

Nanopartículas de plata de *Borjoia patinoi* y su efecto in vitro sobre biopelículas de *Candida albicans*



Revista EIA
ISSN 1794-1237
e-ISSN 2463-0950
Año XIX/ Volumen 20/ Edición N.39
Enero-Junio de 2023
Reia3918 pp. 1-13

Publicación científica semestral
Universidad EIA, Envigado, Colombia

PARA CITAR ESTE ARTÍCULO / TO REFERENCE THIS ARTICLE /

Gomez-Garzón, M.; León Enciso, J.;
Ramirez, C.; Betancourt, C.

Nanopartículas de plata de *Borjoia patinoi* y su efecto in vitro sobre biopelículas de *Candida albicans*.

Revista EIA, 20(39), Reia3918.
pp. 1-13.

<https://doi.org/10.24050/reia.v20i39.1645>

✉ Autor de correspondencia:

Gomez-Garzón, M. (Mauricio)
Profesor Titular. Ciencias Básicas.
Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud.
Correo electrónico:
mgomez@fucsah.edu.co

Recibido: 21-03-2022

Aceptado: 12-09-2022

Disponible online: 01-01-2023

✉ MARCELA GOMEZ-GARZÓN¹
JEANNETTE LEÓN ENCISO¹
CRISTEL A. RAMIREZ²
CRISTIAN C. BETANCOURT²

1. Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud
2. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Resumen

Introducción

Candida albicans es capaz de generar infecciones relacionadas a dispositivos médicos al colonizarlos y formar biopelículas. Los tratamientos convencionales fracasan al no poder entrar eficientemente a la biopelícula.

Métodos

Se prepararon nanopartículas de plata (NPsAg) de *Borjoia patinoi* mediante el método de síntesis verde y se evaluó su efecto sobre biopelícula de *Candida albicans* pre-formada y post-formada mediante la realización de MTT, y visualización microscopía de coloraciones de Gram y Blanco de Calcoflúor y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Resultados

Se generaron por síntesis verde NPsAg de forma esférica y tamaño de 20-60nm. La concentración mínima inhibitoria sétil 50 y 80 de la NPsAg fue >2 µg/mL sobre biopelículas pre-formadas y ya establecidas de *Candida albicans*. Microscópicamente bajo todas las coloraciones y Microscopía Electrónica de Barrido detectamos la reducción de biopelículas pre-formadas e inhibición en la formación de nuevas biopelículas al ser tratados con las NPsAg. Por SEM se observaron cambios en la pared de las levaduras.

Conclusiones

Se encontró que las nanopartículas de *Borjoia patinoi* inhiben la formación de biopelículas y destruye las biopelículas ya establecidas. Observamos la deformación en la pared de las levaduras *C. albicans* por SEM al ser sometidas a NPsAg.

Palabras clave: *Candida albicans*; Biopelículas; Nanopartículas de plata; *Borjoia patinoi*

Silver nanoparticles from *Borojoa patinoi* and their in vitro effect on *Candida albicans* biofilms

Abstract

Introduction

Candida albicans is capable of generating infections related to medical devices by colonizing them and forming biofilms. Conventional treatments fail because they cannot efficiently enter the biofilm.

Methods

Silver nanoparticles (NPsAg) from *Borojoa patinoi* were prepared by the green synthesis method and their effect on pre-formed and post-formed *Candida albicans* biofilm was evaluated by performing MTT, and microscopy visualization of Gram and White stains. Calcofluor and Scanning Electron Microscopy (SEM).

Results

Green NPsAg with a spherical shape and a size of 20-60nm were generated by synthesis. The sessile minimum inhibitory concentration 50 and 80 of NPsAg was $>2 \mu\text{g/mL}$ on pre-formed and established biofilms of *Candida albicans*. Microscopically under all staining and Scanning Electron Microscopy we detect the reduction of pre-formed biofilms and inhibition in the formation of new biofilms when treated with NPsAg. By SEM, changes in the yeast wall were observed.

Conclusions

Borojoa patinoi nanoparticles were found to inhibit biofilm formation and destroy already established biofilms. We observed the deformation in the wall of *C. albicans* yeasts by SEM when subjected to NPsAg.

Keywords: *Candida albicans*; Biofilms; Silver nanoparticles; *Borojoa patinoi*

1. Introducción

Candida albicans es una levadura que hace parte de la microbiota humana en la cavidad bucal, el tracto gastrointestinal, la vagina y la piel. Por su calidad de patógeno oportunista puede causar infecciones invasivas graves y está asociado a una alta morbilidad y mortalidad (Vallabhaneni *et al.*, 2016). El cateterismo y la nutrición parenteral se han asociado a los episodios de candidemias más graves y agresivos, debido a la aparición de condiciones favorables para el desarrollo de biopelículas de *Candida* (Rajendran *et al.*, 2016) in particular the impact of biofilm formation. *Candida* bloodstream isolates (n = 280).

Las biopelículas son estructuras complejas, compuestas por células agrupadas que se adhieren a superficies inmóviles o biológicas y se recubren con una matriz extracelular de su propia producción, en su interior se encuentran canales de agua que transportan nutrientes y oxígeno a las capas internas (Seneviratne, Jin and Samaranayake, 2008; Magana *et al.*, 2018; Le Mauff, 2020).

La formación de biopelículas de *C. albicans* se da en tres pasos, durante la fase inicial (alrededor de 11 h), las células de levadura se adhieren a las superficies e inician la diferenciación en hifas. En la etapa intermedia (las siguientes 19 h), las células completan su diferenciación y comienza la secreción de exopolisacáridos. Finalmente, durante la etapa de la maduración, la biopelícula se vuelve más gruesa por acumulación de matriz extracelular en la que se involucra una densa red de hifas. La formación y dispersión de células de levadura a partir de estas biopelículas maduras reinicia el ciclo de infección y formación de biopelículas (Seneviratne, Jin and Samaranayake, 2008; Uppuluri *et al.*, 2010).

Las biopelículas ayudan a evadir los mecanismos inmunes del huésped, resistir el tratamiento antifúngico y la presión competitiva de otros microorganismos al facilitar la captura de nutrientes y permitir cooperación metabólica gracias a la comunicación célula a célula que se presenta (Lukaszuk, Krajewska-Kulak and Kulak, 2017; Silva *et al.*, 2017). La nanotecnología es una alternativa novedosa, las nanopartículas metálicas de magnesio, titanio, cobre, plata y oro, presentan propiedades antimicrobianas, antivirales y antifúngicas. Sus propiedades antimicrobianas se deben a la capacidad que poseen para desorganizar la estructura de la membrana, formar poros en la pared celular bacteriana, inhibir o alterar la biopelícula, entre otras

(Busi and Rajkumari, 2019). La síntesis verde de nanopartículas de plata utilizando productos verdes orgánicos reduce su toxicidad, las hace ecológicas, reduce sus efectos secundarios y disminuye el costo de producción (Gómez, 2018; Mousavi *et al.*, 2018). El fruto de *Borojoa patinoi* (borojó) es utilizado en América del Sur como cicatrizante y vigorizante sexual. Su alto contenido de compuestos fenólicos le confiere propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana (Lizcano *et al.*, 2010; Sotelo D, Casas F and Camelo M, 2010; Chaves-López *et al.*, 2018) bark, root, fruit and/or stem were prepared as infusions, as are traditionally used in popular medicine. Total phenols ranged from 0.8 to 22.2mg gallic acid equivalents/g and flavonoids from 0.0 to 10.2mg catechin equivalents/g, by using Folin-Ciocalteu and aluminium chloride colourimetric methods. Differences were observed in phenol and flavonoid contents at the organic level, the leaf presenting greater values than the stem. All the extracts showed different degrees of antioxidant activity with TEAC, 1.1 up to 117.4 and ORAC, 7.8 up to 359.1 μmol Trolox equivalents/g. These values correlated with total phenol content ($r^2=0.90$). El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de nanopartículas de plata (NPsAg) obtenidas por síntesis verde de *Borojoa patinoi* sobre biopelículas de *Candida albicans*.

2. Materiales y métodos

Producción y caracterización de nanopartículas de plata (NPsAg)

NPsAg se obtuvieron por síntesis verde a partir de extracto comercial de *Borojoa patinoi* de Laboratorios Phitother. Brevemente, se prepararon mezclando AgNO_3 5 mM en extracto de *Borojoa patinoi* al 2% p/v a 25°C, en oscuridad hasta día 60 (Gómez-Garzón *et al.*, 2021).

Los espectros UV-vis de la mezcla de reacción se midieron periódicamente en un espectrómetro UV-Vis Thermo Scientific Genesys 10 entre 200 nm y 1100 nm, operado a una resolución de 3 nm.

Se purificaron las NPsAg con lavados por centrifugación durante 30 minutos a 10.000 rpm. Las muestras se secaron en un horno a 60°C durante 24 h. El tamaño hidrodinámico de las partículas y el índice de polidispersidad (PDI) de las nanopartículas de plata se analizaron mediante Dynamic Light Scattering (DLS) (Malvern Zetasizer Nano ZS90 Dynamic Light Scattering). La forma de las nanopartículas se

determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y las medidas de tamaño de las imágenes se obtuvieron utilizando el procesador de imágenes ImageJ / Fiji 1.

La citotoxicidad fue probada por el ensayo de MTT sobre células MES-OV a concentraciones de 50 ng/mL y 100 ng/mL a 24, 48 y 72 h (Gómez-Garzón *et al.*, 2021).

Determinación de Concentración mínima inhibitoria sésil (CMIS) de Nanopartícula de plata por ensayo de MTT

Los ensayos de MTT se realizaron por triplicado y se basó en método de Pierce (Pierce *et al.*, 2008). Se utilizó una placa de poliestireno de 96 pozos para determinar CMIS durante la formación de la biopelícula (24 h). Directamente dentro de la placa se realizaron diluciones seriadas en base dos de la NPsAg para lo cual se tomaron 100 μ l y se transfirieron al pozo siguiente que contenía 100 μ l de medio RMPI 1640 de forma tal que en cada pozo quedó un volumen final de 100 μ l con concentraciones finales de 2,0 μ g/mL, 1,0 μ g/mL, 0,5 μ g/mL, 0,25 μ g/mL, 0,125 μ g/mL y 0,063 μ g/mL. Posteriormente, se adicionaron 100 μ l de inóculo de *Candida albicans* a concentración de 1×10^6 UFC/ml. La placa se incubó 24 h a 37°C.

Una segunda placa se montó para determinar CMIS sobre biopelícula previamente formada durante 24 h. Se adicionaron 100 μ l de inóculo de *Candida albicans* a concentración de 1×10^6 UFC/ml en todos los pozos y se incubó la placa 24 h a 37°C. Se retiró el medio y se adicionó 100 μ l de NPsAg con concentraciones finales de 2,0 μ g/mL, 1,0 μ g/mL, 0,5 μ g/mL, 0,25 μ g/mL, 0,125 μ g/mL y 0,063 μ g/mL. La placa se incubó 24 h a 37°C.

En cada placa se dispuso un control negativo con 200 μ l de medio RMPI 1640 para comprobar su esterilidad; también, un control de la NPsAg para garantizar pureza, así como cuatro controles positivos en los que se adicionó el inóculo de *Candida albicans* sin NPsAg. Se incubó la placa 24 h a 37°C,

Para el montaje de la prueba bromuro de 3-(4-5-dimetiletiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), las placas se lavaron dos veces con PBS estéril, se adicionó 100 μ L de MTT a una concentración de 1 μ M en todos los pozos de la placa, se cubrieron con papel aluminio y se incubaron durante 3 h en oscuridad a 37°C. Posteriormente se midió la absorbancia a 490nm.

A los resultados se les restó el valor correspondiente del control negativo y se calculó la CMIS50 y CMIS80 en las concentraciones de NPsAg a las que se presenta una disminución del 50% u 80% en la absorbancia, en comparación con las biopelículas de control positivo.

Evaluación microscópica de NPsAg sobre biopelículas de Candida albicans

Se generaron biopelículas de *Candida albicans* sobre acrílicos de 1.0 cm x 1.0 cm estériles siguiendo el protocolo propuesto por Wang para ser revisados microscópicamente (Wang and Xie, 2016).

Para evaluar el efecto de NPsAg sobre biopelícula pre-formada en una placa de cultivo de 12 pozos se colocaron simultáneamente acrílico, 50µL de suspensión de *Candida albicans* a una concentración de 1×10^6 UFC/mL y 50µL de NPsAg a 0,5µg/mL. Se incubó 24h a 37°C.

Para evaluar el efecto de NPsAg sobre biopelícula post-formada en una segunda placa de cultivo de 12 pozos se colocaron simultáneamente acrílico y 50µL de suspensión de *Candida albicans* a una concentración de 1×10^6 UFC/mL. Se incubó 24h a 37°C. Se retiró el medio y se adiciono 50µL de NPsAg a 0,5µg/mL. Se incubó 24h a 37°C.

En una tercera placa de cultivo de 12 pozos se colocaron simultáneamente acrílico y 50µL de suspensión de *Candida albicans* como control positivo. Se incubó 24h a 37°C.

Los acrílicos de cada ensayo se lavaron con PBS estéril y se fijaron con metanol. Se realizó coloración de Gram, Blanco de Calcoflúor y recubrimiento con oro para Microscopia electrónica de barrido (SEM). Finalmente se compararon fotografías de los efectos de las NPsAg de los ensayos con los controles.

3. Resultados

Las NPsAg fueron obtenidas a través de la reducción de iones de plata adicionados al extracto de *Borojoa patinoi*. La formación se evidencio por el cambio de color de amarillo a rojo marrón y la estabilidad de las nanopartículas fue evaluada por análisis espectrofotométrico UV-Vis, la progresión de reacción presento un pico entre 400-500 nm. En la distribución del número DLS de la NPsAg se observó un pico

de tamaño de 41.15 d.nm con un número del 99.7% y un segundo pico de 196.7 d.nm con número de 0.3. La concentración final de las nanopartículas obtenidas por síntesis verde fue de 600 µg/ml. La morfología, tamaño y forma de las NPsAg fueron determinadas por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), observándose formas esféricas de 20-60nm (Figura 1).

Se determinó la CMIS50 >2 µg/mL y CMIS80 >2 µg/mL de la NPsAg sobre biopelículas de *Candida albicans* y la actividad de las diferentes concentraciones de NPsAg durante la formación de la biopelícula (24 h) y sobre biopelícula previamente formada durante 24 h, esta determinación es presentada en la figura 2.

La viabilidad promedio de las células tratadas con NPsAg en concentraciones de 50 ng/mL y 100 ng/mL varió entre 41% y 58% a 24, 48 y 72 h.

El efecto de la NPsAg en biopelículas de *Candida albicans* formadas sobre acrílicos es presentada en coloraciones de Gram, Blanco de Calcoflúor y SEM son mostradas en la figura 3. El efecto de las nanopartículas sobre la pared de *Candida albicans* visualizado por medio de SEM es mostrado en la figura 4.

4. Discusión

En este estudio, se sintetizaron nanopartículas de plata de *Borojoa patinoi* por la vía de síntesis verde, el 99.9% de NPsAg presentaron forma esférica y con un tamaño de 41.15 nm. Durante el proceso los fotoquímicos, ácido fenólico, flavonoides, alcaloides y terpenoides, presentes en el Borojo ayudaron a la reducción de iones de Ag⁺ (Lizcano *et al.*, 2010; Chaves-López *et al.*, 2018; Patra, Shin and Das, 2021) bark, root, fruit and/or stem were prepared as infusions, as are traditionally used in popular medicine. Total phenols ranged from 0.8 to 22.2mg gallic acid equivalents/g and flavonoids from 0.0 to 10.2mg catechin equivalents/g, by using Folin-Ciocalteu and aluminium chloride colourimetric methods. Differences were observed in phenol and flavonoid contents at the organic level, the leaf presenting greater values than the stem. All the extracts showed different degrees of antioxidant activity with TEAC, 1.1 up to 117.4 and ORAC, 7.8 up to 359.1µmol Trolox equivalents/g. These values correlated with total phenol content (r²=0.90. La síntesis de NPsAg usando un proceso

verde tiene muchas ventajas, sobresaliendo su carácter eco-amigable por su baja contaminación generada del proceso (Kumari, Luqman and Meena, 2019). Utiliza extractos de plantas en lugar de plantas enteras, puede resultar más económico debido al procesamiento posterior más fácil, biocompatible y ser más rentable, ya que permite soportar síntesis más grandes (Chung *et al.*, 2016).

Diferentes plantas medicinales han sido utilizadas como materia prima para sintetizar nanopartículas, el fruto de *Borojoa patinoi* es usado en la medicina tradicional colombiana y se han demostrado que tiene actividad antimicrobiana sobre cepas multiresistentes de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* (Chaves-López *et al.*, 2018).

Candida albicans causa infecciones invasivas asociadas a la capacidad de formación de biopelículas sobre dispositivos endovenosos. Previamente, habíamos probado que la NPsAg era eficaz contra células planctónicas de *Candida albicans*, por lo que debíamos determinar si el tratamiento con nanopartículas podía erradicar las levaduras adheridas e inhibir las biopelículas maduras (Gómez-Garzón *et al.*, 2021).

En cuanto a los resultados obtenidos con los ensayos de coloración de Gram, Blanco de Calcoflúor y SEM se observó una reducción significativa en la biomasa. En CMIS50 y CMIS80 las concentraciones $>2\mu\text{g/ml}$ demostraron la capacidad de las NPsAg para inhibir la formación de biopelículas cuando se aplica a células ya adheridas (sésiles). Monteiro y col. informaron que concentraciones iguales o superiores a $3,3\mu\text{g/ml}$ de NPsAg producidas químicamente, inhiben la formación de biopelículas cuando se aplica a células ya adheridas (Monteiro *et al.*, 2011). Estevez y col concluyeron que la exposición a nanopartículas de plata produjo cambios estructurales en la conformación de la biopelícula de *Candida albicans* (Estevez *et al.*, 2020).

Según Kim y col., las NPsAg afectan a las células de levadura al atacar sus membranas, interrumpiendo así el potencial de membrana. Estos autores observaron, por microscopía de transmisión de electrones (TEM), la formación de “hoyos” en las superficies de la membrana de *C. albicans* y finalmente la formación de poros y la posterior muerte celular (Kim *et al.*, 2009).

Se realizó SEM para confirmar el efecto inhibitorio de las NPsAg. El control de crecimiento nos permitió observar que las biopelículas eran densas, al adicionar las NPsAg se redujo la matriz de polisacáridos que forman las biopelículas lo que permite ver el efecto inhibitorio de la nanopartícula. Selvaraj y col, observaron bajo SEM la presencia de daño en la membrana causado por la ruptura de la barrera de permeabilidad en *C. albicans*, efecto ocasionado por las NPsAg para poder destruir biopelículas formadas (Selvaraj *et al.*, 2014) TEM measurement of the cell-wall width of *C. albicans* after treatment resulted in significant enlargement (206 +/- 11 nm, en el presente estudio, se logró evidenciar presencia de deformación en la pared de las levaduras de *C. albicans* por SEM (figura 4).

Finalmente, la concentración tóxica de la NPsAg in vitro contra células humanas MES-OV fue media. La toxicidad inducida por nanopartículas depende de la superficie, el tamaño de las partículas, la morfología de las partículas y la disolución de iones. A medida que aumenta el estrés oxidativo y se altera la homeostasis del calcio intracelular debido a la exposición a nanopartículas, las acciones posteriores conducen a la lesión de la membrana, la desregulación del ciclo celular y muerte celular (Dakal *et al.*, 2016; Huang, Cambre and Lee, 2017). Se prevé que el mayor efecto de citotoxicidad de las NPsAg contra las líneas celulares cancerosas se debe a la mayor captación de nanopartículas por las líneas celulares, ya que las líneas celulares cancerosas tienen un metabolismo inusual y un alto porcentaje de proliferación, lo que a su vez hace que las líneas celulares cancerosa sean más susceptibles (Patra, Shin and Das, 2021).

Como conclusión las NPsAg de *Borojoa patinoi* redujeron las biopelículas formadas, pero aún más importante demostraron una gran capacidad para prevenir la formación de biopelículas de *C. albicans*, lo que indica que su capacidad antifúngica es de amplio espectro y podrían considerarse como alternativa de tratamiento y su uso para prevenir la formación de biopelículas de los catéteres antes de ser implantados en los pacientes mediante recubrimiento con NPsAg.

5. Agradecimientos

Los autores agradecen al apoyo financiero de la Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud a través del proyecto de subvención Cod. 697-C.B.-8 y a la Facultad de Ingeniería y Ciencias Básicas, Universidad Central, Bogotá, Colombia por sintetizar las nanopartículas.

Cumplimiento de estándares éticos

Conflicto de intereses

Los autores confirman que este manuscrito no tiene ningún conflicto de intereses.

6. Referencias

- Busi, S. and Rajkumari, J. (2019) 'Microbially synthesized nanoparticles as next generation antimicrobials: scope and applications', *Nanoparticles in Pharmacotherapy*. 2019/04/12, pp. 485–524. doi:10.1016/b978-0-12-816504-1.00008-9.
- Chaves-López, C. et al. (2018) 'Potential of Borojoa patinoi Cuatrecasas water extract to inhibit nosocomial antibiotic resistant bacteria and cancer cell proliferation in vitro', *Food Funct.* 2018/04/17, 9(5), pp. 2725–2734. doi:10.1039/c7fo01542a.
- Chung, I.M. et al. (2016) 'Plant-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles: Their Characteristic Properties and Therapeutic Applications', *Nanoscale Res Lett.* 2016/01/29, 11(1), p. 40. doi:10.1186/s11671-016-1257-4.
- Dakal, T.C. et al. (2016) 'Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles', *Frontiers in microbiology*, 7, p. 1831. doi:10.3389/fmicb.2016.01831.
- Estevez, M.B. et al. (2020) 'Biofilm Eradication Using Biogenic Silver Nanoparticles', *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(9), p. 2023. doi:10.3390/molecules25092023.
- Gómez-Garzón, M. et al. (2021) 'Inhibition of the filamentation of *Candida albicans* by Borojoa patinoi silver nanoparticles', *SN Applied Sciences*, 3(2), p. 195. doi:10.1007/s42452-020-04103-0.
- Gómez, M. (2018) 'Nanomateriales, Nanopartículas y Síntesis verde', *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 27(2), pp. 75–80.
- Huang, Y.W., Cambre, M. and Lee, H.J. (2017) 'The Toxicity of Nanoparticles Depends on Multiple Molecular and Physicochemical Mechanisms', *Int J Mol Sci.* 2017/12/14, 18(12). doi:10.3390/ijms18122702.
- Kim, K.J. et al. (2009) 'Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*', *Biometals*. 2008/09/05, 22(2), pp. 235–242. doi:10.1007/s10534-008-9159-2.
- Kumari, P., Luqman, S. and Meena, A. (2019) 'Application of the combinatorial approaches of medicinal and aromatic plants with nanotechnology and its impacts on healthcare', *Daru.* 2019/05/28, 27(1), pp. 475–489. doi:10.1007/s40199-019-00271-6.
- Lara, H.H. et al. (2015) 'Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study', *J Nanobiotechnology*, 13, p. 91.
- Lizcano, L.J. et al. (2010) 'Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use', *Food Chemistry*, 119(4), pp. 1566–1570. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.043.

- Lukaszuk, C., Krajewska-Kulak, E. and Kulak, W. (2017) 'Retrospective observation of drug susceptibility of *Candida* strains in the years 1999, 2004, and 2015', *PeerJ*, 5, p. e3038.
- Magana, M. *et al.* (2018) 'Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms', *Clinical Microbiology Reviews*, 31(3), pp. 1–49. doi:10.1128/CMR.00084-16.
- Le Mauff, F. (2020) 'Exopolysaccharides and Biofilms', *Curr Top Microbiol Immunol.* 2020/02/20, 425, pp. 225–254. doi:10.1007/82_2020_199.
- Monteiro, D.R. *et al.* (2011) 'Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*', *Biofouling*. 2011/07/16, 27(7), pp. 711–719. doi:10.1080/08927014.2011.599101.
- Mousavi, S.M. *et al.* (2018) 'Green synthesis of silver nanoparticles toward bio and medical applications: review study', *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2018/10/18, 46(sup3), pp. S855–S872. doi:10.1080/21691401.2018.1517769.
- Patra, J.K., Shin, H.-S. and Das, G. (2021) 'Characterization and Evaluation of Multiple Biological Activities of Silver Nanoparticles Fabricated from Dragon Tongue Bean Outer Peel Extract', *International journal of nanomedicine*, 16, pp. 977–987. doi:10.2147/ijn.s290037.
- Pierce, C.G. *et al.* (2008) 'A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing', *Nat Protoc.* 2008/09/06, 3(9), pp. 1494–1500. doi:10.1038/nprot.2008.141.
- Rajendran, R. *et al.* (2016) 'Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection-Scotland, 2012-2013', *Clin Microbiol Infect.* 2015/10/04, 22(1), pp. 87–93. doi:10.1016/j.cmi.2015.09.018.
- Römbling, U. and Balsalobre, C. (2012) 'Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies', *J Intern Med.* 2012/10/03, 272(6), pp. 541–561. doi:10.1111/joim.12004.
- Selvaraj, M. *et al.* (2014) 'Highly potential antifungal activity of quantum-sized silver nanoparticles against *Candida albicans*', *Appl Biochem Biotechnol.* 2014/03/22, 173(1), pp. 55–66. doi:10.1007/s12010-014-0782-9 [doi].
- Seneviratne, C.J., Jin, L. and Samaranayake, L.P. (2008) 'Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review', *Oral Diseases*, 14(7), pp. 582–590. doi:https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01424.x.
- Silva, S. *et al.* (2017) 'Candida Species Biofilms' Antifungal Resistance', *J Fungi (Basel)*, 3(1).
- Sotelo D, I., Casas F, N. and Camelo M, G. (2010) 'BOROJÓ (*Borojoa patinoi*): FUENTE DE POLIFENÓLES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA', *Vitae*, 17, pp. 329–336. Available at: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000300011&nrm=iso.
- Uppuluri, P. *et al.* (2010) 'Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle', *PLoS Pathog.* 2010/04/03, 6(3), p. e1000828. doi:10.1371/journal.ppat.1000828.
- Vallabhaneni, S. *et al.* (2016) 'The Global Burden of Fungal Diseases', *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(1), pp. 1–11. doi:https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.004.
- Wang, H. and Xie, B. (2016) 'Study on how nanosilver-based inorganic antibacterial agent functions on biofilm formation of *Candida albicans*, inside the oral cavity', *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2015/05/15, 44(6), pp. 1429–1433. doi:10.3109/21691401.2015.1031907.

Figura 1 Caracterización de NPsAg de *Borjoia patinoi* mediante A. dispersión de luz dinámica (DLS). B Microscopía electrónica de trasmisión (TEM).

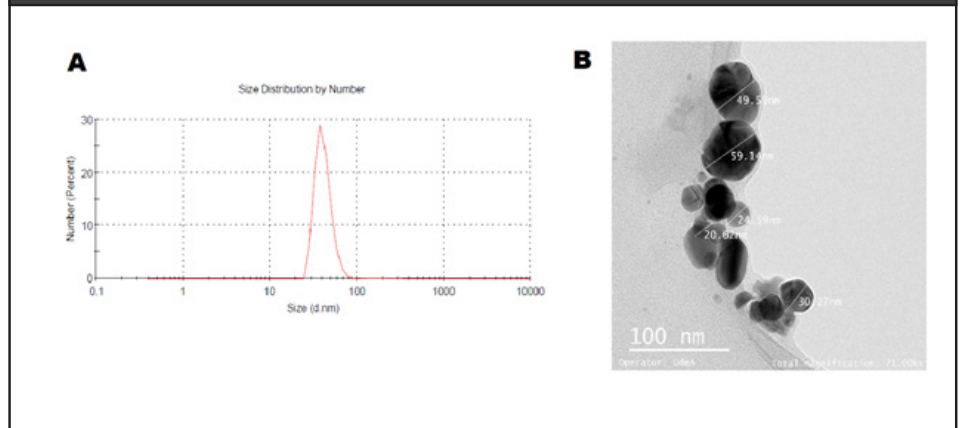


Figura 2: Actividad de NPsAg frente a biopelículas de *Candida albicans* por MTT

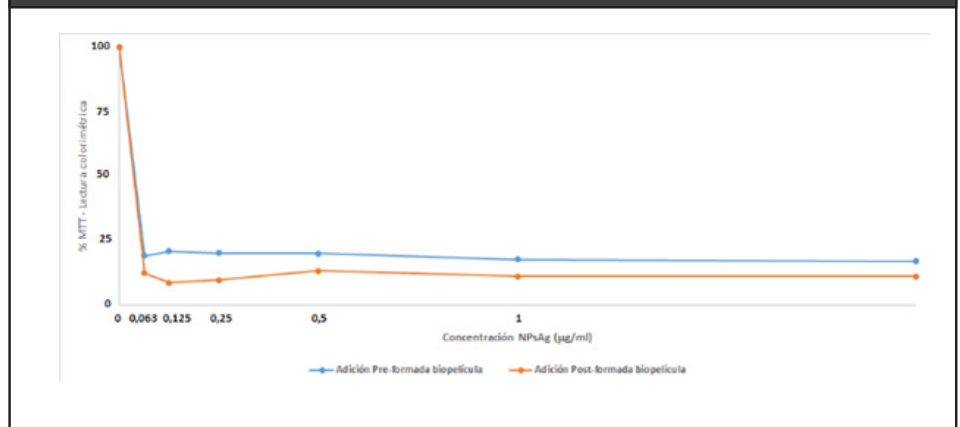


Figura 3: Comparación fotográfica de biopelículas bajo coloración de Gram, Blanco de Calcoflúor y SEM. El control positivo corresponde a biopelículas no sometidas a tratamiento con NPsAg.

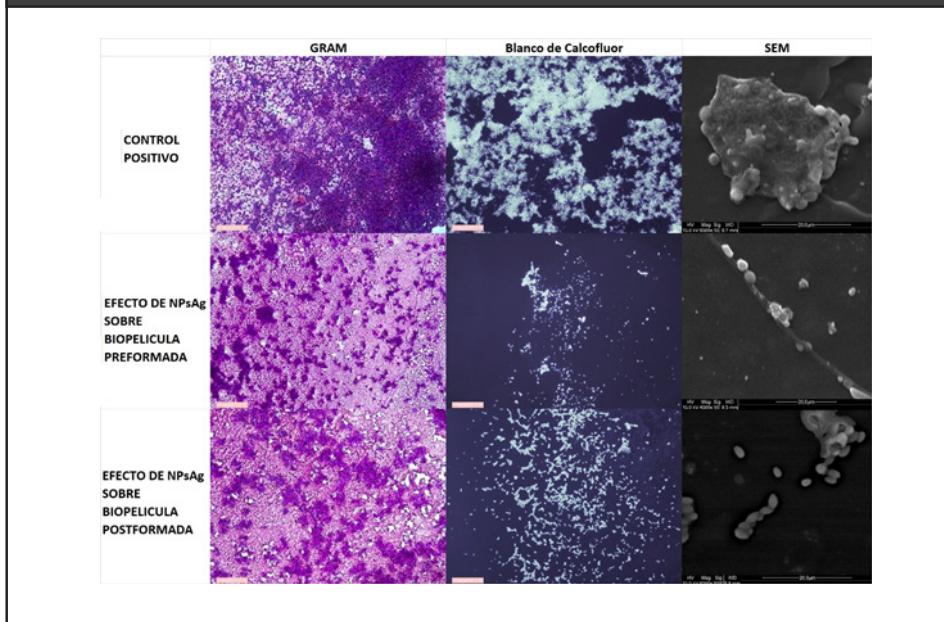


Figura 4: Microfotografía SEM de *Candida albicans* tratada con NPsAg, las flechas rojas muestran sitios de la pared celular afectada.

