo)
- Hongo filamentoso en esputo, lavado broncoalveolar, cepillado bronquial o aspirado de senos paranasales, indicado por:
 - Presencia de hifas
 - Cultivo de hongo filamentoso (p. ej. *Aspergillus* spp., *Fusarium*, *Zygomycetes* o *Scedosporium species*)
- Análisis indirectos (detección de antígenos)

La detección de galactomanano (GM) es un hetero-polisacarido termo estable presente en la pared celular de la mayoría de especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Es una técnica sencilla, reproducibles y rápida. Actualmente se utiliza una ELISA de doble sándwich que emplea un anticuerpo monoclonal de rata EBA-2 dirigido contra las cadenas laterales de 1-5- D-Galactofuranosido del galactomanano de *Aspergillus*. Que junto con la tomografía computarizada son las pruebas no basadas en cultivo que más contribuyen al diagnóstico de AI ^(50,53).

El diagnóstico de ABPA conlleva criterios clínicos, radiológicos e inmunológicos, como⁽⁶¹⁾:

- Antecedentes de asma
- Pruebas cutáneas de reactividad inmediata a antígenos de *Aspergillus spp.*
- Concentraciones séricas de IgE > 417 IU/ml
- Eosinofilia periférica > 500 cel/mm³
- Infiltrados pulmonares en radiografía de tórax o tomografía computarizada

1.3.5. Tratamiento. El tratamiento de elección para la aspergilosis varía según las manifestaciones clínicas, la edad, el estado inmunológico y hematológico del paciente, las infecciones mixtas ya sea por hongos o bacterias y la infección con cepas de *Aspergillus* que han adquirido resistencia a los triazoles ⁽⁵²⁾.

Para la aspergilosis invasiva, Existe un amplio consenso para considerar voriconazol el tratamiento de elección de AI, en consecuencia con un estudio que mostró superioridad sobre anfotericina B convencional, donde consiguió una respuesta del 53 vs. 32% y un aumento de supervivencia a las 12 semanas (71 vs. 58%) ⁽⁶²⁾.

Para los casos de asperilosis crónica se puede tener en cuenta la cirugía siempre y cuando el estado hematológico del paciente lo permita y el tratamiento de ABPA persigue controlar los episodios inflamatorios y limitar la progresión del daño pulmonar. Los corticoides son la base del tratamiento, pero hay evidencia del beneficio del tratamiento combinado ^(50,52).

1.4. NANOPARTÍCULAS DE PLATA (NPAg)

1.4.1. Generalidades. La Nanotecnología se emplea para describir la creación y manipulación de materiales con características estructurales dentro de la escala nanométrica. El objetivo de esta tecnología es innovar y desarrollar nuevos dispositivos de impacto en diferentes áreas, como por ejemplo, en la conversión de energía, almacenamiento de información, administración de fármacos y mejora de la calidad de los materiales de uso médico⁽⁶³⁾.

La segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales, define nanomaterial como, un material natural, secundario o fabricado que contenga partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado y en el que el 50% o más de las partículas en la granulometría numérica presente una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1nm y 100nm⁽⁶⁴⁾.

La plata ha sido empleada durante miles de años como metal precioso por el ser humano en aplicaciones tan dispares como joyería, utensilios, moneda, fotografía o explosivos. De todos estos usos, uno de los más importantes es su empleo como agente desinfectante con fines higiénicos y médicos⁽⁶⁵⁾.

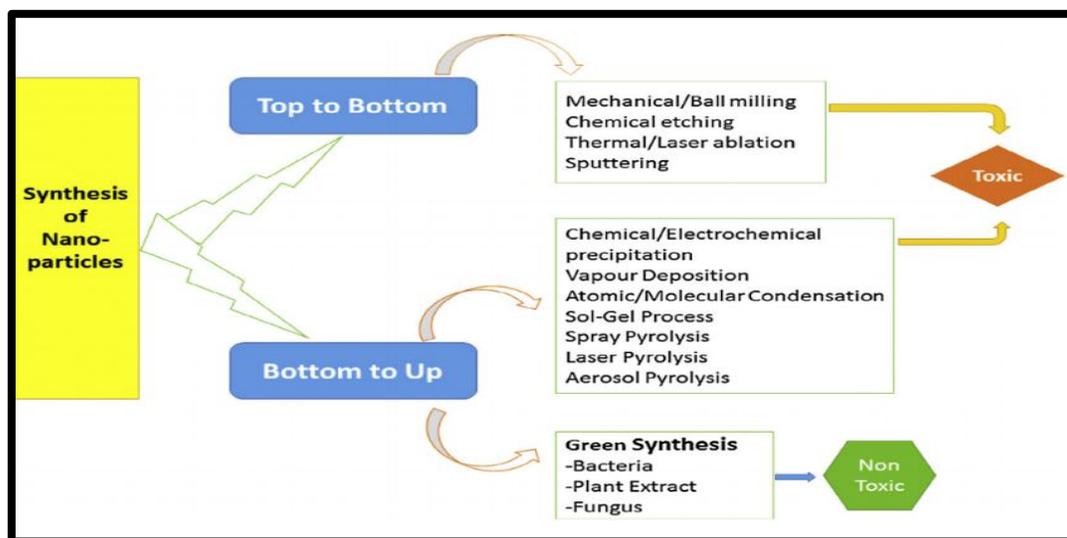
Su fuerte actividad antimicrobiana es la principal característica para el desarrollo de productos con NPAg, actualmente, una amplia categoría de productos se encuentran disponibles en el mercado. En el ámbito médico, existen apósitos para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos ellos recubiertos o integrados con AgNPs para así evitar el crecimiento bacteriano. Finalmente, las AgNPs también tienen su aplicación en el sector alimentario, concretamente en agricultura y en el envasado de los alimentos. Dentro del campo de la agricultura, las AgNPs se emplean para prolongar la conservación de frutos, ya que además de su actividad antibacteriana presentan un efecto fungistático que retarda el crecimiento de hongos fitopatógenos ⁽⁶⁶⁾.

1.4.2. Propiedades. Entre las propiedades características de la plata nanométrica, están las derivadas de la resonancia plasmónica de superficie (conocida por sus siglas en inglés: SPR, surface plasmon resonance). El fenómeno de SPR ocurre porque los electrones en la superficie de una nanopartícula metálica oscilan al interactuar con una onda electromagnética y se induce un momento dipolar sobre la partícula en un intervalo de tiempo. Cuando la componente eléctrica de la onda electromagnética (de un haz de luz visible) que incide sobre la nanopartícula oscila a la misma frecuencia que los electrones de ésta, ocurre el fenómeno de resonancia de plasmón de superficie⁽⁶⁷⁾.

1.4.3 Síntesis de Nanopartículas de Plata. Actualmente, se han informado muchos métodos para la síntesis de NPAg mediante el uso de rutas químicas, físicas, fotoquímicas y biológicas. Cada método tiene ventajas y desventajas, siendo los problemas comunes los costos, la escalabilidad, el tamaño de las partículas y la distribución del tamaño ⁽⁹⁾. La gran cantidad de átomos presentes en las nanopartículas son átomos superficiales por lo que la naturaleza de la superficie de las nanopartículas influirá en gran medida en sus propiedades ⁽⁶⁵⁾.

En general, hay dos enfoques que están involucrados en la síntesis de nanopartículas de plata, ya sea desde el enfoque "Top to Bottom", la ruptura de material adecuado hacia abajo en partículas finas por reducción de tamaño con diversas técnicas litográficas por ejemplo molienda, trituración, pulverización y ablación térmica/láser; o desde un enfoque de "Bottom to up", las nanopartículas se pueden sintetizar utilizando métodos químicos y biológicos se basa en la reducción de iones en este caso de plata desde su estado de oxidación a su estado elemental, lo que después desencadena procesos de nucleación o agregación⁽⁶⁸⁾.

Figura 5. Diferentes enfoques de síntesis de nanopartículas de plata.



A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. Ahmed 2016

Las nanopartículas de plata se forman por la reducción de la plata Ag^+ en la forma de nitrato de plata acuoso, es decir, cada catión Ag^+ debe ganar un electrón para convertirse en Ag^0 ⁽⁶⁷⁾. La formación de AgNPs se juzga inicialmente en función del cambio de color de la solución, a simple vista. La absorbancia característica se observa en el rango de 380 ~ 450nm, en el que se sintetizan principalmente AgNPs esféricos⁽⁶⁹⁾.

1.4.3.1. Síntesis Química. En general, la síntesis de nanopartículas metálicas en disolución, se lleva a cabo mediante el empleo de los componentes que se muestran, a continuación.

Cuadro 2. Algunos métodos de síntesis de nanopartículas de plata en disolución^(8,9, 65,67).

Precursor Metálico	Agente Reductor	Agente estabilizante
AgNO ₃	Citrato	Citrato
AgNO ₃	Borohidruro de sodio NaBH ₄	
AgNO ₃	Ácido ascórbico	Con o sin Bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB)
AgNO ₃	Poliolés	Polivinilpirrolidona (PVP)
AgNO ₃	β-D-glucosa	Almidón
[Ag(NH ₃) ₂]	Azúcares	
AgNO ₃	Dimetilformamida (DMF)	aminopropiltriétoxissilano (APS) y PVP
Ag(COOCH ₃)	Acetaldehído Oleilamina (OLA)	hexadecilamina (HDA) oleilamina (OLA)
AgNO ₃	Etilenglicol	PVP
AgNO ₃	Etileno Ácido laurico	Entre otros: Acetato de celulosa poli-vinil-alcohol (PVA), Agar, Ciclodextrina, bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT), Oleato de sodio.

El mecanismo de formación de las disoluciones coloidales a partir de la reducción de iones plata consta de dos etapas diferentes: nucleación y crecimiento. El tamaño y la forma de las nanopartículas dependerá de las velocidades relativas de estos procesos que pueden ser controladas a través de la modificación de los parámetros de reacción (concentración, temperatura, pH, poder reductor, etc.)⁽⁶⁵⁾.

1.4.3.2. Síntesis Física. Las nanopartículas metálicas pueden sintetizarse generalmente por evaporación y condensación, utiliza las energías físicas (térmica, potencia de CA y arco eléctrico) para producir NPAg con una distribución de tamaño casi estrecha. Lo que podría llevarse a cabo utilizando un horno tubular a presión atmosférica. Sin embargo, en el caso de usar un horno tubular a presión atmosférica existen varios inconvenientes tales como un gran espacio de horno tubular, gran energía de consumo para elevar la temperatura ambiental alrededor del material fuente y mucho tiempo para lograr la estabilidad térmica. El enfoque físico puede permitir la producción de grandes cantidades de muestras de NPAg en un solo proceso. Sin embargo, se deben considerar los costos para la inversión del equipo ⁽⁹⁾.

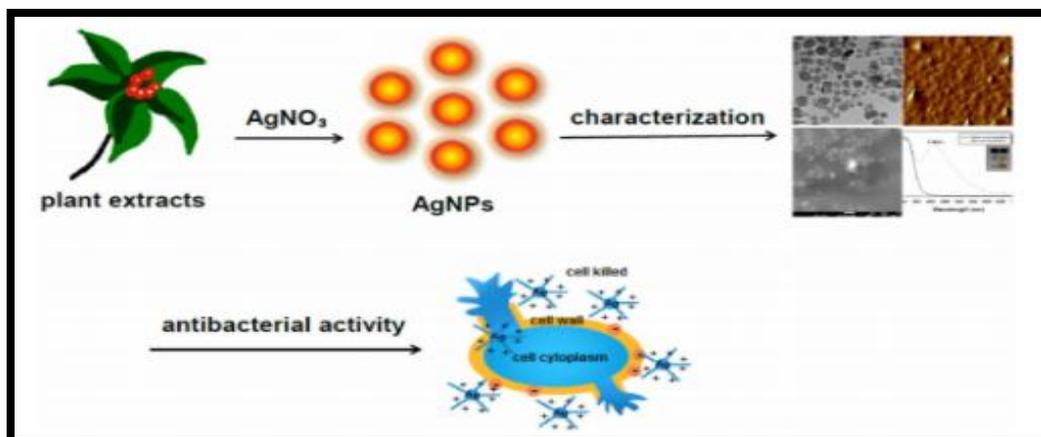
1.4.3.3. Biosíntesis de Nanopartículas de Plata o Síntesis Verde. La química verde es una opción relativamente nueva de la química, consistente en el diseño de procesos para reducir o eliminar el uso o la generación de sustancias peligrosas para el medio ambiente. Las NP metálicas se sintetizan comúnmente por métodos químicos y físicos tradicionales. Sin embargo, los problemas de sostenibilidad actuales han llevado a exploraciones de síntesis ecológica y síntesis verde, donde los agentes reductores químicos se eliminan, y las entidades biológicas se utilizan para convertir los iones de plata en nanopartículas de plata, requiere el uso de agua como un solvente ambientalmente amigable, destacando el hecho de que el agua es más biocompatible que los solventes orgánicos^(64,65). Estos compuestos

reductores y/o estabilizantes se pueden utilizar a partir de bacterias, hongos, levaduras, algas o plantas. (8, 9,69).

Todas las partes de una planta que contienen antioxidantes o azúcares, incluyendo hojas, frutos, raíces, semillas y tallos, pueden usarse en el proceso de síntesis, reemplazando productos químicos potencialmente peligrosos como el borohidruro de sodio (NaBH_4). La razón por la cual los extractos de plantas funcionan tan bien en la síntesis de nanopartículas es porque los antioxidantes presentes en ellos actúan como agentes reductores y como agentes de protección.

En el estudio de Hebbalalu et al. (2013) Se describe el uso simple de vitaminas como la vitamina B2, 66 B1, 67 C, pueden generar nanopartículas en medio acuoso y a temperatura ambiente, Adicionalmente menciona que las proteínas con grupos amino reducen los iones de plata y actúan como control durante la síntesis, pues después de interactuar con los iones de plata, se encontró que la estructura secundaria de la proteína estaba alterada⁽⁷⁰⁾.

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



A New Paradigm Shift for the Green Synthesis of Antibacterial Silver Nanoparticles Utilizing Plant Extracts Park
2014

La literatura describe diferentes técnicas y fuentes de energía externas para la biosíntesis de NPAg, como el uso de incubación en horno ⁽⁶⁹⁾; Autoclave inventada por Charles Chamberland en 1879, para generar la cantidad necesaria de calor y presión utilizando one-pot-one ⁽⁷⁰⁾.

Park en su estudio describe las ventajas sobre los métodos químicos tradicionales⁽⁶⁹⁾.

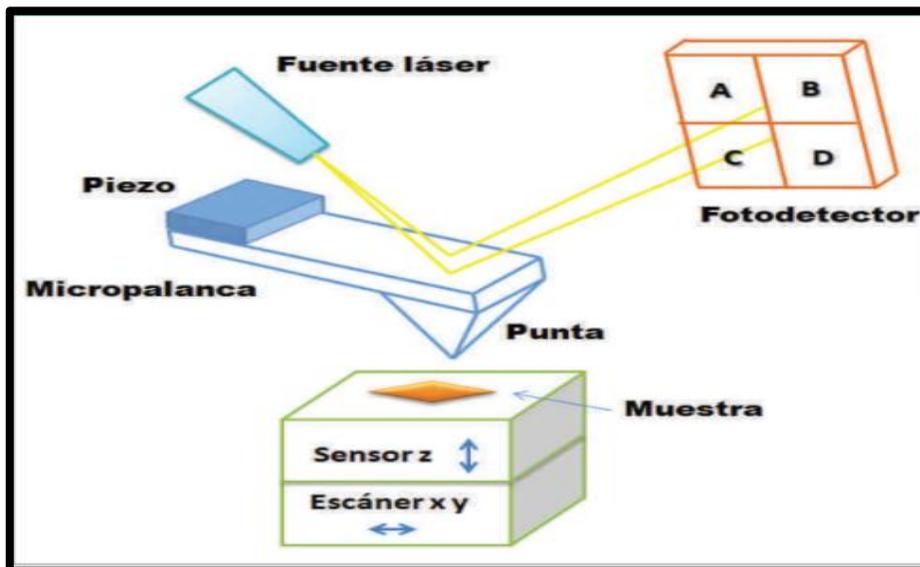
- La síntesis verde es simple y generalmente implica una reacción de un solo recipiente
- Es susceptible de escalar
- Se eliminan los productos químicos peligrosos asociados a la toxicidad, lo que aumenta la biocompatibilidad del producto resultante con tejidos normales para aplicaciones in vivo
- Las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

La formación de AgNPs se caracteriza generalmente con métodos espectroscópicos y microscópicos, que incluyen espectrofotometría UV-visible, espectroscopía infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de fuerza atómica (AFM) , Difracción de rayos X (XRD) y mediciones del potencial zeta⁽⁶⁹⁾.

1.4.4. Microscopio de fuerza atómica (AFM).El microscopio de fuerza atómica es hoy en día una herramienta estándar de caracterización de muestras a escala atómica. Desde su invención en 1986 por Binnig y colaboradores, el AFM ha despertado el interés por parte de la industria y academia, y es utilizado rutinariamente como herramienta de caracterización a nanoescala. El principio de funcionamiento consiste en un resorte con una constante elástica conocida es

comprimido por una fuerza arbitraria de magnitud, donde la compresión del resorte es una medida directa de la fuerza ejercida. El resorte utilizado en AFM es una micropalanca sensible que típicamente posee una rigidez de 0.1 N/m a 50 N/m unida a esta se encuentra una punta afilada, la cual cuenta con una curvatura de unos pocos nanómetros de diámetro. En consecuencia, es posible medir la fuerza de interacción entre la punta y la muestra a través de la flexión de dicha micropalanca⁽¹²⁾. La micropalanca (cantilever) con la punta (tip) adjunta constituyen la sonda que será la encargada de interactuar con la muestra. Por encima de la sonda se encuentra la fuente del rayo láser que apunta hacia la parte trasera de la micropalanca. El rayo láser reflejado es detectado por un fotodiodo de cuatro cuadrantes para detectar los movimientos de flexión y torsión de la micropalanca. Por último el escáner donde descansa la muestra está conectado a un sistema de retroalimentación y responderá con movimientos en los ejes x, y, z⁽¹²⁾.

Figura 7. Componentes del AFM



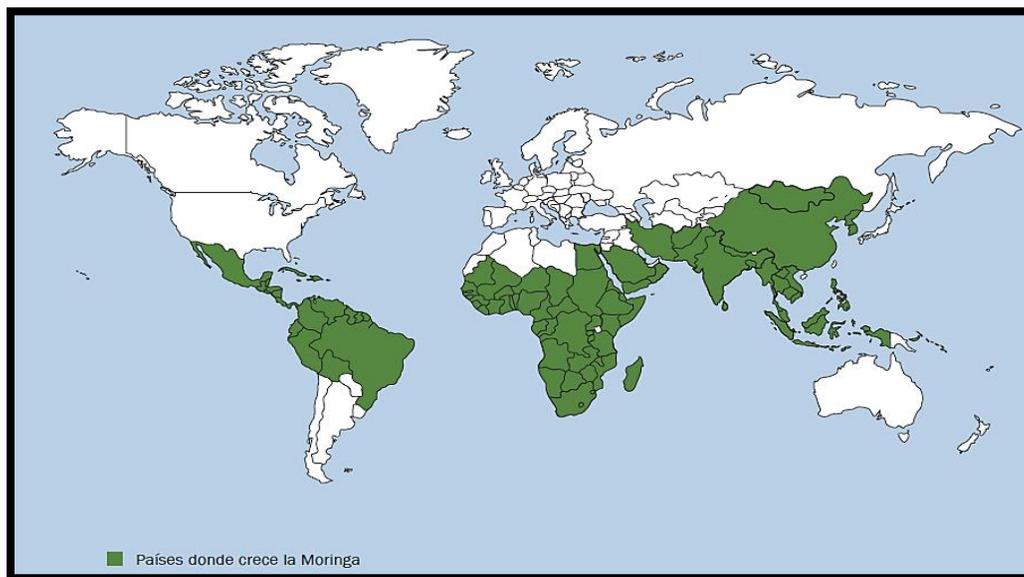
El microscopio de fuerza atómica: métodos y aplicaciones. López 2014

1.5. *Moringa oleifera*

1.5.1. Generalidades. *Moringa oleifera* es un árbol o arbusto perennifolio de crecimiento rápido, con copas abiertas y follaje pináceo que forma parte de la familia de las Moringaceae junto a otras 12 variedades típicas de los climas áridos del trópico⁽⁷¹⁾, aunque es una especie originaria de las estribaciones meridionales del Himalaya, a lo largo de los años se ha extendido a otras partes como India, Bangladesh, Afganistán, Pakistán, Sri Lanka, Asia Occidental, península arábiga y después llevada al Caribe, Centroamérica y gran parte de América del Sur^(72,73), como se observa en la figura 9. Crece fácilmente por reproducción asexual por estacas aun en condiciones de sequía y puede alcanzar hasta los cuatro metros de alto en un año bajo pobres atenciones hortícolas, generando beneficios tanto para los productores como para el ecosistema ⁽⁷¹⁾.

Moringa se presenta como una planta con un alto potencial biotecnológico debido a su composición química y por lo tanto con importantes aplicaciones en el estudio de la nutrición infantil, en su uso como biofortificante y en su aplicación como factor fungitóxico y antimicrobiano⁽⁷⁴⁾. Varios ensayos clínicos realizados en los últimos 5 años demuestran las propiedades medicinales de la *Moringa* como antioxidante, en las enfermedades respiratorias, cardiovasculares, gastrointestinales, endocrinas, en el sistema nervioso central, en el sistema inmunológico y como antibacteriano⁽¹⁰⁾.

Figura 9. Distribución mundial de la especie *Moringa oleífera*

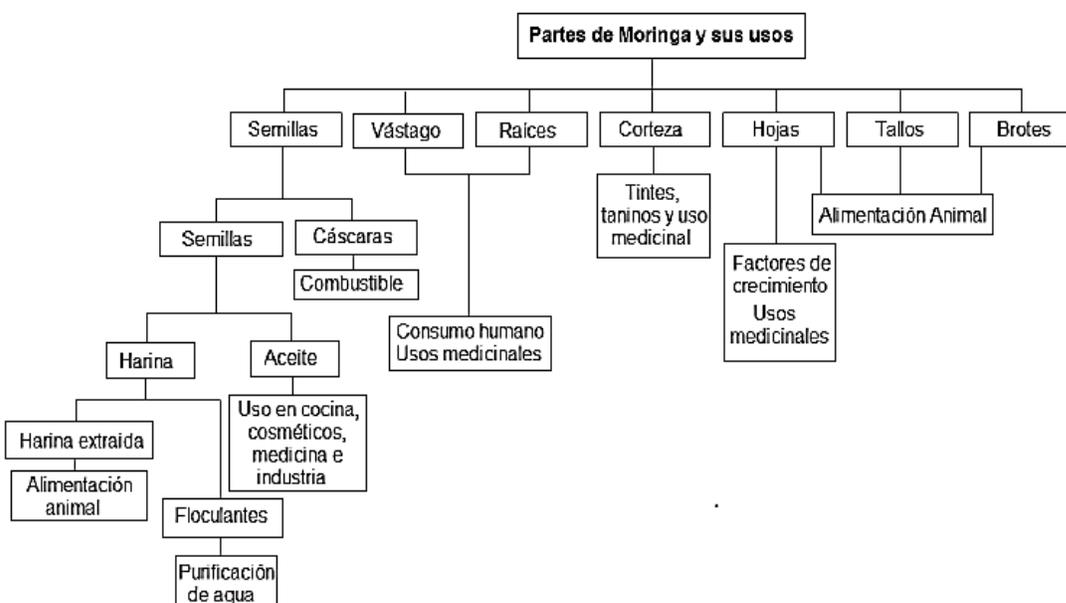


Trees for Life. Mathur 2005.

1.5.2. Partes y sus usos. Todas las partes de la planta son aptas para su consumo y poseen un alto y apreciable valor nutricional (dependiendo de factores como la especie, el suelo y el tratamiento hortícola), es por ello que es utilizada como suplemento alimenticio. Cannet describe los usos potenciales de *Moringa oleífera*, resumiéndolos en la figura 10 ⁽⁷¹⁾.

La *Moringa* también es rica en el ramnosa, un azúcar simple, glucosinatos e isotiocianatos. Sus raíces contienen moringina y moringininea, además de otros ingredientes, tales como: fitosterol, ceras, resinas, zeatina, quercetina, ácido cafeoilquínico, pterigospermina y kaempferol⁽¹⁰⁾.

Figura 10. Usos potenciales de *Moringa oleífera*.



Aspectos tóxicos más relevantes de *Moringa oleífera* y sus posibles daños. Canett 2014

1.5.2.1. Hojas de *Moringa oleífera*. Las hojas de *Moringa* que tienen un alto contenido en antioxidantes naturales, tales como vitamina C, tocoferoles (familia de vitamina E), flavonoides y compuestos fenólicos como flavonoides, ácido gálico, quercetina y kaempferol. Los compuestos fenólicos son esenciales en la dieta humana y poseen un interés considerable debido a sus propiedades antioxidantes ^(75,76).

Un análisis nutritivo indica que las hojas de *Moringa* contienen una riqueza de nutrientes esenciales que evitan enfermedades. Además contienen todo el aminoácido esencial, algo que es poco común en una planta. Dado que las hojas secas son concentradas, contienen grandes cantidades de estos varios nutrientes, con la excepción de la vitamina C, como se demuestra en la Figura 11 y 12. ⁽⁷³⁾

Figura 11. Contenido de vitaminas y minerales de las hojas de la *Moringa* (Todos los valores son por 100 gramos de porción comestible)

	Hojas Frescas ¹	Hojas Secas ⁵
Caroteno (Vit. A)*	6.78 mg	18.9 mg
Tiamina (B1)	0.06 mg	2.64 mg
Riboflavina (B2)	0.05 mg	20.5 mg
Niacin (B3)	0.8 mg	8.2 mg
Vitamina C	220 mg	17.3 mg
Calcio	440 mg	2,003 mg
Calorías	92 cal	205 cal
Carbohidratos	12.5 g	38.2 g
Cobre	0.07 mg	0.57 mg
Grasa	1.70 g	2.3 g
Fibra	0.90 g	19.2 g
Hierro	0.85 mg	28.2 mg
Magnesio	42 mg	368 mg
Fósforo	70 mg	204 mg
Potasio	259 mg	1,324 mg
Proteína	6.70 g	27.1g
Zinc	0.16 mg	3.29 mg

Trees for Life. Mathur 2005.

Figura 12. Componentes nutricionales de las hojas *Moringa oleífera* (Basados en 100g de una porción comestible)



Trees for Life. Mathur 2005.

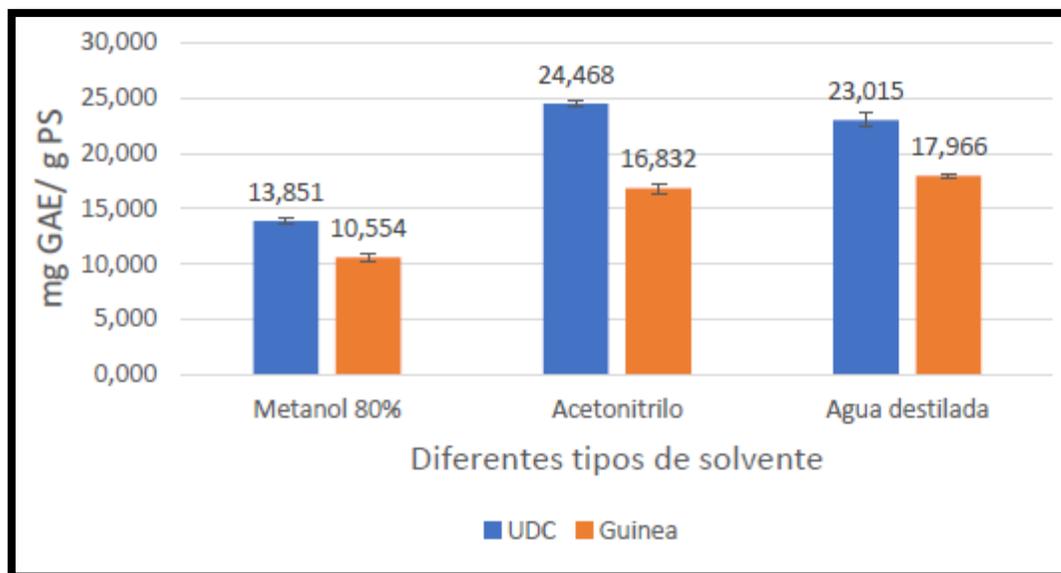
1.5.3. Antioxidantes de *Moringa oleífera*. Un antioxidante es cualquier sustancia que en presencia de un sustrato oxidable retrasa o inhibe la formación del mismo. Se caracterizan por ser muy heterogéneos, pueden ser hidrosolubles y liposolubles, localizarse intra o extracelularmente y proceder de diferentes fuentes ya que algunos son nutrientes o proceden de estos y otros son productos del metabolismo⁽¹¹⁾.

Los antioxidantes naturales, particularmente los que están presentes en frutas y vegetales, han ganado un creciente interés por parte de los consumidores y la comunidad científica ya que los estudios epidemiológicos han indicado que la ingesta frecuente de estos está asociada a un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer⁽⁷⁷⁾.

La *Moringa* es una planta de secano, que en su metabolismo normal y acostumbrada a las condiciones de estrés por el hecho de situarla en un clima con unas condiciones climáticas de alta humedad y precipitaciones además del regado y el uso de fertilizantes provocando que se elevasen los niveles de estrés de la planta y que por tanto se liberasen especies reactivas de oxígeno (ROS) como pueden ser los radicales hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical superóxido (O_2^-). Es decir que la cantidad de compuestos fenólicos varíe según sus condiciones de crecimiento. Los fenoles presentes en los extractos de *Moringa* son buenos donadores de electrones y pueden terminar la reacción en cadena de los radicales convirtiendo radicales libres en productos más estables⁽⁷⁶⁾.

La cantidad de fenoles presentes en las hojas secas de *Moringa oleífera* varía según el solvente que se utilice, como se demuestra en la Figura 13.

Figura 13. Contenido total de fenoles de cada variedad de hoja según el solvente



Estudio sobre la capacidad antioxidante de extractos de hoja de *Moringa oleifera* de diferente origen geográfico. García 2017.

2. METODOLOGÍA

2.1. Tipo de investigación

Este estudio se desarrolló bajo un modelo cuantitativo de tipo descriptivo y pre experimental donde la principal variable de control estuvo centrada en las concentraciones y tipo de extractos.

2.2. Variables

Variables independientes:

- Extracto acuoso e hidroalcohólico de *Moringa oleífera*
- Tiempo de incubación
- Condiciones de temperatura
- Volumen de la solución en el tratamiento

Variables dependientes:

- Inhibición del crecimiento de *Aspergillus flavus*

2.3. Muestra

La cepa a estudio de *Aspergillus flavus*, se obtuvo del cepario de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

2.4. Técnicas y procedimientos

2.4.1. Recolección de *Moringa oleífera*

Se obtuvieron hojas secas de *Moringa oleífera* en un establecimiento comercial, las cuales fueron lavadas con agua destilada para eliminar los posibles contaminantes y se expusieron al calor seco.

2.4.2. Medios de cultivo

Se preparó Agar PDA en cajas de Petri grandes de plástico de 15 ml, para realizar el estudio por triplicado de las cantidades, extractos y solución de Nanopartículas de Ag.

2.4.3. Generación de extractos

Siguiendo el protocolo recomendado por Rodríguez Pedroso et al. ⁽⁷⁸⁾ y Canel Monterroso⁽⁷⁹⁾. Se planificó un ensayo de sensibilidad antifúngica con 2 tipos de extractos; acuoso, hidroalcohólico. Por consiguiente con el fin de cuantificar la inhibición micótica se prepararon cantidades decrecientes de los extractos (1:100, 1:50 y 1:25).

2.4.3.1. Extracto acuoso de la hoja de *Moringa oleífera*

Para la preparación, se utilizaron 200ml de agua destilada a una temperatura de 60°C y se agregaron 20g de hojas secas del material vegetal, esta solución se dejó hervir durante 20 min, luego se filtró la infusión con papel whatman # 1, con fin de obtener el extracto acuoso puro.

Figura. 14 y 15 Extracto acuoso de *Moringa oleífera*



Cortes Pirazan 2018

2.4.3.2. Extracto hidroalcohólico de la hoja de *Moringa oleífera*

La preparación se realizó tomando 50 ml del extracto acuoso puro de *Moringa oleífera* y se agregaron 50 ml de Alcohol etílico al 70%.

2.4.4. Síntesis verde de Nanopartículas de Ag.

Para la preparación de nanopartículas de plata, se utilizaron 90 ml de una solución de Nitrato de Plata 0.1M y 10 ml extracto acuoso de *Moringa oleífera*, se observó el fenómeno de resonancia de plasmones mediante la valoración del cambio colorimétrico a las 2 horas de agitación. Como se observa en la figura 16, inicialmente se tenía un color amarillo claro y se convierte en un marrón oscuro. Las nanopartículas fueron envasadas en un frasco Schott para su posterior utilización y por último con el fin de cuantificar la inhibición micótica se prepararon soluciones a diferentes concentraciones 100, 50 y 25 v/v%.

Figura 16. Cambio colorimétrico de AgNO_3 + Extracto acuoso de *Moringa oleífera*



Cortes Pirazan 2018

2.4.5. Valoración del espectro de absorción para el fenómeno de resonancia de plasmones

Por medio de la Espectrofotometría de Luz-UV se realizó la medición de absorbancias de la solución de nanopartículas de plata, en un rango de 320 a 540nm, para comprobar de acuerdo a lo sugerido por Prasad⁽¹³⁾, que la excitación del ion de plata se logra entre 430 y 440nm.

2.4.6. Caracterización de las nanopartículas por medio del AFM (Microscopio de Fuerza Atómica)

Para la identificación se realizó un previo montaje de las Nanopartículas en el sustrato Mica-Au y se dejó secar la solución a temperatura ambiente de uno a dos días aproximadamente, con el fin de cumplir con las condiciones del equipo con

respecto a la muestra analizar. El método utilizado para dicha técnica fue el de contacto por el tipo de material analizado, y la punta empleada fue CONTR con una constante de resorte de 20,00 N/m, imagen de 256 líneas de resolución cada 0.8 segundos, una fuerza inicial de 20nm, y las fuerzas complementarias correspondieron a P-Gain de 1200 e I-Gain de 1000. El análisis consistió en recorrer la superficie del sustrato identificando las características morfológicas esperadas (nanoesferas) del menor tamaño posible de una escala de 100µm a una mínima de 7,8 µm.

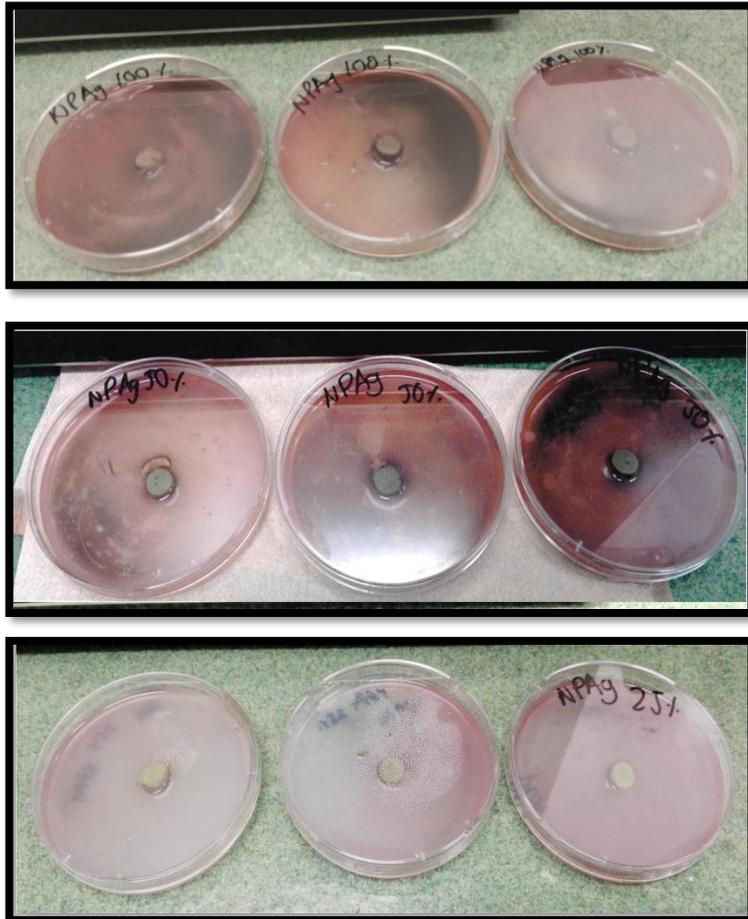
2.4.7. Prueba de sensibilidad a las nanopartículas de Ag y extractos acuoso e hidroalcohólico de *Moringa oleífera*.

El ensayo se realizó por triplicado por cada extracto y solución de nanopartículas de Ag y a cada una de las concentraciones establecidas. Se determinó como: Control positivo (Medio PDA); Control negativo (Medio inoculado por *Aspergillus flavus*); Extracto A (Acuoso); Extracto B (Hidroalcohólico) y Solución de Nanopartículas de Ag, cada una a concentraciones de 100, 50 y 25 v/v%.

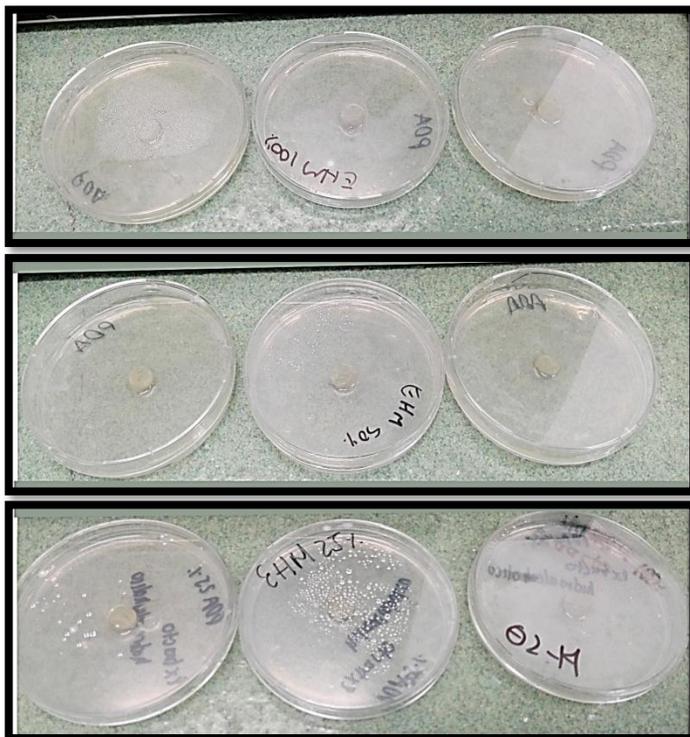
El método consistió en adicionar 5 ml de extracto A, B y NPAg a las cajas Petri con PDA y después se inocularon con un disco de agar que contenía al patógeno de 0.8 cm de diámetro por consiguiente se incubaron a 25°C por 9 días, comprobando la inhibición del crecimiento a las 24, 48, 120, 168 horas.

Figura 17. Prueba de sensibilidad, ensayo por triplicado. A) Solución de nanopartículas de Ag a 100, 50 y 25%. B) Extracto Hidroalcohólico de *Moringa oleífera* a 100, 50 y 25%. C) Extracto acuoso de *Moringa oleífera* a 100, 50 y 25%.

A.



B.



C.



3. RESULTADOS

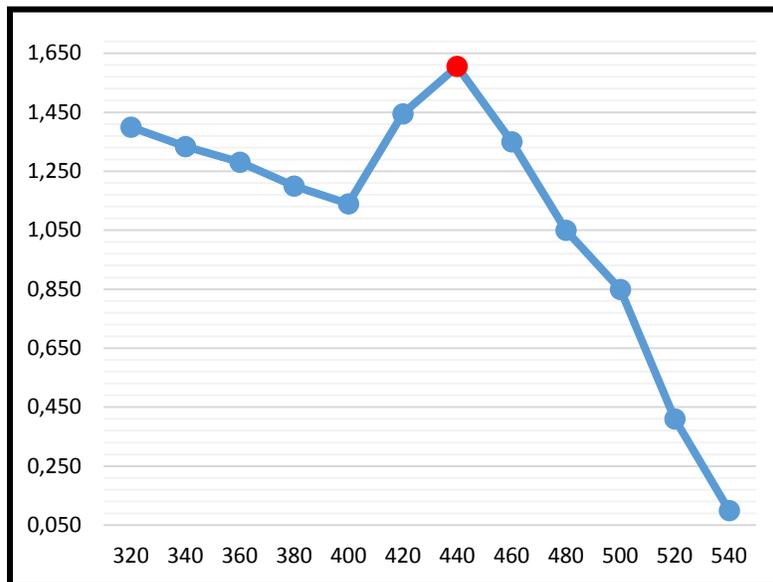
3.1. Valoración del espectro de absorción para el fenómeno de resonancia de plasmones

Se realizaron mediciones de la solución de las nanopartículas de plata obtenidas por síntesis verde mediante el extracto acuoso de *Moringa oleífera*, los cuales se muestran en la tabla 1. Se observó que el pico más alto se ajusta dentro del rango de absorción UV-Visible 430 - 440 lo que demuestra, la formación de NPAg de tamaño mediano y de disgregación adecuada⁽⁸⁰⁾.

Tabla 1. Espectro UV- Visible de la síntesis de nano partículas de plata

Longitud de Onda	Ag+ (NPs)
320	1,400
340	1,334
360	1,281
380	1,200
400	1,140
420	1,445
440	1,605
460	1,350
480	1,050
500	0,850
520	0,410
540	0,100

Grafico 1. Absorbancias en Espectros UV- Visible de nanopartículas de plata por síntesis verde de *Moringa oleífera*.



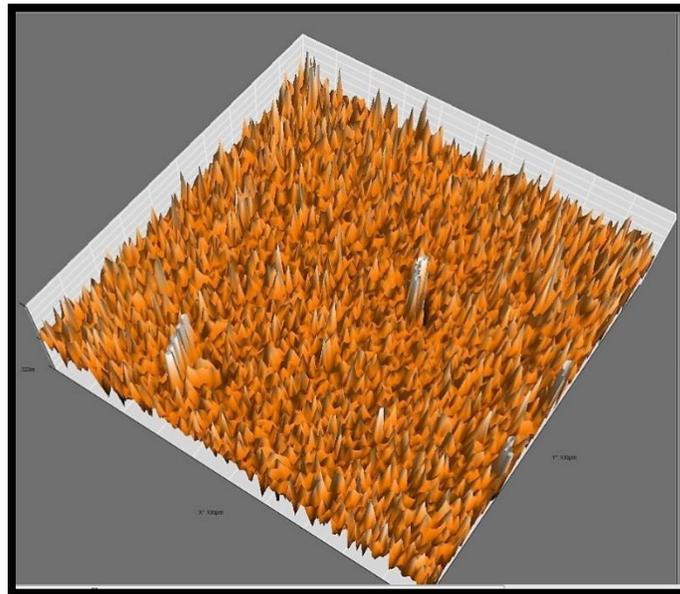
3.2. Caracterización de Nanopartículas de Ag por síntesis verde en el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM) Nano Surf EyeScan 2.

Las características morfológicas, de tamaño y dispersión de las nanopartículas de plata se identifican en las figuras 17 y 18, las cuales fueron evaluadas mediante el uso de microscopia de fuerza atómica por equipo AFM Nano Surf EyeScan 2 en tecnoparque SENA, en la ciudad de Bogotá.

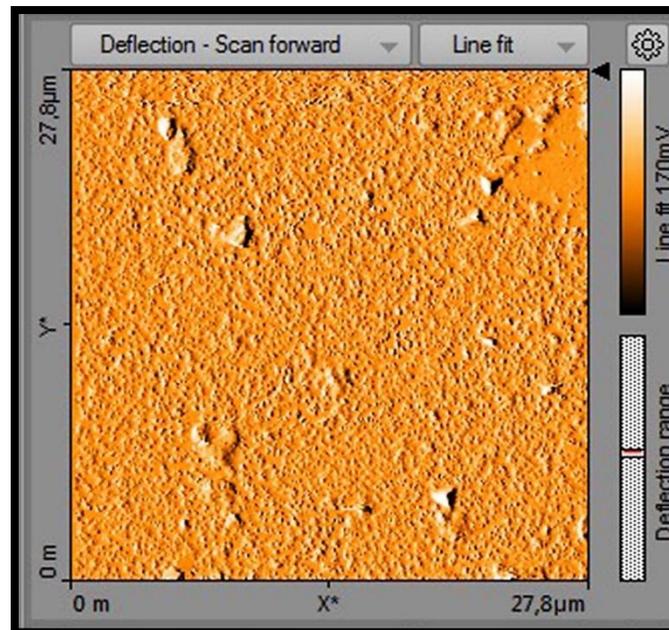
La figura 17. Muestra un plano topográfico en 3D 100 μm y un mapa de color en escala 27,8 μm , de las nanopartículas de plata con distribución homogénea en el campo, tamaño relativamente similar y aparente tamaño esférico. Figura 18. Se muestra un plano topográfico en 3D y mapa de color de acercamiento a una escala de 7.8 μm evidenciando nanopartículas de Ag poli dispersas, tamaño aprox. 50 a 70nm y forma esférica, lo que caracteriza la viabilidad de las nanopartículas.

Figura 17. Visualización microscopía AFMde Nanopartículas de plata. A) Topografía 3D a escala 100 μm B) Mapa de color y (C) Topografía 3D a escala 27.8 μm

A.



B.



C.

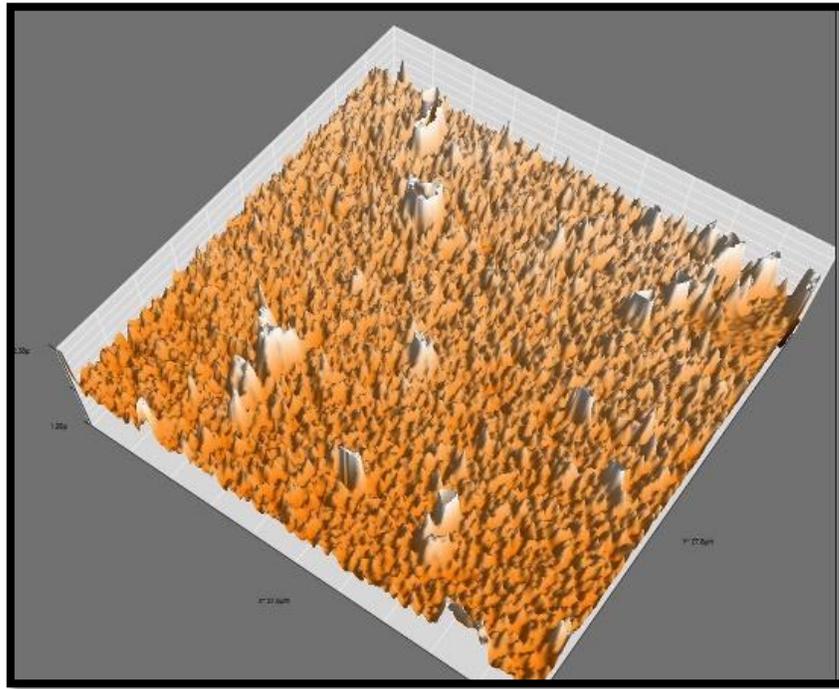
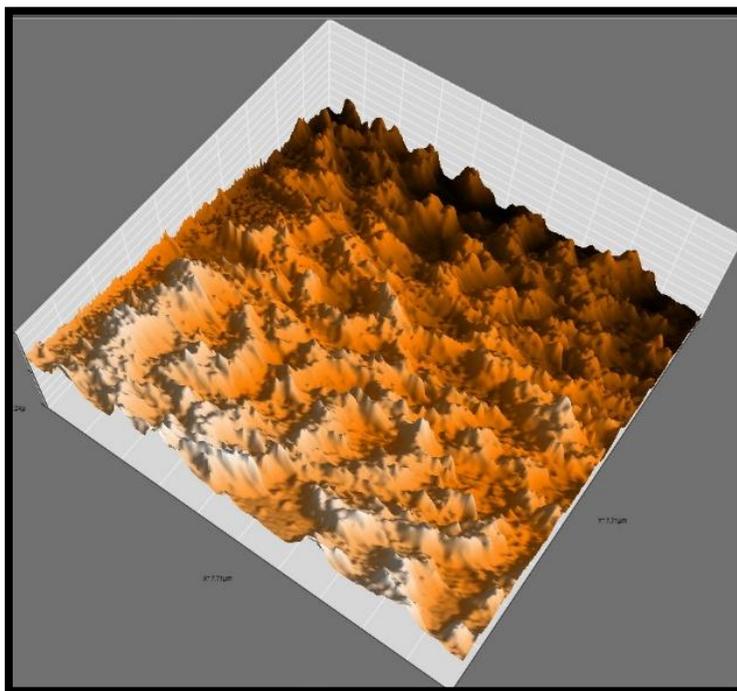
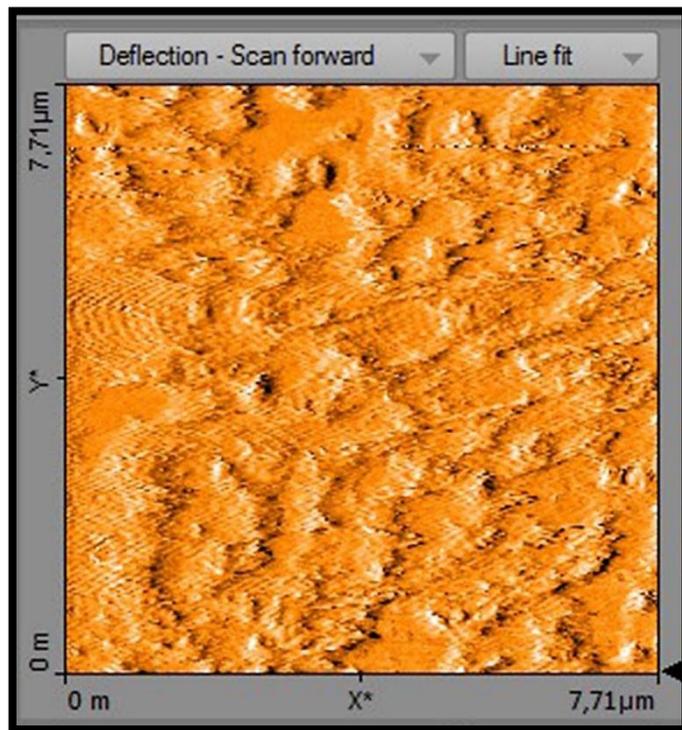


Figura 18. Visualización microscopia AFMde Nanopartículas de plata. A) Topografía 3D y B) Mapa de color Escala 7,8 μm

A.



B.



3.3. Prueba de sensibilidad antimicótica de nanopartículas de Ag por síntesis verde y extractos acuoso e hidroalcohólico de *Moringa oleífera* sobre la cepa de *Aspergillus flavus*.

Después de la inoculación de la cepa de *Aspergillus flavus*, se realizaron ensayos por triplicado en Agar PDA junto con los extractos y la solución de nanopartículas a diferentes concentraciones 100, 50 y 25 v/v%. Las observaciones de la inhibición del crecimiento del hongo, se ejecutaron a las 24, 48, 120, 168 horas, obteniendo mediciones en cm. El efecto antifúngico fue positivo en el medio PDA junto con nanopartículas de plata al 100 y 50 %, como se muestran en la Tabla 2. Al finalizar el tiempo de incubación se hicieron observaciones microscópicas con azul de lactofenol, donde se encontraron características compatibles con el género *Aspergillus*.

Tabla 2. Inhibición de crecimiento en cm de *Aspergillus flavus*, durante 7 días, a temperatura de 25°C

Inhibición de crecimiento en <i>Aspergillus flavus</i> (cm)						
Días	%V/V	Nanopartículas de Ag	Extracto Hidroalcohólico de <i>M. oleífera</i>	Extracto Acuoso de <i>M. oleífera</i>	Control Negativo	Control positivo
1	100	99,2	99,2	99,2	99,2	0
2		99,2	99,2	0	99,2	0
5		99,2	0	0	99,2	0
6		99,2	0	0	99,2	0
7		99,2	0	0	99,2	0
1	50	99,2	99,2	99,2	99,2	0
2		99,2	99,2	0	99,2	0
5		99,2	0	0	99,2	0
6		99,2	0	0	99,2	0
7		99,2	0	0	99,2	0
1	25	99,2	99,2	99,2	99,2	0
2		99,2	99,2	0	99,2	0
5		0	0	0	99,2	0
6		0	0	0	99,2	0
7		0	0	0	99,2	0

Características macroscópicas de las colonias fúngicas en PDA

Medio PDA con %100 y %50 de NPAg: No se obtuvo crecimiento fúngico, el día 5 de incubación el inóculo de 0.8cm de diámetro cambió su color a un café oscuro y al día 7 el inóculo era de color negro.

Medio PDA con %25 de NPAg: Al día 2 se observa colonias planas, delimitadas, aterciopeladas, amarillas con ligero borde blanco.

Medio PDA con 100%, 50%, 25% de Extracto Hidroalcohólico de *M. oleífera*: Del 5 al 7 de incubación se observan colonias planas de aspecto aterciopelado, verdes, amarillas e ilimitadas con ligero borde blanco; Reverso con pigmento blanco.

Medio PDA con 100%, 50% y 25% de Extracto Acuoso de *M. oleífera*: El medio se torna grumoso a las 24 horas de incubación, inculo con colonia plana, verde y ligero borde blanco y a las 48 horas de incubación se hace positivo con crecimiento de colonias planas ilimitadas, algodonosas blancas y ligero pigmento amarillo; El día 5 se observaron colonias planas ilimitadas, pulverulentas, verdosas; El día 7 se observaron colonias algodonosas verdosas con pigmento blanco. Reverso con pigmento blanco.

3.3.1. Tipo de efecto antifúngico en la cepa de *Aspergillus flavus* de nanopartículas de Ag por síntesis verde.

Con el fin de demostrar que tipo de efecto antifúngico tuvieron las nanopartículas de Ag por síntesis verde sobre el hongo, se partió de los medios PDA junto con nanopartículas al 100 y 50%, se tomó el inculo fúngico para sembrarlo en un agar Sabouraud con cloranfenicol y de esta manera determinar si el efecto fue fungicida o fungistático, se incubó a 25°C. El tercer día de incubación se evidenció crecimiento de colonias compatibles con el género, seguidamente se realizó observación microscópica con azul de lactofenol, identificando características morfológicas compatibles con *Aspergillus* spp. Por lo que se concluyó que el efecto antifúngico de las nanopartículas de plata sobre la cepa de *Aspergillus flavus* es fungistático.

3.3.2. Análisis estadístico

Estos resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de tukey y como puede apreciarse, todos los tratamientos difirieron entre sí, los correspondientes al Extracto A y al Extracto B fueron los que no tuvieron efecto inhibitorio total sobre el crecimiento del hongo y tampoco se identificó una varianza entre sus concentraciones; siendo la solución de nanopartículas la que mostró un efecto, en las 5 lecturas realizadas por lo que el porcentaje de confianza para los 3 ensayos es del 95%. Seguido de esto se analizó la solución de nanopartículas entre las concentraciones establecidas 100, 50 y 25%, el cual corroboró que la diferencia se establece en la solución de nanopartículas al 25%, debido a que no logro inhibir el crecimiento fúngico de *Aspergillus flavus*.

Tabla 3. Análisis de varianza de un factor de la concentración al 100% de las 3 soluciones estudiadas

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	496	99,2	0
Columna 2	5	198,4	39,68	2952,192
Columna 3	5	99,2	19,84	1968,128

Origen De Las Variaciones	Suma De Cuadrados	Grados De Libertad	Promedio De Los Cuadrados	F	Probabilidad	Valor Crítico Para F
Entre Grupos	17057,11	2	8528,55466	5,2	0,02363738	3,88529383
Dentro De Los Grupos	19681,28	12	1640,106667			
Total	36738,39	14				

Tabla 4. Prueba de Tukey de la concentración al 100% de las 3 soluciones estudiadas.

	Nanopartículas de plata	Extracto Hidroalcohólico de <i>Moringa oleífera</i>	Extracto Acuoso de <i>Moringa oleífera</i>
100%		59,52	79,36
50%			19,84
25%			

Valor honestamente significativo: 68,27

Con el HDS identificamos que la diferencia en crecimiento está entre el valor de las Nanopartículas de plata y el extracto acuoso de *Moringa oleífera*. También entre el extracto hidroalcohólico de *Moringa oleífera* y el extracto acuoso de *Moringa oleífera*. Adicionalmente, este comportamiento se repite entre los mismos volúmenes para los tres ensayos.

Para el ANOVA de nanopartículas de plata a una concentración de 100%, se establecieron la hipótesis H_0 , donde el promedio de crecimiento es igual en los tres grupos con un 95% de confianza y H_a , donde el promedio de crecimiento en un grupo es distinto con un 95 % de confianza.

Tabla 5. Análisis de varianza de un factor con la concentración al 100% de la solución de Nanopartículas de plata.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	496	99,2	0
Columna 2	5	496	99,2	0
Columna 3	5	198,4	39,68	2952,192

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	11808,768	2	5904,384	6	0,015625	3,885293835
Dentro de los grupos	11808,768	12	984,064			
Total	23617,536	14				

Se acepta hipótesis alterna que sugiere que hay diferencia en crecimiento entre grupos.

Tabla 6. Prueba de Tukey de las diferentes concentraciones de la solución de nanopartículas de plata.

	100	50	25
A		0	59,52
B			59,52
C			

Valor honestamente significativo: 52,88

Con el HDS se acepta la hipótesis alterna que hay al menos un grupo con diferencia y se comprueba que el grupo c expresó diferencias de crecimiento, mientras que las concentraciones al 100% y 50% no muestran diferencias significativas entre ellas en cuanto a la inhibición del crecimiento.

En el ANOVA para el extracto hidroalcohólico de *Moringa oleífera*, los resultados determinaron que se acepta la hipótesis nula (H_0), donde el promedio de crecimiento es igual en los tres grupos con un 95% de confianza.

Tabla 7. Análisis de varianza de un factor con el extracto hidroalcohólico de *Moringa oleífera*.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	5	198,4	39,68	2952,192
Columna 2	5	198,4	39,68	2952,192
Columna 3	5	198,4	39,68	2952,192

Origen De Las Variaciones	Suma De Cuadrados	Grados De Libertad	Promedio De Los Cuadrados	F	Probabilidad	Valor Crítico Para F
Entre Grupos	7,28e-12	2	3,63e-12	1e-15	1	3,88529
Dentro De Los Grupos	35426,3	12	2952,192			
Total	35426,3	14				

DISCUSIÓN

En este proyecto de investigación se caracterizaron nanopartículas de plata por síntesis verde a partir del extracto acuoso de *Moringa oleífera*, utilizando el método del microscopio de fuerza atómica (AFM), posterior a ello se estudió la sensibilidad de dichas nanopartículas de Ag sobre la cepa de *Aspergillus flavus*.

La síntesis de nanopartículas de plata se realizó, usando solución de nitrato de plata (1mM) y extracto acuoso de *Moringa oleífera*, mediante la técnica de agitación durante 2 horas a temperatura ambiente, este método de síntesis tiene ventajas, frente a otras metodologías de obtención, como accesibilidad, bajo costo, significativo desempeño y el beneficio ambiental que destaca la biosíntesis de nanopartículas(13,78). Esto se debe al alto contenido de antioxidantes que contienen las hojas de *Moringa* haciéndolo un excelente agente reductor y estabilizador del ion plata⁽¹¹⁾. A pesar del tiempo que se requiere para realizar la técnica de obtención, se demuestra que la formación de nanopartículas por síntesis verde con plantas de alto contenido de antioxidantes es simple, asequible y amigable con el medio ambiente ya que no genera residuos tóxicos.

La caracterización de las nanopartículas de plata obtenidas se logró con el microscopio de fuerza atómica (AFM), el cual realiza un barrido de la superficie del área a muestrear, despejando variables como profundidad, dispersión y tamaño, obteniendo imágenes 3D, fotografías del campo y graficas de ondas. En este estudio se demostró que la formación de nanopartículas fue estable, por su distribución homogénea sobre la superficie del sustrato, de forma esférica y de tamaño entre un rango de 50 a 70nm, resultados que se comparan con los obtenidos por Prasad y Elumalai en el 2011⁽¹³⁾ en el cual obtuvieron nanopartículas de plata por síntesis verde a partir del extracto acuoso de *Moringa oleífera*, caracterizándose con la tecnología del microscopio electrónico de transmisión revelando nanopartículas esféricas de 57nm aproximadamente y con una amplia distribución.

Krishnaraj et al⁽⁸¹⁾. describen nanopartículas de plata por síntesis verde, utilizando nitrato de plata en diferentes concentraciones molares (1mM, 2mM y 3mM) con el extracto de las hojas de *Malva crispa* por la técnica de microondas, para su posterior caracterización por diferentes metodologías, el microscopio de fuerza atómica revelo nanopartículas de plata de forma esférica en un tamaño de 5 a 50nm, con una amplia distribución en toda la muestra.

En contraste, con la formación química, el ensayo de Flores⁽⁶³⁾ en el 2014 revela que la caracterización de las nanopartículas de plata, por el microscopio de fuerza atómica, de forma esférica, agregadas y de tamaño 100 - 300nm. Otros estudios exponen que la síntesis química y física genera nanopartículas de diferentes formas, de gran tamaño y de forma agregada ⁽⁶⁵⁾. Esta comparación refleja ventaja de la síntesis verde como el tamaño de las nanopartículas y su distribución homogénea, características que se le atribuyen a las nanopartículas de plata con buen potencial antimicrobiano^(82,83).

Se evaluaron los extractos de *Moringa oleífera*, los cuales fueron probados a diferentes concentraciones 100%, 50% y 25%, frente a la cepa de *Aspergillus flavus* evidenciando que la inhibición de crecimiento duro 48 horas, lo que se atribuye al desarrollo del hongo y no a los componentes químicos de *Moringa oleífera*. Este resultado se relaciona con el estudio de Sánchez⁽¹⁵⁾ donde probaron la inhibición del crecimiento y la producción de toxinas del género *Agave* en cepas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, a partir de extractos acuosos, etanólicos y metanólicos de diferentes partes de la planta, evidenciando que solo los extractos alcohólicos de la inflorescencia tienen un efecto inhibitorio en el crecimiento de las cepas fúngicas probadas. Adicionalmente, Moreno et al⁽¹⁶⁾. en su investigación evaluaron la actividad fungicida de extractos alcohólicos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. La evaluación de la actividad se realizó mediante dos técnicas; la técnica del pozo en agar con la adición de extracto en diferentes concentraciones; y la técnica

dilución de extracto en agar, consistió en hacer una mezcla homogénea entre los extractos y el agar papadextrosa (PDA).

Los resultados arrojados por ambas técnicas permitieron detectar los efectos antifúngicos que presentaron los extractos; destacando especialmente los etanólicos y metanólicos, ya que con ellos se lograron inhibiciones de hasta el 100% en ambas cepas, mostrando Concentraciones Mínimas Inhibitorias que van de 3 a 7 mg/ml, a diferencia del extracto acético que arrojó un efecto antifúngico pobre.

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente referenciados, se evidencia que los extractos alcohólicos, tienen un efecto fungicida contra *Aspergillus flavus* y otros mohos, sin embargo el estudio de Sanchez revela que no todas las partes de la planta en estudio ejercen dicho efecto; a diferencia con el ensayo de Moreno donde las hojas de la planta *Larrea tridentata* L. sí tuvieron un efecto antifúngico, por lo que se resuelve que no todas las plantas y sus partes, tienen un efecto antifúngico y por consiguiente que el tipo de extracto influye en el efecto fúngico. Como el extracto acuoso e hidroalcohólico no generaron inhibición de crecimiento en ninguna de las concentraciones se podría inferir que *Aspergillus flavus* tiene algún mecanismo de resistencia sobre la acción de *Moringa oleífera*.

El efecto antifúngico de las nanopartículas de Ag por síntesis verde sobre cepas de *Aspergillus flavus* es poco estudiado, por lo que este ensayo es el primero que describe el uso de nanopartículas de plata por síntesis verde a partir de *Moringa oleífera* sobre un hongo con importancia clínica y causante de problemas en post cosecha como el *Aspergillus flavus*, la metodología que se utilizó demostró la sensibilidad antimicótica de las nanopartículas de plata a la cepa de *Aspergillus flavus*, por la aparente inhibición de crecimiento durante los 9 días que duró el estudio, en las 3 concentraciones que se establecieron para el ensayo se evidenció que la concentración del 25% tuvo una inhibición durante los 5 primeros días de incubación, por lo que se resuelve que la concentración de nanopartículas de plata es determinante para el efecto antimicótico. En el estudio de Raut et al.

en el 2014 describen que la concentración inhibitoria mínima es de 7.0 +/- 2 µg/ml por parte de discos sensibilizados con nanopartículas de plata por síntesis verde a temperatura ambiente expuestas a la luz solar durante 5 minutos, a partir de *Withania somnifera* sobre una cepa de *Aspergillus flavus*. Adicionalmente establecieron que la exposición a la luz solar reduce el tiempo de espera para la formación de nanopartículas de plata por síntesis verde⁽¹⁷⁾.

Con el fin de comparar la acción fungicida de las nanopartículas de plata por síntesis verde con los antimicóticos comerciales Aziz et al. demostró en sus ensayos que la síntesis verde microbiana de nanopartículas de plata por parte de *Mucor hiemalises* viable y tienen un efecto similar a los antifúngicos comerciales como la anfotericina B, fluconazol y ketoconazol. Utilizaron la técnica de difusión de disco en agar a concentraciones de 15, 30, 45 y 60 µg/ml evidenciando que la concentración inhibición de crecimiento mínima sobre *Aspergillus flavus* similar a la concentración de los antimicóticos comerciales. Adicionalmente su estudio comprobó que se genera un efecto sinérgico cuando se mezcla la solución de nanopartículas de plata con los antifúngicos⁽⁸⁴⁾. Por último en la amplia búsqueda bibliográfica, se encontraron otros artículos donde se corrobora el efecto antifúngico de las nanopartículas de plata por síntesis verde a partir de diferentes plantas reconocidas por su alto contenido de antioxidantes ^(85,86).

Con él fin de identificar el tipo de efecto antifúngico que genero las nanopartículas de plata sobre *Aspergillus flavus*, se realizó la prueba de germinación posterior a la inhibición la cual consistió en sembrar el inóculo de los cultivos que contenían nanopartículas de plata en una concentración de 100 y 50, donde no se observó crecimiento micelial, en un agar sabouraud después se incubo a 25°C y pasados 3 días se observó crecimiento micelial, confirmándose la presencia de *Aspergillus* spp, por microscopia. Por ello se establece que para este ensayo la solución de nanopartículas de plata al 100% y 50% tienen una acción fungistática sobre la cepa estudio de *Aspergillus flavus*.

Para concluir, se debe realizar la caracterización de nanopartículas de otros compuestos como el zinc, oro, cobre, sílice, entre otros, a través de síntesis verde utilizando *Moringa oleífera*. Es importante repetir este estudio utilizando extractos etanólicos de *Moringa oleífera*, para comparar los resultados con los estudios descritos anteriormente y así comprobar el efecto antifúngico, para descartar o comprobar un efecto fungicida se deben realizar pruebas con el extractos acuosos a diferentes concentraciones, teniendo en cuenta que la literatura describe que los componentes varían según la producción y la recolección de la planta. Con referencia a los resultados obtenidos en los estudios de Sanchez y Moreno, sería importante comparar la acción antifúngica de diferentes plantas medicinales a partir del extracto acuoso, alcohólico y síntesis de nanopartículas en hongos oportunistas, evidenciando si el efecto antifúngico varía según la planta utilizada o por lo contrario la variable es el tipo de efecto antifúngico.

CONCLUSIONES

- Se obtuvieron nanopartículas de plata por síntesis verde a partir del extracto acuoso de *Moringa oleífera*, comprobando que sus componentes antioxidantes funcionan como agentes reductores del ion plata y esas nanopartículas tuvieron forma y distribución adecuada para lo que la literatura sugiere como un nanocompuesto antimicrobiano.
- En este estudio se comprobó la sensibilidad antifúngica de las nanopartículas de plata en la cepa de *Aspergillus flavus*, evidenciando que el efecto más positivo se observó a volúmenes de 100 y 50% a diferencia del 25% el cual tuvo crecimiento a los 5 días de incubación.
- Este estudio evidencio que la sensibilidad antimicótica de los extractos acuoso e hidroalcohólico de *Moringaoleífera* es nula frente a la cepa de *Aspergillus flavus*, pues la cantidad de compuestos en las plantas difieren en sus condiciones de pre y post cosecha. Adicionalmente la literatura pone en evidencia que los extractos a partir de elementos alcohólicos tienen un mejor efecto antifúngico
- En este ensayo se comprobó una acción fungistática por parte de las nanopartículas Ag por síntesis verde sobre la cepa de *Aspergillus flavus*, pues en un posterior ensayo, el estadio de medición mostro un crecimiento compatible con el género *Aspergillus* los tres días de incubación. Por lo que se sugiere realizar ensayos con nanopartículas de Ag a diferentes concentraciones y durante más tiempo.

REFERENCIAS

1. Krishnan S, Manavathu EK, Chandrasekar PH. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. *Mycoses*. 1 de mayo de 2009;52(3):206-22.
2. Pemán J, Salavert M. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 1 de febrero de 2012;30(2):90-8.
3. Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia*. diciembre de 2008;166(5-6):369-83.
4. Gupta AK, Versteeg SG, Shear NH. Onychomycosis in the 21st Century: An Update on Diagnosis, Epidemiology, and Treatment. *J Cutan Med Surg*. diciembre de 2017;21(6):525-39.
5. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis*. diciembre de 2017;17(12):e383-92.
6. Silva SE da. Desenvolvimento de nanomateriais para aplicação no tratamento de infecções fúngicas [PhD Thesis]. 2013.
7. Zurita J. Infecciones micóticas: esas enfermedades relegadas de la salud pública. *Bionatura*. 15 de agosto de 2017;2(3):344-7.
8. Camacho Polo JD, Deschamps Mercado LA, Herrera Barros AD. Síntesis de nanopartículas de plata y modificación con pulpa de papel para aplicación antimicrobial [PhD Thesis]. Universidad de Cartagena; 2013.
9. Tran QH, Nguyen VQ, Le A-T. Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol*. 14 de mayo de 2013;4(3):033001.

10. Bonal Ruiz R, Rivera Odio RM, Bolívar Carrión E. Moringa oleifera: una opción saludable para el bienestar. MEDISAN. 12 de agosto de 2012;16(10):1596
11. García Hernández R. Estudio sobre la capacidad antioxidante de extractos de hoja de Moringa oleifera de diferente origen geográfico [Experimental]. [Galicia y Ginea]: De Coruña; 2017.
12. Enrique A. Lopez SDS. El microscopio de fuerza atómica: métodos y aplicaciones. Revista de la universidad del valle de Guatemala. 2014;28:14-23.
13. Prasad T, Elumalai E. Biofabrication of Ag nanoparticles using Moringa oleifera leaf extract and their antimicrobial activity. Asian Pac J Trop Biomed. diciembre de 2011;1(6):439-42.
14. Ayanbimpe GM, Ojo TK, Afolabi E, Opara F, Orsaah S, Ojerinde OS. Evaluation of extracts of *Jatropha curcas* and *Moringa oleifera* in culture media for selective inhibition of saprophytic fungal contaminants. J Clin Lab Anal. 2009;23(3):161-4.
15. Sanchez Garcia E. Inhibición del crecimiento y la producción de toxinas de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* por extractos de plantas del género *Agave* [Doctoral]. [México]: UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON; 2002.
16. Moreno-Limón S, González-Solís LN, Salcedo-Martínez SM, Cárdenas-Ávila ML, Perales-Ramírez A. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. Polibotánica. 2011;(32):193–205.
17. Raut RW, Mendhulkar VD, Kashid SB. Photosensitized synthesis of silver nanoparticles using *Withania somnifera* leaf powder and silver nitrate. J Photochem Photobiol B. 5 de marzo de 2014;132:45-55.
18. Gonzalez salgado A. Diagnóstico Y Control De Especies De *Aspergillus* Productoras De Ocratoxina A. [España, Madrid]: Universidad Complutense De

Madrid; 2009 [citado 17 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/10545/1/T30977.pdf>

19. Piontelli E. Aportes morfotaxonómicos en el género *Aspergillus* Link: claves para las especies ambientales y clínicas más comunes. *Bol Micológico*. 2008;23.
20. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases - 7th Edition [Internet]. [citado 10 de febrero de 2018]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/mandell-douglas-and-bennetts-principles-and-practice-of-infectious-diseases/mandell/978-1-4557-0872-7>
21. Maschmeyer G, Haas A, Cornely OA. Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. *Drugs*. 2007;67(11):1567-601.
22. Garcia-Vidal C, Carratalà J. Patogenia de la infección fúngica invasora. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. :151-8.
23. Perrone G, Susca A, Cozzi G, Ehrlich K, Varga J, Frisvad JC, et al. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Stud Mycol*. 2007;59:53-66.
24. Pariza MW, Johnson EA. Evaluating the Safety of Microbial Enzyme Preparations Used in Food Processing: Update for a New Century. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1 de abril de 2001;33(2):173-86.
25. Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnol Adv*. mayo de 2007;25(3):244-63.
26. Instituto Nacional de seguridad e higiene del trabajo. *Aspergillus spp*. *Data Bio*; 2012.
27. Abarca ML. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Rev Iberoam Micol*. 2000;17(3):S79–S84.

28. Carrillo L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Univ Nac Salta Argent. 2003;118.
29. Varga J, Juhász Á, Kevei F, Kozakiewicz Z. Molecular Diversity of Agriculturally Important *Aspergillus* Species. Eur J Plant Pathol. 1 de junio de 2004;110(5-6):627-40.
30. Perrone G, Varga J, Susca A, Frisvad JC, Stea G, Kocsubé S, et al. *Aspergillus uvarum* sp. nov., an uniseriate black *Aspergillus* species isolated from grapes in Europe. Int J Syst Evol Microbiol. Abril de 2008; 58(Pt 4):1032-9.
31. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev. Julio de 2003; 16(3)
32. Frisvad JC, Andersen B, Thrane U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. Mycol Res. 1 de febrero de 2008; 112(2):231-40.
33. Gonçalves S. Global Aspects of Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus* with Focus on Latin American Countries. J Fungi. 10 de febrero de 2017; 3(4):5.
34. Snelders E, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Verweij PE, Melchers WJG. Azole resistance profile of amino acid changes in *Aspergillus fumigatus* CYP51A based on protein homology modeling. Antimicrob Agents Chemother. Junio de 2010; 54(6):2425-30.
35. Chowdhary A, Sharma C, Hagen F, Meis JF. Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms. Future Microbiol. 2014; 9(5):697-711.
36. Rivero-Menéndez O, Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. Triazole Resistance in *Aspergillus* spp.: A Worldwide Problem? J Fungi. 4 de julio de 2016; 2(4):21.

37. Horn BW, Moore GG, Carbone I. Sexual reproduction in *Aspergillus flavus*. *Micología*. Mayo de 2009; 101(3):423-9.
38. Amaike S, Keller NP. *Aspergillus flavus*. *Annu Rev Phytopathol*. 8 de septiembre de 2011; 49(1):107-33.
39. *Aspergillus flavus* | Acerca de *Aspergillus flavus* | [Internet]. [Citado 18 de febrero de 2018]. Disponible en: <https://www.aspergillusflavus.org/aflavus/>
40. Hedayati MT, Pasqualotto AC, Warn PA, Bowyer P, Denning DW. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology*. 1 de junio de 2007; 153(6):1677-92.
41. Restrepo-Gualteros SM, Jaramillo-Barberi LE, Rodríguez-Martínez CE, Camacho-Moreno G, Nino G. Aspergilosis invasiva pulmonar: reporte de un caso. *Biomédica* [Internet]. 2 de febrero de 2015 [citado 8 de febrero de 2018]; 35(2). Disponible en: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2357>
42. Hadrich I, Makni F, Sellami H, Cheikhrouhou F, Sellami A, Bouaziz H, et al. Invasive aspergillosis: epidemiology and environmental study in haematology patients (Sfax, Tunisia). *Mycoses*. 1 de septiembre de 2010; 53(5):443-7.
43. LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN [Internet]. *Diario Oficial de la Unión Europea*; 2006 [citado 18 de febrero de 2018]. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2006/364/L00005-00024.pdf>
44. PATRICK R. MURRAY, KEN S. ROSENTHAL, MICHAEL A. PFALLER. *Microbiología.Médica*. Sexta. Barcelona, España: ELSEVIER; 2009.
45. Acuña C, Díaz G, Espitia M. AFLATOXINAS EN MAÍZ REPORTE DE CASO EN LA COSTA ATLÁNTICA COLOMBIANA.pdf. *Lab Toxicol Fac Med Zootec*. 2005; 52:156-62.

46. Welsh O, Arenas R. Subcutaneous mycoses. *Clin Dermatol*. 1 de julio de 2012; 30(4):367-8.
47. Carrasco-Zuber JE, Navarrete-Dechent C, Bonifaz A, Fich F, Vial-Letelier V, Berroeta-Mauriziano D. Afectación cutánea en las micosis profundas: una revisión de la literatura. Parte 1: micosis subcutáneas. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. Diciembre de 2016; 107(10):806-15.
48. Samaila MO, Abdullahi K. Cutaneous manifestations of deep mycosis: An experience in a tropical pathology laboratory. *Indian J Dermatol*. 5 de enero de 2011; 56(3):282.
49. Micro Médica: Hialohifomicosis [Internet]. [Citado 9 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/page/view.php?id=100869>
50. Fortún J, Meije Y, Fresco G, Moreno S. Aspergilosis. Formas clínicas y tratamiento. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. : 201-8.
51. Patterson TF, Thompson GR, Denning DW, Fishman JA, Hadley S, Herbrecht R, et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 15 de agosto de 2016; 63(4):e1-60.
52. Fortún J, Carratalá J, Gavaldá J, Lizasoain M, Salavert M, de la Cámara R, et al. Recomendaciones sobre el tratamiento de la enfermedad fúngica invasiva por *Aspergillus* spp. y otros hongos filamentosos de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. Junio de 2011; 29(6):435-54.
53. Cuervo-Maldonado SI, Gómez-Rincón JC, Rivas P, Guevara FO. Actualización en Aspergilosis con énfasis en Aspergilosis invasora. *Infectio*. 2010; 14:131–144.

54. Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Spruel AB, Venselaar H, et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med*. 29 de octubre de 2009; 361(18):1760-7.
55. Bochud P-Y, Chien JW, Marr KA, Leisenring WM, Upton A, Janer M, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and aspergillosis in stem-cell transplantation. *N Engl J Med*. 23 de octubre de 2008; 359(17):1766-77.
56. Segal BH. Aspergillosis. *N Engl J Med*. 30 de abril de 2009; 360(18):1870-84.
57. Kousha M, Tadi R, Soubani AO. Pulmonary aspergillosis: a clinical review. *Eur Respir Rev*. 1 de septiembre de 2011; 20(121):156-74.
58. Ma JE, Yun EY, Kim YE, Lee GD, Cho YJ, Jeong YY, et al. Endobronchial Aspergilloma: Report of 10 Cases and Literature Review. *Yonsei Med J*. 1 de septiembre de 2011; 52(5):787-92.
59. González-Vicent M, Díaz M a., Colmenero I, Sevilla J, Madero L. Primary gastrointestinal aspergillosis after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation: an unusual presentation of invasive aspergillosis. *Transpl Infect Dis*. 1 de junio de 2008; 10(3):193-6.
60. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 15 de junio de 2008; 46(12):1813-21.
61. Tracy M, Okorie C, Foley E, Moss R. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis. *J Fungi*. 6 de junio de 2016; 2(4):17.

62. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann J-W, et al. Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*. 8 de agosto de 2002; 347(6):408-15.
63. Flores CY. Nanopartículas de plata con potenciales aplicaciones en materiales implantables: síntesis, caracterización fisicoquímica y actividad bactericida [Internet] [Tesis]. Facultad de Ciencias Exactas; 2014 [citado 14 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10915/34946>
64. Comisión Europea. Comunicación de la comisión al parlamento europeo, conseja y al comité económico y social europeo. Segunda revisión de la normativa sobre los nanomateriales [Internet]. 2012 [citado 14 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52012DC0572&from=ES>
65. Monge M. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. En: *Anales de Química*. 2014.
66. Ávalos A, Haza A, Morales P. Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Rev Complut Cienc Vet* [Internet]. 3 de diciembre de 2013 [citado 14 de febrero de 2018]; 7(2). Disponible en: <http://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/view/43408>
67. Martínez FM, Zuñiga E, Sánchez Lafarga AK. Método de síntesis de nanopartículas de plata adaptable a laboratorios de docencia relacionado con la nanotecnología. *Mundo Nano Rev Interdiscip En Nanociencia Nanotecnología*. 2013; 6(10).
68. Ahmed S, Ahmad M, Swami BL, Ikram S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *J Adv Res*. Enero de 2016; 7(1):17-28.

69. Park Y. A New Paradigm Shift for the Green Synthesis of Antibacterial Silver Nanoparticles Utilizing Plant Extracts. *Toxicol Res.* 30 de septiembre de 2014; 30(3):169-78.
70. Hebbalalu D, Lalley J, Nadagouda MN, Varma RS. Greener Techniques for the Synthesis of Silver Nanoparticles Using Plant Extracts, Enzymes, Bacteria, Biodegradable Polymers, and Microwaves. *ACS Sustain Chem Eng.* Julio de 2013; 1(7):703-12.
71. Canett-Romero R, Arvayo-Mata KL, Ruvalcaba-Garfias NV. Aspectos tóxicos más relevantes de *Moringa oleifera* y sus posibles daños. *Biotecnia.* 2014; 16(2):36–43.
72. Mata E. *Moringa oleifera*, un potencial antioxidante y descontaminante [Internet]. NewsNet Conacyt. [Citado 14 de febrero de 2018].
73. Mathur BS. *Moringa Book* [Internet]. Trees for Life; 2005. Disponible en: <https://treesforlife.org/our-work/our-initiatives/moringa/moringa-book>
74. Hernández RG. Estudio sobre la capacidad antioxidante de extractos de hoja de *Moringa oleifera* de diferente origen geográfico. : 27.
75. Fitriana WD, Ersam T, Shimizu K, Fatmawati S. Antioxidant Activity of *Moringa oleifera* Extracts. *Indones J Chem.* 2 de diciembre de 2016; 16(3):297.
76. Siddhuraju P, Becker K. Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. *J Agric Food Chem.* 1 de abril de 2003; 51(8):2144-55.
77. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins Byrne D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J Food Compos Anal.* Septiembre de 2006; 19(6-7):669-75.

78. Pedroso ATR, Arrebato MAR, Baños SB, Triana AC, González DR. Actividad antifúngica de extractos de Acacia farnesiana sobre el crecimiento in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Rev Científica UDO Agríc. 2012; 12(1):91–96.
79. Lidia Yasmin Canel Monterroso. Actividad Antimicrobiana Y Antimicótica De Los Extractos De Cinco Especies De Plantas Del Género Vernonia Nativas Del Sur-Occidente De Guatemala.pdf [Experimental]. [México]: Universidad de San Carlos de Guatemala.;
80. Kathiravan V, Ravi S, Ashokkumar S, Velmurugan S, Elumalai K, Khatiwada CP. Green synthesis of silver nanoparticles using *Croton sparsiflorus* morong leaf extract and their antibacterial and antifungal activities. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. Marzo de 2015; 139:200-5.
81. Krishnaraj C, Harper SL, Choe HS, Kim K-P, Yun S-I. Mechanistic aspects of biologically synthesized silver nanoparticles against food- and water-borne microbes. Bioprocess Biosyst Eng. Octubre de 2015; 38(10):1943-58.
82. Durán N, Durán M, de Jesus MB, Seabra AB, Fávaro WJ, Nakazato G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. Abril de 2016; 12(3):789-99.
83. Rivera LEC, Ramos AP. Actividad antimicótica de nanopartículas. 2014; 7(12):13.
84. Aziz N, Pandey R, Barman I, Prasad R. Leveraging the Attributes of *Mucor hiemalis*-Derived Silver Nanoparticles for a Synergistic Broad-Spectrum Antimicrobial Platform. Front Microbiol [Internet]. 15 de diciembre de 2016 [citado 15 de marzo de 2018]; 7. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5156874/>

85. Xu Y, Gao C, Li X, He Y, Zhou L, Pang G, et al. *In Vitro* Antifungal Activity of Silver Nanoparticles Against Ocular Pathogenic Filamentous Fungi. *J Ocul Pharmacol Ther.* Marzo de 2013; 29(2):270-4.
86. Pasupuleti VR, Prasad TNV, Shiekh RA, Balam SK, Narasimhulu G, Reddy CS, et al. Biogenic silver nanoparticles using *Rhinacanthus nasutus* leaf extract: synthesis, spectral analysis, and antimicrobial studies. *Int J Nanomedicine.* 2013; 8:3355-64.