

Universidad Nacional del Nordeste



Maestría en Micología Médica



**FACULTAD
DE MEDICINA**

Síntesis de nanopartículas de plata a partir de un extracto vegetal y evaluación de su actividad inhibitoria *in vitro* frente a *Malassezia* spp.

Autor: Javier Esteban Mussin

Director: Dr. Gustavo Giusiano

Codirector: Dr. San Martín Martínez, Eduardo

2020

Universidad Nacional del Nordeste



Maestría en Micología Médica



**FACULTAD
DE MEDICINA**

**Síntesis de nanopartículas de plata a partir de un
extracto vegetal y evaluación de su actividad
inhibitoria *in vitro* frente a *Malassezia* spp.**

Autor: Javier Esteban Mussin

Director: Dr. Gustavo Giusiano

Codirector: Dr. San Martín Martínez, Eduardo

2020

*Dedicado a mis padres,
mis ejemplos de constancia y dedicación,
a quienes admiro y quiero profundamente.*

*“No hay ninguna ley física que impida manipular átomos y moléculas individualmente, o
fabricar estructuras a partir de los mismos”*

Richard Feynman (Premio Nobel en Física 1965 e impulsor de la Nanotecnología)

AGRADECIMIENTOS

A Gustavo, Flor, Tina, Lili, Luis y Silvina, mi segunda familia, por brindarme su amistad, sus consejos y ayuda incondicional.

A la Dra. Silvina Lösch y a la Administración Provincial del Agua de la provincia del Chaco por brindarme el equipamiento para la obtención de los extractos.

Al Dr. Eduardo San Martín por abrirme las puertas al Instituto Politécnico Nacional, CICATA, México, donde tuve la oportunidad de realizar una estancia de investigación y conocer excelentes profesionales y personas.

A la Dra. Rocio Casañas y Dra. Viana Robles, por su apoyo y asesoramiento en la evaluación de la actividad antioxidante, citotoxicidad y contenido de fenoles y flavonoides totales.

Al Dr. Dematteis por su colaboración en la identificación de las plantas.

Al Instituto de Medicina Regional de la UNNE por brindarme el lugar de trabajo para desarrollar mi tesis.

A mis padres y hermanos, por los sacrificios que hicieron por mí, por su cariño y apoyo permanente.

A mi director Dr. Gustavo Giusiano, a quien admiro como persona y como profesional, por abrirme las puertas, por ser mi mentor y un amigo.

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Características del género <i>Malassezia</i>	7
1.1.1. Historia y taxonomía actual	9
1.1.2. Ecología y enfermedades asociadas	13
1.2. Infecciones de la piel. Nanotecnología y medicina tradicional	19
1.2.1. Nanotecnología: Nanopartículas metálicas	20
1.2.2. Plantas de la medicina tradicional del nordeste argentino	22
2. SIGNIFICADO Y ORIGINALIDAD DE LA PROPUESTA	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo general	29
3.2. Objetivos específicos	29
4. HIPÓTESIS	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1. Material vegetal	32
5.2. Obtención del extracto acuoso de tapekué (TAE)	33
5.3. Rendimiento de la extracción	34
5.4. Determinación de fenoles totales	34
5.5. Cuantificación de flavonoides totales	35
5.6. Síntesis verde de nanopartículas de plata	35
5.6.1. Caracterización de las AgNP	36
5.7. Actividad antioxidante	37
5.7.1. Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)	37
5.7.2. Inhibición del radical DPPH	38
5.8. Ensayo de citotoxicidad	38
5.9. Microorganismos a ensayar	39
5.10. Evaluación de la actividad inhibitoria	40
5.10.1. Concentración inhibitoria mínima (CIM)	40
5.10.2. Concentración fungicida mínima (CFM)	41
5.10.3. Actividad fungicida / fungistática	41
5.11. Análisis estadístico	42

6. RESULTADOS	43
6.1. Material vegetal	43
6.2. Rendimiento, contenido de fenoles y flavonoides totales	43
6.3. Caracterización de las AgNP	43
6.4. Actividad antioxidante	47
6.5. Actividad citotóxica	47
6.6. Actividad inhibitoria <i>in vitro</i>	49
7. DISCUSIÓN	54
7.1. Material vegetal	55
7.2. Proceso de extracción y rendimiento	56
7.3. Contenido de fenoles y flavonoides totales	59
7.4. Síntesis y caracterización de las AgNP	60
7.5. Actividad antioxidante	61
7.6. Ensayo de citotoxicidad	63
7.7. Evaluación de la actividad inhibitoria	66
8. CONCLUSIÓN	72
9. BIBLIOGRAFÍA	74
10. ANEXOS	99

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Levaduras de <i>Malassezia furfur</i> CBS 7019	9
Figura 2. Mapa político de la República Argentina en el cual se resalta en verde las provincias que conforman el NEA.....	23
Figura 3. <i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) Kuntze	26
Figura 4. Equipo de molienda y tamiz	33
Figura 5. Equipo de filtración.....	33
Figura 6. Equipo de liofilización.....	34
Figura 7. Espectro UV-Visible de las AgNP sintetizadas	44
Figura 8. Imagen obtenida con MET de las AgNP sintetizadas	44
Figura 9. Histograma de distribución del tamaño de las AgNP	45
Figura 10. EDX de las AgNP sintetizadas	46
Figura 11. Espectro FTIR de las AgNP	46
Figura 12. Porcentajes de viabilidad de las CMSP a las 24 y 72 horas de incubación para 2, 4, 8, 16 y 32 µg / mL	48
Figura 13. Comercio de plantas medicinales en el mercado regional “El Piso”, Corrientes, Corrientes, Argentina.....	57
Figura 14. Representación gráfica de la relación encontrada entre la actividad antifúngica y la citotoxicidad del TAE, AgNO ₃ y AgNP	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de <i>Malassezia</i> actualmente reconocidas, autores, año de la descripción, y su principal huésped	12
Tabla 2. Principales afecciones clínicas en las que están implicadas las especies más documentadas de <i>Malassezia</i>	15
Tabla 3. Posición taxonómica de <i>A. australe</i> (Loefl.) Kuntze	26
Tabla 4. Actividad antioxidante de TAE, AgNO ₃ and AgNP	47
Tabla 5. Valores de rango y moda de CIM-2, CIM-1, CIM-0, CFM y CFM:CIM-0 para el extracto acuoso de tapekué (TAE), nitrato de plata (AgNO ₃), nanopartículas de plata (AgNP) e itraconazol (ITZ) frente a todas las especies de <i>Malassezia</i> ensayadas.....	50
Tabla 6. Comparación de los valores de moda de CIM obtenidos con los antifúngicos de uso clínico convencional por Rojas y col. con las AgNP sintetizadas en este trabajo..	53
Tabla 7. Tabla comparativa de los rendimientos obtenidos por distintos autores.....	58

ABREVIATURAS

Ag: plata metálica

Ag⁺: iones plata

AgNO₃: nitrato de plata

AgNP: nanopartículas de plata

CBS: *Centraalbureau voor Schimmelcultures*

CE₅₀: Concentración efectiva al 50 %

CFM: concentración fungicida mínima

CFM: concentración fungicida mínima

CICATA-Legaria: Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada
- Unidad Legaria

CIM: concentración inhibitoria mínima

CIM: concentración inhibitoria mínima

CIM-0: concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento microbiano

CIM-1: concentración más baja del agente antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento microbiano en un porcentaje ≥ 80 % en comparación con el pocillo de control de crecimiento libre de agente antimicrobiano

CIM-2: concentración más baja del agente antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento microbiano en un porcentaje ≥ 50 % en comparación con el pocillo de control de crecimiento libre de agente antimicrobiano

CLSI: *Clinical & Laboratory Standards Institute*

CMSP: células mononucleares de sangre periférica

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

DLS: Dispersión dinámica de luz

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidracilo

DS: desviación estándar

EAG: equivalente de ácido gálico

EDX: Espectroscopía de rayos X con dispersión de energía

EL: extracto liofilizado

EQ: equivalente de quercetina

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FRAP: Poder antioxidante reductor del hierro

FTIR: Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier

IBONE: Instituto de Botánica del Nordeste

IMR: Instituto de Medicina Regional

INF- γ : interferón gamma

IPN: Instituto Politécnico Nacional

ITZ: Itraconazol

MET: Microscopía electrónica de transmisión

NEA: nordeste argentino

OMS: Organización Mundial de la Salud

PDI: índice de polidispersidad

TAE: extracto acuoso de tapekué

Tapekué: *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze

TPTZ: 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina

UNNE: Universidad Nacional del Nordeste

RESUMEN

La combinación de los conocimientos de la medicina tradicional con la nanotecnología abre las puertas para el desarrollo de nuevos medicamentos proporcionando nuevas estrategias para el tratamiento y prevención de infecciones fúngicas de la piel, pero también aporta a la lucha contra el aumento de la resistencia a los antimicrobianos. El objetivo principal de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica de nanopartículas de plata (AgNP) obtenidas por síntesis verde y de los componentes utilizados para su síntesis frente a aislamientos clínicos de *Malassezia* spp., así como también, evaluar su citotoxicidad frente a células mononucleares de sangre periférica (CMSP). *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze, una planta medicinal empleada por los indígenas del nordeste de Argentina para el tratamiento de la pitiriasis versicolor, se utilizó para sintetizar AgNP estables, esféricas y monodispersas con un diámetro promedio de 14.01 ± 2.1 nm. El método de síntesis demostró ser simple, ecológico, económico y valioso para la producción a gran escala de AgNP. El extracto acuoso de *A. australe* desempeñó un papel importante tanto como agente reductor de iones plata (Ag^+), como agente de recubrimiento de las AgNP sintetizadas. La solución de AgNP demostró tener efecto fungicida y una actividad inhibitoria superior al fluconazol y a la anfotericina B pero inferior al itraconazol, voriconazol y ketoconazol. Además, las AgNP demostraron ser seguras a concentraciones suficientes para inhibir el crecimiento fúngico y tener una mejor actividad antifúngica frente a las principales especies de *Malassezia* causantes de infecciones de piel en comparación a los componentes utilizados para su síntesis. Por consiguiente, se demostró que una cantidad dada de plata en forma de iones plata (Ag^+) es más tóxica para el ser humano que la misma cantidad de plata en forma de nanopartículas recubiertas con fitocompuestos, lo que señala que las AgNP sintetizadas serían adecuadas para su utilización como compuesto antifúngico, a fin de ser empleadas para el tratamiento e incluso la prevención de infecciones cutáneas causadas o asociadas a *Malassezia* spp.

ABSTRACT

The combination of the knowledge of traditional medicine with nanotechnology opens the doors for the development of new drugs, providing new strategies for the treatment and prevention of fungal infections of the skin, but also contributes to the fight against the increase in resistance to antimicrobials. The main objective of this study was to evaluate the antifungal activity of silver nanoparticles (AgNP) obtained by green synthesis and of the components used for their synthesis against clinical isolates of *Malassezia* spp., as well as to evaluate their cytotoxicity against peripheral blood mononuclear cells (CMSP). *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze, a medicinal plant used by the indigenous people of northeastern Argentina for the treatment of pityriasis versicolor, was used to synthesize stable, spherical and monodisperse AgNP with an average diameter of 14.01 ± 2.1 nm. The synthesis method proved to be simple, ecological, inexpensive, and valuable for large-scale production of AgNP. The aqueous extract of *A. australe* played an important role both as a reducing agent for silver ions (Ag^+) and as a coating agent for the synthesized AgNP. The AgNP solution was shown to have a fungicidal effect and an inhibitory activity higher than fluconazole and amphotericin B but lower than itraconazole, voriconazole and ketoconazole. Furthermore, AgNP was shown to be safe at concentrations sufficient to inhibit fungal growth and have better antifungal activity against the main *Malassezia* species that cause skin infections compared to the components used for their synthesis. Consequently, a given quantity of silver in the form of silver ions (Ag^+) was shown to be more toxic to humans than the same quantity of silver in the form of nanoparticles coated with phytocompounds. This indicates that the synthesized AgNP would be suitable for use as an antifungal compound, in order to be used for the treatment and even the prevention of skin infections caused or associated with *Malassezia* spp.

1. INTRODUCCIÓN

Las levaduras del género *Malassezia* forman parte de la microbiota habitual de la piel humana y de vertebrados de sangre caliente. Todas son lipofílicas y la mayoría de las especies requiere de una fuente externa de lípidos, puesto que son incapaces de sintetizar ácidos grasos. Por esta razón, prevalecen en las áreas del cuerpo ricas en glándulas sebáceas. Estas levaduras causan la pitiriasis versicolor y la foliculitis por *Malassezia*, por otro lado, se las asocia con la dermatitis seborreica y se considera actúa como agente exacerbador de dermatitis atópica, psoriasis y otras afecciones dérmicas. Las enfermedades cutáneas asociadas con *Malassezia* spp. son a menudo crónicas y recurrentes (1–3).

La nanotecnología es un importante campo de investigación moderno que se basa en la síntesis y manipulación de la estructura de partículas que van desde 1 a 100 nm de tamaño, llamadas comúnmente nanopartículas. Las nanopartículas de metales nobles presentan a menudo propiedades biológicas, físicas y químicas distintas en comparación con sus homólogos en escala macro, mostrando una alta relación superficie-volumen con la disminución del tamaño de las mismas. Entre los diferentes metales nobles, con propiedades antimicrobianas, la plata metálica (Ag) es el más ampliamente estudiado siendo el de acción antimicrobiana más eficaz y el menos tóxico para las células animales (4,5). A medida que aumenta la superficie específica de las nanopartículas, su eficacia antimicrobiana aumenta, por lo que representan una alternativa contra la creciente resistencia microbiana, así como también, contra las diversas complicaciones asociadas al uso de antimicrobianos (6,7).

Las nanopartículas de plata (AgNP) han ganado un interés importante en el ámbito de la nanotecnología debido a sus propiedades únicas, tales como su estabilidad química, buena conductividad, actividad catalítica, antibacteriana, antiviral y antifúngica. Además, de poseer propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas (4,8–10). Es por este motivo que tienen el potencial para surgir como nuevos agentes terapéuticos.

La Ag y las AgNP se han aplicado en la industria farmacéutica en ungüentos y cremas tópicas para prevenir la infección de quemaduras y heridas abiertas. Otra de las aplicaciones ampliamente utilizadas son dispositivos médicos e implantes preparados con polímeros impregnados con Ag, ya que se ha demostrado su capacidad de inhibir la adherencia y la formación de biopelículas de distintas especies (6,11–13).

Las nanopartículas metálicas generalmente se preparan mediante una variedad de procesos físicos y químicos que son costosos y afectan el medio ambiente. Por otro lado, se busca aplicar estas nanopartículas en productos que están en contacto con el cuerpo humano, por lo que hay una creciente necesidad de desarrollar procesos de síntesis amigables con el ambiente en los cuales no se utilicen compuestos tóxicos como en la mayoría de los protocolos de síntesis química. Por tal motivo, la fitonanotecnología emerge en respuesta a estas necesidades como un método de síntesis verde en la cual se emplean plantas para la síntesis de nanopartículas, como una tecnología respetuosa con el medio ambiente (4,6,14).

Acanthospermum australe (Loefl.) Kuntze (*A. australe*), comúnmente conocida como “tapekué” en Argentina, es una planta medicinal utilizada por los indígenas del nordeste (NEA) para el tratamiento de las manchas blancas de la piel, en referencia a la pitiriasis versicolor, y para el tratamiento de otras afecciones dérmicas (15). La combinación de los conocimientos de la medicina tradicional del NEA con la nanotecnología abre las puertas para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos.

1.1. Características generales del género *Malassezia*

Las levaduras de *Malassezia* son organismos lipofílicos, que han sido reconocidas hace más de un siglo como miembros de la microbiota cutánea humana y también como agentes de ciertas enfermedades de la piel (16,17). Además, desde la década de 1980, se las ha informado causando infecciones sistémicas oportunistas (18). Estas levaduras

se han encontrado con frecuencia en una amplia gama de otros animales de sangre caliente y su distribución en la naturaleza se está explorando utilizando técnicas moleculares (19). Las características del género *Malassezia* incluyen una morfología distintiva y su afinidad por los lípidos. *Malassezia* spp. puede presentarse tanto en su forma de levadura como filamentosa. La forma levaduriforme se encuentra tanto en la piel sana como en la enferma y en los medios de cultivo (20,21). La forma filamentosa se asocia a determinadas afecciones cutáneas y correspondería a estructuras de tipo pseudohifas, ya que no se han observado las estructuras de poros características de las hifas verdaderas (22).

Las células levaduriformes pueden tener múltiples formas: globosas a subglobosas, ovals o cilíndricas, dependiendo de la especie y del medio. Las observaciones de microscopía electrónica han demostrado que estas levaduras tienen una pared celular gruesa de múltiples capas. La reproducción asexual tiene lugar por un proceso de brotación unipolar enteroblástica y percurrente de base ancha desde la célula madre. La célula hija se separa de aquella que le da origen por medio de la formación de un septo seguido por la escisión, dejando una cicatriz en la célula parental y en el mismo punto se producen sucesivas gemaciones cuyas cicatrices dan lugar a la formación de un collarite como se observa en la **Figura 1** (19,22,23). Estas características permiten su diferenciación de otros géneros levaduriformes y su fácil reconocimiento.

Todas las especies de *Malassezia* son lipofílicas y la mayoría lipodependientes, a excepción de *M. pachydermatis*. Debido a estos estrictos requerimientos nutricionales, para su aislamiento se necesitan medios de cultivos suplementados con ácidos grasos de cadena larga (24). Incubación a temperaturas entre 30 y 35 °C (óptima 32 °C, excepto *M. cuniculi* y *M. vespertilionis*) durante 2 a 5 días, son las condiciones de crecimiento en laboratorio de las especies de *Malassezia* actualmente conocidas (25,26).

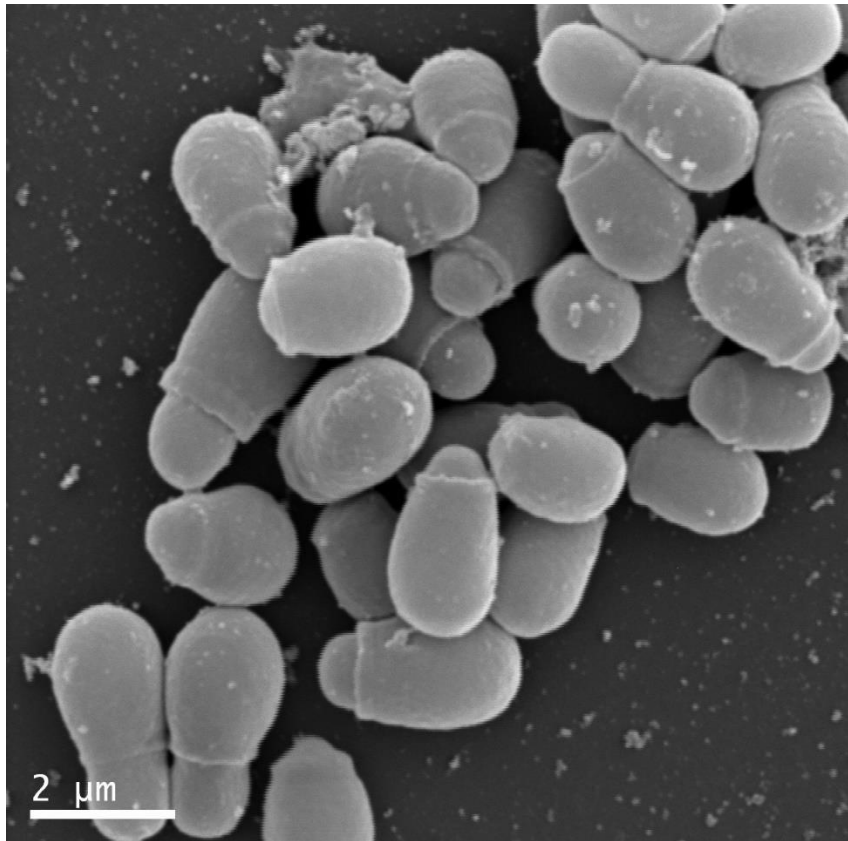


Figura 1. Levaduras de *Malassezia furfur* CBS 7019. Imagen de propia autoría obtenida con microscopio electrónico de barrido.

1.1.1. Historia y taxonomía actual

La primera observación de *Malassezia* se realizó en 1846, cuando Eichstedt reconoció la naturaleza fúngica de la pitiriasis versicolor al describir la presencia de levaduras y filamentos en el material obtenido de las escamas de estos pacientes. Pero el microorganismo no fue nombrado hasta 1853, cuando Robin llamó *Microsporon furfur* a las células redondeadas que observó en la piel de pacientes con caspa. En el año 1874, Malassez describió células brotantes de “varias formas” en el estrato córneo de pacientes con diversas enfermedades de piel. Veinte años después, Baillon (1889), estableció un nuevo género al que llamó *Malassezia* en honor a Malassez, con *Malassezia furfur* como especie tipo (19,20,27). La denominación de la especie hace

alusión a las finas escamas de consistencia furfurácea o parecida al salvado que se desprenden de las lesiones de pitiriasis versicolor. La morfología variable de estas levaduras llevó a diferentes taxónomos a separarlas en base a su morfología. Por largo tiempo se creyó que las levaduras y el micelio que se observaban en las preparaciones microscópicas de los materiales clínicos eran distintos microorganismos. En 1904, Sabouraud observó la presencia de dos tipos de morfologías en muestras de lesiones de piel y las denominó como dos géneros diferentes: llamó *M. furfur* a los filamentos en las escamas de pacientes con pitiriasis versicolor y creó el género *Pityrosporum* para la fase levaduriforme (19). La morfología variable de las levaduras llevó a algunos taxónomos a separarlas en especies, Castellani y Chalmers en 1913, llamaron *Pityrosporum ovale* (*P. ovale*) a la forma oval y en 1951 Gordon denominó *P. orbiculare* a las levaduras esféricas presentes en piel con y sin lesiones. Este fue el primer indicio de que estas levaduras formaban parte de la microbiota normal de piel. En 1925 Weidman aisló levaduras de la piel de un rinoceronte similares en morfología a *P. ovale* pero que no necesitaban la presencia de lípidos para su crecimiento y las llamó *Pityrosporum pachydermatis* (*P. pachydermatis*). Una levadura similar fue descrita por Gustafson en 1955, aislada de una otitis externa de un perro y la llamó *Pityrosporum canis*, aunque posteriormente fue reconocida como sinónimo de *P. pachydermatis* (19).

Hasta ese momento estas levaduras estaban incluidas en dos géneros, *Malassezia* y *Pityrosporum*. En 1984, Yarrow y Ahearn proponen a *P. ovale* y *P. orbiculare* como variantes de una misma especie y ambas correspondientes a *M. furfur* (22). En esta década, la biología molecular comienza a ser utilizada como una herramienta de identificación en microbiología y, junto a diferentes estudios micológicos e inmunológicos se demostró, por un lado la inestabilidad morfológica de las formas oval y esférica al lograr la conversión *in vitro* de una forma a otra y, por otro, que la levadura y el micelio eran sólo estados simples del complejo ciclo de vida de un mismo hongo (19,28). Finalmente, en 1986 en la "International Commission of the Taxonomy of Fungi",

fue aceptado *Malassezia* como único nombre genérico, aunque el término "*Pityrosporum*" siguió siendo utilizado durante muchos años (29).

A lo largo del tiempo, diferentes esquemas fueron desarrollados con el fin de identificar las especies de *Malassezia* utilizando caracteres fenotípicos y pruebas bioquímicas, como por ejemplo, la reacción de catalasa, la tolerancia a diferentes temperaturas, la asimilación de tweens, beta-glucosidasa, entre otros (25,30–32). Sin embargo, los algoritmos de identificación basados en estas características tienen sus limitaciones y no siempre permiten una clara diferenciación de las especies.

El desarrollo de diversas técnicas moleculares ayudó a resolver las desventajas de los métodos convencionales. Se han propuesto varios métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siendo la digestión por enzimas de restricción de productos de PCR (PCR-RFLP) aquella con mejor rendimiento para identificar aislamientos obtenidos de cultivos (33,34). Como reciente metodología de identificación de levaduras, la *Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF / MS) ha sido probado para la identificación de *Malassezia* permitiendo la identificación correcta de las especies del género y con resultados concordantes con los de análisis molecular del ADN ribosomal, prometiendo en un futuro ser un sistema de identificación rápida si se utiliza una base de datos ampliada (35).

La inclusión de las técnicas moleculares, en particular, el análisis de secuenciación de ARNr permitieron describir especies nuevas (36). El análisis filogenético basado en la secuenciación de dominios variables D1/D2 del ADN ribosomal y las regiones ITS (30,37), junto con los recientes hallazgos basados en secuencias genómicas completas (38), coloca al género *Malassezia* dentro de (19,30,39–41):

- Phylum: Basidiomycota
 - Subphylum: Ustilaginomycotina
 - Clase: Malasseziomycetes
 - Orden: Malasseziales
 - Familia: Malasseziaceae

El género *Malassezia* actualmente comprende 18 especies (**Tabla 1**), de las cuales 10 son antropofílicas y 8 son zoofílicas (42,43).

Tabla 1. Especies de *Malassezia* actualmente reconocidas, autores, año de la descripción, y su principal huésped. Tabla adaptada de Cabañes (39), Guillot y col. (43).

Especie de <i>Malassezia</i>	Huésped principal / Otros
<i>M. furfur</i> , (Robin) Baillon, 1889.	Hombre / vaca, elefante, mono, avestruz, pelicano.
<i>M. pachydermatis</i> , (Weidman) Dodge, 1925.	Perro, gato / carnívoros, aves
<i>M. sympodialis</i> , Simmons y Gueho, 1990.	Hombre / caballo, cerdo, oveja
<i>M. globosa</i> , Midgley y col., 1996.	Hombre / leopardo, vaca
<i>M. obtusa</i> , Midgley y col., 1996	Hombre
<i>M. restricta</i> , Gueho y col., 1996.	Hombre
<i>M. slooffiae</i> , Guillot y col., 1996.	Hombre, cerdo / cabra, oveja
<i>M. dermatis</i> , Sugita y col., 2002.	Hombre
<i>M. japonica</i> , Sugita y col., 2003.	Hombre
<i>M. nana</i> , Hirai y col., 2004.	Gato, vaca / perro

<i>M. yamatoensis</i>, Sugita y col., 2004.	Hombre
<i>M. caprae</i>, Cabañes y Boekhout, 2007.	Cabra / caballo
<i>M. equina</i>, Cabañes y Boekhout, 2007.	Caballo / vaca
<i>M. cuniculi</i>, Cabañes y Castella, 2011.	Conejo
<i>M. arunalokei</i>, Honnava y col., 2016.	Hombre
<i>M. brasiliensis</i>, Cabañes y col., 2016.	Loro
<i>M. psittaci</i>, Cabañes y col., 2016.	Loro
<i>M. vespertilionis</i>, Lorch y col., 2018	Murciélago

1.1.2. Ecología y enfermedades asociadas

Numerosos estudios revelaron que *Malassezia* spp. está presente universalmente en la población y que la colonización comienza inmediatamente después del nacimiento y aumenta hasta los 6 - 12 meses de edad (44). Luego, permanece relativamente baja hasta justo antes de la pubertad, cuando la activación de las glándulas sebáceas proporciona un mejor hábitat y las poblaciones de *Malassezia* se elevan a un nivel estable (45,46). Debido a sus requerimientos de una fuente de lípidos externa, se ha demostrado que las concentraciones más altas de estas levaduras se encuentran en las áreas ricas en glándulas sebáceas como ser: tronco, espalda, cara y cuero cabelludo y, con menor abundancia, en brazos, piernas y genitales, (47–49).

Actualmente, las herramientas independientes del cultivo para examinar comunidades microbianas complejas que se encuentran en y sobre el cuerpo humano abrieron oportunidades para la detección de especies que, de otro modo, se perderían con el uso de métodos basados en cultivos, debido a un crecimiento lento o fastidioso o la falta de

condiciones apropiadas que se asemejen al hábitat natural, como ocurre con las especies de *Malassezia*. Esto ha impulsado a que los estudios del microbioma humano que antes se centraban principalmente en los habitantes procariotas del cuerpo humano, ahora se centren en los hongos. Particularmente, se encontró que la abundancia relativa de hongos en la piel humana es baja en comparación con las bacterias, pero las levaduras de *Malassezia* se identificaron como los eucariotas cutáneos más abundantes, que representan del 50 % al 80 % del microbioma cutáneo total. Por lo tanto, *Malassezia* spp. representa el principal componente del microbioma de la piel (46,50,51). Es importante enfatizar que microbiota se refiere a microorganismos en la piel, y el microbioma representa el componente genómico total, medido por análisis de ADN. Los genomas no interactúan con el huésped, sin embargo, la biomasa asociada con cada genoma sí lo hace. En la actualidad, se observó que los microorganismos de la microbiota humana desempeñan un papel protector crucial en el mantenimiento de la salud y en el desarrollo de enfermedades. Las células microbianas son muy variables en tamaño, por lo que la biomasa por genoma fluctúa ampliamente. Además, se informó que el tamaño de las células de la especie *Malassezia* tiene entre 200 y 500 veces la biomasa por genoma en relación con las bacterias, lo que refuerza la relevancia de estas levaduras en la piel (52,53).

Las especies de *Malassezia* se han asociado a una amplia gama de enfermedades cutáneas y sistémicas. El papel patogénico de estas levaduras en enfermedades de la piel siempre ha sido motivo de controversia. Una de las cuestiones clínicas principales que se plantea es determinar cuál es la relación entre las especies y el desorden dermatológico en sí, es decir, si las levaduras de *Malassezia* son causa de la afección, o bien, si forman parte de un fenómeno secundario que agrava la enfermedad. Actualmente, podemos discriminar distintos estados en la coexistencia de *Malassezia* con la piel del hospedador. Uno de ellos es el estado de comensal - simbiosis, en el que la levadura y la piel del hospedero están en equilibrio. Por otro lado, se encuentra el

estado patogénico, en el cual puede existir un aumento en la carga fúngica sin inflamación, como ocurre en la pitiriasis versicolor. Mientras que en la dermatitis seborreica, dermatitis atópica y psoriasis existe un aumento en la carga fúngica acompañada de inflamación. Las evidencias demuestran que la interacción de las levaduras de *Malassezia* con la piel es multifacética e involucra distintos componentes de la pared celular, enzimas y productos metabólicos del hongo, así como de las células que componen la epidermis (30,54,55). Actualmente, *M. globosa*, *M. restricta*, *M. sympodialis* y *M. furfur* son las especies más comúnmente informadas en la bibliografía relacionadas a estas afecciones cutáneas (**Tabla 2**). Sin embargo, otras especies pueden colonizar e infectar la piel humana (19,22,30,41).

Tabla 2. Principales dermatosis en las que están implicadas las especies más documentadas de *Malassezia*. Adaptado de Kurtzman y col. (56) y Theelen y col. (46).

Entidad	<i>M. furfur</i>	<i>M. globosa</i>	<i>M. restricta</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. pachydermatis</i>
DA	+	+	+	+	
DS	+	+	+	+	
DSA					+
PV	+	+		+	
IS	+			+	+

+: especies implicadas en la infección. DA: dermatitis atópica. DS: dermatitis seborreica. DSA: dermatitis seborreica en animales. PV: pitiriasis versicolor. IS: infección sistémica.

Según estudios fenotípicos y basados en PCR:

- *M. globosa* es la especie más abundante en piel humana sana y la más frecuentemente vinculada a diversas afecciones dermatológicas, incluidas PV y DS (19,46,57–63).
- *M. restricta* es la segunda especie más común en pieles sanas y enfermas, particularmente en cuero cabelludo, cuello, cara y orejas (19,61) y se asocia con DS y DA (46,57,62,64–66).
- *M. sympodialis* es la tercera especie más abundante en la piel humana sana, pero aparece con una frecuencia significativamente menor en comparación con *M. globosa* y *M. restricta* (46,67).
- *M. dermatis* se ha identificado con baja frecuencia tanto en piel sana como en lesiones de pacientes con DA (19,36,46,67).
- El uso de métodos basados en cultivos identifica a *M. furfur* en varios sitios del cuerpo, incluida la piel, la sangre y la orina humana. Sin embargo, estudios independientes del cultivo encontraron *M. furfur* en la piel solo en raras ocasiones, con baja frecuencia y abundancia (46,50,57,67).

Por último, hay que tener presente que los factores del huésped, como la variación inducida por genes, las condiciones ambientales, el estilo de vida, la higiene y el sistema inmunológico provocan cambios en las comunidades microbianas de la piel. Asimismo, cualquier modificación de alguno de estos factores puede conducir de un estado de simbiosis-comensalidad a uno de patogenicidad (50,52).

El género *Malassezia* comprende un grupo heterogéneo de especies formado por diferentes genotipos que pueden causar las mismas patologías; y estas especies y genotipos pueden variar en su susceptibilidad a diferentes agentes antifúngicos (46).

1.1.2.1. Pitiriasis versicolor

Es una infección superficial de la epidermis de la piel en la cual *Malassezia* desarrolla su forma filamentosa y causa daños patológicos menores al estrato córneo a través de la penetración del tejido. Es una de las micosis superficiales más comunes y se presenta en una amplia gama de áreas geográficas, pero es más frecuente en los trópicos, con la mayor incidencia en niños y adultos jóvenes. La pitiriasis versicolor se manifiesta como máculas ligeramente descamativas hipopigmentadas (blanquecinas) e hiperpigmentadas (rosa, beige, marrón a negro). Las lesiones pueden ser únicas o múltiples y confluir con el tiempo. En ocasiones, pueden referirse leves síntomas de irritación o prurito. La especie más frecuentemente asociada con la pitiriasis versicolor es *M. globosa*, aunque también pueden estar involucradas otras especies (19,46,57–63).

1.1.2.2. Dermatitis seborreica

Es una dermatosis crónica y recidivante que se caracteriza por presentar lesiones eritemato-escamosas poco definidas. Afecta principalmente zonas seborreicas tales como cuero cabelludo, pliegues nasolabiales, cejas, detrás de las orejas y en el pecho sobre el esternón. La caspa es considerada como una forma no inflamatoria de dermatitis seborreica producida en el cuero cabelludo (58,68). Aunque la relación entre *Malassezia* y la dermatitis seborreica fue sugerida ya en 1932, su papel patogénico en esta afección sigue siendo objeto de estudio, ya que no hay evidencia de que estas levaduras invadan la piel. Esta relación se basa en la observación del alto número de estos agentes en materiales clínicos, la efectividad de los tratamientos antimicóticos y la recolonización en los casos de recurrencia. El mecanismo parece ser la respuesta inflamatoria generada por los metabolitos de esta levadura comensal que desencadenan un proceso de dermatitis (19,46,57,62,64–66).

1.1.2.3. Dermatitis atópica

Es un trastorno inflamatorio crónico caracterizado por lesiones eczematosas con eritema, descamación y engrosamiento de la epidermis, acompañada con prurito. Este fenómeno se registra principalmente en adultos jóvenes siendo poco frecuente en niños y afecta meramente a piel lisa y no a los pliegues. Los factores genéticos desempeñan un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad (46,58,69).

La observación de IgE unidas a alérgenos propios de las levaduras de *Malassezia* sumado a la selectividad observada de la respuesta inmune por células T, sugieren el papel de estas levaduras como agentes alérgenos en estos pacientes susceptibles y no como agentes infecciosos (30,66,70).

1.1.2.4. Foliculitis

La foliculitis por *Malassezia* es una erupción inflamatoria pustulosa dispersa que se observa principalmente en la parte superior del tronco, la espalda y la frente. La condición a menudo es desencadenada por la exposición al sol, pero también puede ocurrir en pacientes con cualquier tipo de inmunosupresión. Las biopsias de las lesiones revelan un gran número de levaduras dentro de los folículos pilosos y la inflamación circundante (19,34).

1.1.2.5. Otras afecciones

Malassezia se ha visto implicado en otras afecciones, como blefaritis, otitis externa y la papilomatosis confluyente y reticulada. Otros autores informan casos de onicomycosis (71–73), aunque es posible que su presencia en las mismas represente la asociación

secundaria a un patógeno primario como pueden ser dermatofitos o *Candida* spp. (30). Una vez más, el problema está en relacionar la patogénesis con el hongo, ya que las levaduras lipófilas se pueden encontrar como colonizantes. Además, existe una forma de psoriasis, a veces denominada sebopsoriasis, en la que la distribución clínica de las lesiones puede parecerse a las observadas en la dermatitis seborreica. Por otro lado, las especies de *Malassezia* se han descrito como causantes de infección sistémica, generalmente en recién nacidos. La infección sistémica se encuentra asociada con el uso nutrición parenteral total con suplementación lipídica (19,46).

1.2. Infecciones de la piel. Nanotecnología y medicina tradicional

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano y una parte integral del sistema inmunológico que actúa como la primera línea de defensa contra las infecciones microbianas. Las infecciones de piel son una razón común de consulta en los centros de atención primaria de salud, siendo las malasseziosis una de las más frecuentes (74,75).

Las enfermedades cutáneas asociadas con *Malassezia* son a menudo crónicas y recurrentes. En estos casos, los resultados de la terapia antifúngica, tanto tópica como sistémica, no siempre son eficientes generando altas tasas de recurrencia. En consecuencia, no solo se asocian a altos costos terapéuticos y sin respuesta, sino también a problemas sicosociales por la falta de resolución de esta problemática de salud (1,3,33,45). Además, se ha informado inducción de resistencia *in vitro* al fluconazol en *M. pachydermatis* (76,77), así como fracaso en el tratamiento con terbinafina en pacientes con PV; o con fluconazol o posaconazol en el tratamiento preventivo de la fungemia por *M. furfur* (58,78–80), lo que sugiere la aparición de resistencias (46). Estos resúmenes considerados impulsan el desarrollo de nuevos medicamentos con propiedades antifúngicas y, al mismo tiempo, rentables. En los últimos años, la

combinación de los sistemas médicos tradicionales junto con la nanotecnología surge como una alternativa prometedora que abre la puerta al desarrollo de nuevos fármacos para dar frente a esta problemática.

1.2.1. Nanotecnología: Nanopartículas metálicas

La nanotecnología es un campo importante de la investigación moderna que se ocupa de la síntesis y manipulación de la materia en el rango nanométrico ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), así como el estudio de sus propiedades y aplicaciones (81,82). De ella emerge la nanomedicina como una ciencia interdisciplinaria, que combina el conocimiento de la física, la química, la biología y la medicina para tratar enfermedades del cuerpo humano (83). Dentro de los distintos tipos de nanomateriales, las nanopartículas se caracterizan por tener sus tres dimensiones en escala nanométrica. Hoy en día, los productos basados en nanopartículas están ganando cada vez más terreno, muchos de los cuales ya se encuentran en el mercado (84). Particularmente, las nanopartículas de metales nobles han mostrado propiedades físicas y químicas únicas y considerablemente diferentes en comparación con sus contrapartes a granel (85). A medida que disminuye el tamaño de las nanopartículas, aumenta su relación superficie-volumen, dispersión y actividad antimicrobiana (4–7,84,86).

Entre los diferentes metales nobles, la plata (Ag) es el más ampliamente estudiado, mostrando una eficaz acción antimicrobiana y ser el menos tóxico para las células animales (87,88). La actividad bactericida de la Ag es un hecho bien establecido y tiene un largo registro en la medicina tradicional. Actualmente, la Ag es empleada en la medicina moderna, principalmente, para tratar y prevenir infecciones de la piel como, por ejemplo, la sulfadiazina de plata. Sin embargo, existe un interés creciente en el uso de AgNP para el tratamiento de las infecciones de la piel debido a sus propiedades mejoradas (8,13,18). Similar a la Ag a granel, las AgNP presentan una actividad

antimicrobiana relativamente mayor en comparación con su homólogo macroscópico. Además, se ha demostrado que poseen mejores propiedades antioxidantes y anticancerígenas. Por tal motivo, las investigaciones sobre las AgNP han ido ganando impulso en todo el mundo (9).

Las nanopartículas pueden ser sintetizadas mediante diferentes enfoques: químicos, físicos, biológicos e híbridos. Los métodos físicos son caros y engorrosos para la producción a gran escala debido al consumo continuo de energía y de requerir equipos altamente sofisticados. Además, la vida útil extremadamente corta de las nanopartículas producidas por métodos físicos hace que la adición de un agente de cobertura sea indispensable. Por otro lado, los métodos químicos usan compuestos tóxicos que son peligrosos para el medio ambiente y, generalmente, resultan en la adsorción de químicos tóxicos en la superficie de las nanopartículas sintetizadas, lo que los hace inadecuados para aplicaciones médicas. Además, los subproductos formados durante el proceso presentan efectos nocivos, por lo que se requiere una purificación de las nanopartículas lo que aumenta el costo de producción. Mientras que los métodos de síntesis biológicos, también denominados de síntesis verde por ser considerados respetuosos con el medio ambiente, se basan en el empleo de sistemas biológicos como bacterias, hongos, algas y plantas, o de productos obtenidos a partir de ellos como ser proteínas, péptidos, carbohidratos, etc., los cuales actúan como agentes reductores y de recubrimiento para la síntesis de nanopartículas (89–92).

Entre los diversos métodos biológicos de síntesis de nanopartículas, la síntesis mediada por microbios no es comercialmente viable, ya que implica el mantenimiento de condiciones altamente higiénicas y procesos muy complejos de mantenimiento de cultivos. Además, el tiempo de incubación de los iones metálicos es más largo, por tanto, la tasa de producción es menor para un mismo lapso de tiempo. Del mismo, la utilización de proteínas, péptidos, carbohidratos, etc. requiere de la purificación de estos compuestos a partir de los sistemas biológicos, lo que conlleva mayor gasto y tiempo.

La síntesis mediada por plantas, en ocasiones denominada fitonanotecnología, es considerada la mejor candidata entre los distintos métodos de síntesis verde, ya que proporcionan una forma limpia, ecológica, rentable, eficiente, segura, convenientemente utilizable y beneficiosa para la síntesis de nanopartículas metálicas a gran escala (89–92).

1.2.2. Plantas de la medicina tradicional del nordeste argentino

Las plantas han sido utilizadas como medicinas a lo largo de la historia por diferentes culturas. Mediante el aprendizaje por prueba y error el ser humano fue aprendiendo a distinguir las plantas con efectos beneficiosos de aquellas que eran tóxicas o inactivas. Sus innumerables usos se han documentado y transmitido a través de generaciones como son los sistemas médicos tradicionales organizados (Ayurveda, Unani, Kampo y medicina tradicional china, entre otros) (93).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80 % de la población mundial, especialmente habitantes de los países en desarrollo, utilizan plantas medicinales y/o productos derivados de las mismas como parte del cuidado de su salud, debido a que el acceso a fármacos de laboratorio es inaccesible para ellos (94,95).

El NEA es una de las regiones histórico-geográficas en que se subdivide la República Argentina. De acuerdo al Ministerio del Interior, Obras Públicas y Vivienda (96), el NEA comprende las provincias de Formosa, Chaco, Corrientes, Entre Ríos y Misiones con una superficie total de 368.480 km² (**Figura 2**) (96–98).



Figura 2. Mapa político de la República Argentina en el cual se resalta en verde las provincias que conforman el NEA. Mapa modificado de <https://www.shutterstock.com/es/image-vector/map-argentina-685764829>.

El NEA está habitado principalmente por 5 grupos de indígenas: qom, mocovíes, wichis, pilagás, vilelas y mbyá-guaraní, siendo la población qom la mayoritaria (99,100). Comúnmente, todos los indígenas se hallan en estrecho contacto con la naturaleza, dependiendo de ella en gran parte, para su subsistencia; por ello, poseen un profundo conocimiento de la misma y de sus recursos. Este saber es mayor, cuanto más alejados de las ciudades se encuentran radicados. Dentro del panorama general de la naturaleza, muy probablemente sean las plantas, las que mayor importancia revisten para la vida material de estos indígenas. De ellas obtienen alimento, medicinas, bebidas, sustancias tintóreas y textiles, materiales para construir herramientas, utensilios y, como si fuera poco, elementos usados como amuletos (payé y kurundú). Sus conocimientos sobre las propiedades medicinales de las plantas del NEA son extremadamente amplios (100).

Determinadas hierbas son utilizadas por estos indígenas del NEA como plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades. Entre ellas se destaca el uso de "tapekué", nombre vulgar de *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze, para el tratamiento de infecciones de la piel. Y, específicamente, para tratar las manchas blancas de la piel, en referencia a la pitiriasis versicolor. La "medicina" se prepara por maceración de las hojas y colocando el macerado sobre la zona afectada (101–104).

1.2.2.1. Aspectos generales de la familia Asteraceae

La familia Asteraceae (Compositae, asteráceas o plantas compuestas en un lenguaje coloquial) es la familia más grande de plantas con flores; comprende 3024 especies aceptadas distribuidas en 519 géneros. Sin embargo, se han descrito más de 23600 especies distribuidas en 1620 géneros. Argentina, registra la familia más numerosa con 222 géneros y 1490 especies (105,106) y es considerada, por algunos autores, como el probable lugar de origen de las asteráceas (107,108).

Las asteráceas presentan una amplia distribución geográfica (cosmopolita), con gran concentración de especies en regiones tropicales, subtropicales y templadas (109). Se componen principalmente de hierbas, pero también incluye algunos árboles y arbustos leñosos. Abarca especies de relevancia para la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria, a la par de las ornamentales, malezas y plantas tóxicas (109).

El origen etimológico del nombre de la familia proviene del término latino "aster" que significa "estrella" y que se refiere a la estructura característica de la inflorescencia, en capítulos florales (110).

La familia Asteraceae ha contribuido con un gran número de plantas con monografías descritas en las farmacopeas, y esto se debe al gran número de especies medicinales de esta familia, debido a sus propiedades biológicas (109).

1.2.2.2. *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze

El género *Acanthospermum* incluye 3 especies aceptadas, *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze; *Acanthospermum hispidum* DC.; *Acanthospermum humile* (Sw.) DC. (111).

A. australe es popularmente conocida en el NEA como “tapekué”. Se encuentra fácilmente en las playas de los ríos y afluentes, crece de manera aislada en la arena y es de muy fácil extracción. Por otro lado, es considerada una maleza invasiva ya que se la encuentra en campos agrícolas, pastizales y en barbechos (112–115).

A. australe es un arbusto anual ampliamente distribuido en América del Sur que vegeta durante el invierno y la primavera, y florece en las estaciones de primavera, verano y otoño. Puede alcanzar unos 30 cm de altura, con tallos postrados sobre el suelo o ascendentes, ramificados y pubescentes. Hojas simples, opuestas, de ovadas a rómbico-ovadas, margen dentado irregular, con glándulas en la cara superior y en la cara inferior (mayor cantidad). Inflorescencia en capítulos pedunculados, solitarios, situados en las axilas de las hojas y en los extremos de las ramas. Flores unisexuales; las femeninas marginales, tienen lígulas de 1 mm de largo y las masculinas centrales, pequeñas y de color blanco-amarillento. Frutos tipo aquenio, envueltos por las brácteas persistentes del involucre formando un fruto fusiforme y cubiertos de cerdas ganchudas y rígidas, que son muy adherentes (114,115) (**Figura 3**). En la **Tabla 3** se observan los detalles de su posición taxonómica (116).



Figura 3. *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze. Fotografía de autoría propia.

Tabla 3. Posición taxonómica de *A. australe* (Loefl.) Kuntze.

Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Infrareino	Streptophyta
Subreino	Viridiplantae
Superdivisión	Embryophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina

Clase	Magnoliopsida
Superorden	Asteranae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	<i>Acanthospermum</i> Schrank
Especie	<i>Acanthospermum australe</i> (Loefl.) Kuntze
Nombres vulgares	“tapekué”, “tapecué”, “natiu”, “tayecuí”, “tepecurí”, “yerba de la oveja”, “ihi kukae hipa”, “sandiabó guazú”, “sandiabó miní”, “tapé tuyá”, “pipili” (15).

Etimológicamente, *Acanthospermum* deriva de los términos griegos “akanthes” y “sperma” que significan espina y semilla, respectivamente, haciendo referencia a las semillas espinosas de esta planta; mientras que *australe* se refiere a su ubicación geográfica (117).

En la medicina tradicional, el tapekué es una planta utilizada con diversos propósitos. A esta hierba se le atribuye las siguientes propiedades: digestivo, colagogo, antiséptico, cicatrizante, antiinflamatorio, antirreumático, diaforético, febrífugo, diurético, anticonceptivo y abortivo. Preferentemente, se emplea la parte aérea (hojas) y en segundo lugar la planta entera, las cuales pueden ser utilizadas tanto por vía oral como por vía tópica. Por vía tópica, la planta entera se usa en decocción como antiséptico y cicatrizante de heridas ulcerosas, también actúa como antiinflamatorio. La decocción de las hojas externamente se usa como cicatrizante, en infusión en casos de dermatitis y el macerado aplicado en cataplasma como antiséptico. También se utiliza en lavados vaginales contra la leucorrea y la gonorrea (112,115).

2. SIGNIFICADO Y ORIGINALIDAD DE LA PROPUESTA

El uso de hierbas para la cura de diversas afecciones es una práctica frecuente entre los habitantes del NEA, además de la población indígena. Un alto porcentaje vive en un contexto económicamente desfavorable en cuanto a sus posibilidades para acceder a los fármacos de laboratorio. Ante esta barrera, recurren a los conocimientos de la medicina tradicional para el tratamiento y cuidado de su salud. Por otro lado, observábamos que una de las principales causas de consultas en el Laboratorio de Micología del Instituto de Medicina Regional (IMR) de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) son debidas a micosis superficiales asociadas a *Malassezia* spp.

En respuesta a estas necesidades, surgió el presente proyecto con el objeto de encontrar y evaluar nuevas alternativas antifúngicas que sean efectivas, seguras pero al mismo tiempo, económicamente accesibles. La combinación de los conocimientos de la medicina tradicional del NEA con la nanotecnología surgió luego de una intensa búsqueda bibliográfica de las posibles fuentes de nuevas drogas.

Como impacto de esta investigación, se espera que los resultados puedan ser transferidos al sector productivo. La bioprospección de una planta medicinal del NEA para la síntesis de AgNP nos permitirá obtener el aval científico para la futura elaboración de un fármaco de acción tópica de posible aplicación en medicina humana y animal con propiedades antifúngicas. Esto sería un valioso aporte al sistema primario de atención de salud. Un producto con estas características, elaborado a partir de componentes de origen natural, permitiría el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para optimizar la farmacoterapia antimicrobiana contra las infecciones de la piel pero incluyendo, al mismo tiempo, una alternativa ante el incremento de la resistencia. Asimismo, impulsar la innovación productiva de la región en un marco de desarrollo sustentable, generando un impacto económico-productivo regional positivo, pero también incentivando la inversión en este tipo de investigaciones por parte de la industria cosmética y farmacéutica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Sintetizar AgNP a partir de un extracto vegetal y evaluar su actividad inhibitoria *in vitro* frente a diversas especies de *Malassezia*, así como también, evaluar su citotoxicidad frente a células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

3.2. Objetivos específicos

- Recolectar hojas de *A. australe*.
- Acondicionar el material vegetal.
- Obtener el extracto acuoso de las hojas de *A. australe*.
- Sintetizar AgNP a partir del extracto obtenido.
- Caracterizar las AgNP sintetizadas.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración fungicida mínima (CFM) del extracto acuoso de *A. australe* frente a diferentes cepas de diversas especies de *Malassezia*.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración fungicida mínima (CFM) del AgNO₃ frente a diferentes cepas de diversas especies de *Malassezia*.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración fungicida mínima (CFM) de las AgNP obtenidas frente a diferentes cepas de diversas especies de *Malassezia*.

- Comparar los valores de CIM obtenidos con valores de CIM de los antifúngicos de uso clínico frecuente para el tratamiento de malasseziosis.
- Evaluar la citotoxicidad de las AgNP y de los componentes utilizados para su síntesis frente a CMSP.

4. HIPÓTESIS

- A partir del extracto acuoso de hojas de *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze se pueden sintetizar AgNP estables.
- Las AgNP sintetizadas presentan actividad inhibitoria *in vitro* frente a *Malassezia* spp.
- Las AgNP sintetizadas presentan CIM especie dependientes.
- Las AgNP sintetizadas presentan valores de CIM similares a los obtenidos con los antifúngicos de uso clínico convencional.
- Las AgNP sintetizadas no son citotóxicas frente a CMSP en concentraciones suficientes para inhibir el crecimiento fúngico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material vegetal

Se utilizaron hojas de plantas adultas de *A. australe* (Loefl.) Kuntze. La identificación de las plantas procesadas fue corroborada en el Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), UNNE - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), donde se depositó un ejemplar. Se tomaron registros de las coordenadas del cultivo, la época del año y el momento del muestreo.

Las hojas de las plantas fueron cosechadas a mano, de acuerdo a las directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales (118), depositando el material recolectado en cajas de cartón aireadas y limpias. Luego, se realizó una inspección minuciosa de las hojas, descartando aquellas que presentaban una tonalidad amarillenta, estaban secas, en descomposición o presentaban algún material extraño (insectos, parásitos, etc.). Seguidamente, las hojas fueron lavadas bajo agua corriente durante 10 minutos, desinfectadas por inmersión en una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 0,5 % durante 10 minutos, enjuagadas con agua purificada estéril y, posteriormente, escurridas. Luego, las hojas fueron secadas a temperatura ambiente protegidas de la luz solar, de acuerdo a la tradición de los indígenas, hasta peso constante (119,120). Una vez secas, fueron almacenadas en cajas de cartón limpias, rotuladas y protegidas de la luz y de fuentes de contaminación, en un lugar fresco y seco.

En el instante previo a la obtención del extracto, el material vegetal almacenado fue triturado y tamizado (**Figura 4**) con una malla de 2 mm de diámetro.



Figura 4. Equipo de molienda y tamiz.

5.2. Obtención del extracto acuoso de tapekué (TAE)

50 g del material vegetal se llevó a ebullición con 1000 mL de agua desionizada estéril durante 5 minutos, seguido de agitación continua a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, el extracto obtenido se filtró con papel de filtro Whatman no. 1 (**Figura 5**), seguido por un filtro Millipore estéril de 0,22 μm de poro. Posteriormente, se liofilizó (**Figura 6**) y el extracto liofilizado (EL) obtenido se almacenó a 4 °C en frascos de vidrio color ámbar, estériles, con cierre hermético y protegidos de la luz.



Figura 5. Equipo de filtración.



Figura 6. Equipo de liofilización.

5.3. Rendimiento de la extracción

Se determinó como la relación porcentual entre la cantidad de extracto liofilizado obtenido y la cantidad de material vegetal empleado, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$R = \left(\frac{EL}{MV} \right) \times 100$$

donde:

R: Rendimiento de la extracción expresado en % (p/p).

EL: cantidad de extracto liofilizado obtenido, expresado en gramos.

MV: cantidad de material vegetal empleado, expresado en gramos.

5.4. Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales del extracto acuoso de *A. australe* se determinó espectrofotométricamente a partir de la capacidad de reducción del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, EE.UU.) de acuerdo con la metodología de Waterhouse (2002) (121), con algunas modificaciones.

El extracto liofilizado fue reconstituido con agua desionizada para obtener una concentración de 1 mg de EL / mL. Posteriormente, 20 µL de muestra se adicionó a 1,4 mL de agua destilada, seguido de 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu (2N). La solución

se dejó reposar en la oscuridad durante 3 minutos a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de reposo y bajo agitación vigorosa, se adicionó 300 μL de una solución de carbonato de sodio (Sigma-Aldrich) al 20 % (m / v) y 180 μL de agua destilada. La solución resultante se dejó reposar en la oscuridad durante 100 minutos y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 760 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Multiskan Go, Thermo Fisher, Finlandia). Los resultados se expresaron como la media de la masa equivalente de ácido gálico en mg por g de extracto liofilizado (mg EAG / g EL) \pm desviación estándar (DS) para tres repeticiones.

5.5. Cuantificación de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales del extracto acuoso se determinó de acuerdo con el método colorimétrico descrito por Dewanto y col. (122), con modificaciones. Primero, el extracto liofilizado fue reconstituido con agua destilada para obtener una concentración de 1 mg de EL / mL. Se agregaron 200 μL del extracto reconstituido a 1000 μL de agua destilada con 60 μL de una solución de NaNO_2 (5 %) (Cicarelli, Argentina). Después de 6 minutos, se añadieron 120 μL de una solución de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Cicarelli) al 10 % y se dejó reposar durante 5 minutos. Luego, se añadieron 400 μL de NaOH (1 M) (Cicarelli) y 220 μL de agua destilada bajo agitación vigorosa. Inmediatamente, la absorbancia de la solución resultante se leyó a 510 nm. El contenido de flavonoides totales se expresó como la media de la masa equivalente de quercetina en mg por g de extracto liofilizado (mg EQ / g EL) \pm DS para tres repeticiones.

5.6. Síntesis verde de nanopartículas de plata

Con el objeto de obtener nanopartículas monodispersas, pequeñas y estables, la síntesis verde se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores (6,123–125), con algunas modificaciones. El extracto liofilizado fue reconstituido para

obtener una concentración de 50 mg de EL / mL, y se ajustó a pH 9,5 usando una solución de NaOH 0,1 N. Posteriormente, se añadieron 10 mL del extracto a 190 mL de una solución de AgNO₃ 1 mM para la reducción de iones plata (Ag⁺). La reacción se llevó a cabo a 95 °C durante 15 minutos. La solución de nanopartículas obtenida se purificó por centrifugación y resuspensión (3 veces) del sedimento en agua desionizada estéril a 15000 rpm durante 20 minutos para eliminar cualquier sustancia no coordinada.

5.6.1. Caracterización de las AgNP

Las AgNP sintetizadas se caracterizaron mediante las siguientes técnicas:

- a) Espectroscopia UV-Visible: Se usó un espectrofotómetro UV-Visible (MultiskanGo, Thermo Fisher, Finlandia) para medir la absorbancia y registrar la densidad óptica para una longitud de onda de 300 a 700 nm.
- b) Microscopía electrónica de transmisión (MET): La forma y el tamaño de las AgNP se evaluaron con un microscopio electrónico de transmisión (JEOL, Tokio, Japón; JEM-2100) a un voltaje de aceleración de 200 kV. Para la obtención de las imágenes, las muestras se prepararon colocando cuidadosamente 10 µL de solución de AgNP en una rejilla de cobre recubierta de carbono, seguido de secado al aire para formar una capa delgada en la superficie. Mediante el empleo del software ImageJ, se determinó el tamaño de al menos unas 100 partículas. Para el análisis estadístico, los datos se transfirieron al software Origin a partir del cual se construyó un histograma y el resultado se expresó como la media ± DS.
- c) Espectroscopía de rayos X con dispersión de energía (EDX): Se realizó un análisis de EDX para evaluar la composición elemental de las nanopartículas sintetizadas.
- d) Dispersión dinámica de luz (DLS): Se investigó el tamaño hidrodinámico, el índice de polidispersidad (PDI) y el potencial zeta de la solución de AgNP mediante DLS utilizando un espectrómetro de dispersión compacto Malvern Zetasizer Nanoseries (Malvern, Reino Unido) a 25 °C.

e) Espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FTIR): se realizó a una resolución de 0,2 nm en un rango de 40–4000 cm^{-1} (Nicolet670, Madison, WI) para identificar las posibles biomoléculas responsables de la reducción de los iones Ag^+ y de recubrimiento de las AgNP.

Los análisis por espectroscopia UV-Visible y por DLS se emplearon para evaluar la estabilidad de las nanopartículas sintetizadas durante un lapso de 6 meses.

5.7. Actividad antioxidante

A través de un acuerdo con el Instituto Politécnico Nacional (IPN), Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada - Unidad Legaria (CICATA-Legaria), Ciudad de México, México, el extracto liofilizado de tapekué, una solución de AgNO_3 1 mM y la solución de AgNP sintetizadas fueron derivadas para evaluar su actividad antioxidante.

5.7.1. Poder antioxidante reductor del hierro (FRAP)

La actividad antioxidante se evaluó mediante el ensayo del FRAP siguiendo la metodología propuesta por Quiroz-Reyes y col. (126). Este método se basa en la reducción de los iones Fe^{3+} por la muestra y la estimación del complejo coloreado de Fe^{2+} con 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) a 593 nm. La solución FRAP se preparó mezclando 25 mL de buffer de acetato (0,3 M; pH 3,6), 2,5 mL de solución TPTZ (0,01 M) (Sigma-Aldrich) y 2,5 mL de una solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02 M) (Cicarelli), y se llevó a una temperatura de 37 °C previo a su uso. Se mezclaron 100 μL de muestra (1 mg de EL / mL; solución de AgNO_3 1 mM; o solución de AgNP sintetizadas) con 1900 μL de solución de FRAP. La mezcla se agitó vigorosamente y se dejó reposar por 30 minutos en la oscuridad. Posteriormente, la absorbancia se leyó a una longitud de onda de 593 nm. Cada muestra fue analizada por triplicado. Los resultados se informaron

como la media de μmol equivalentes de Trolox (Sigma-Aldrich) por g de extracto liofilizado ($\mu\text{mol ET} / \text{g EL}$) \pm DS.

5.7.2. Inhibición del radical DPPH

La capacidad antirradical se determinó sobre el radical DPPH (127), siguiendo las recomendaciones propuestas por Molyneux (2004) (128). Una alícuota de 500 μL de muestra (1 mg de EL / mL; solución de AgNO_3 1 mM; o solución de AgNP sintetizadas) fue mezclada con 125 μL de Tris-HCl (pH 7,4; 0,1 M) (Sigma-Aldrich). A esta solución, se le agregaron 500 μL de DPPH (431,1 μM) (Sigma-Aldrich). Después de 30 minutos de reposo en la oscuridad, la absorbancia fue registrada a 517 nm. La concentración efectiva al 50 % (CE_{50}), definida como la cantidad de antioxidante necesaria para reducir en un 50 % la concentración inicial del radical DPPH, fue calculada. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g} / \text{mL}$. Además, se determinó el porcentaje de reducción de DPPH de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición de DPPH (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia blanco}}\right) \times 100$$

5.8. Ensayo de citotoxicidad

Bajo el mismo acuerdo con el IPN, CICATA-Legaria, México, se evaluó la citotoxicidad del TAE, AgNO_3 y AgNP, frente a células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de acuerdo a la metodología de Maldonado-Cubas y col. (129), con modificaciones.

Las CMSP se obtuvieron a partir de paquetes de leucocitos de donantes sanos (Banco de Sangre, Hospital Central Militar, Ciudad de México) utilizando el medio de gradiente de densidad Lymphoprep (Axis-Shield, Noruega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las CMSP se sembraron en placas de 96 pocillos en una confluencia de 5×10^4 células por pocillo en un volumen de 50 μL de medio de cultivo X-VIVO™ (Lonza, EE.UU.).

A cada pocillo se agregó 50 μL de las soluciones de TAE, AgNO_3 o AgNP para obtener un volumen final de 100 μL . Las concentraciones finales fueron 2, 4, 8, 16 y 32 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (la concentración se expresó como μg de EL / mL para TAE; y en términos de contenido de Ag para AgNP y AgNO_3). Como control negativo se utilizaron células no tratadas con TAE, AgNO_3 o AgNP, y como control positivo paclitaxel 2,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Sigma Aldrich, EE. UU.).

Las células se incubaron durante 24 y 72 horas a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO_2 . Finalizado el tiempo de incubación, se agregaron 10 μL del reactivo WST-1 (Clontech) a cada pocillo y se incubaron nuevamente durante 90 minutos a 37 °C en atmósfera humidificada con 5 % de CO_2 . Pasado este tiempo, las placas se agitaron durante 5 segundos, y se determinó la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de ELISA. Los diferentes tratamientos se compararon con el control negativo y se calculó el porcentaje de viabilidad celular. Los tratamientos con porcentajes de viabilidad inferiores al 70% se consideraron citotóxicos de acuerdo con las recomendaciones de la ISO 10993-5 (130,131).

5.9. Microorganismos

Un total de 75 aislamientos de *Malassezia* fueron estudiados: 40 *Malassezia furfur*, 25 *M. sympodialis*, 9 *M. globosa* y 1 *M. restricta*. Se incluyeron en el estudio las cepas de referencia: *M. furfur* CBS 7019, *M. sympodialis* CBS 7222, *M. globosa* CBS 7986.

Todas las cepas fueron obtenidas de la colección de cultivos del Departamento de Micología del IMR, UNNE, Chaco, Argentina. Las mismas se encuentran conservadas a temperatura ambiente en agar Dixon modificado (Anexos) con una capa de vaselina

líquida estéril. Previo a su estudio, las cepas fueron repicadas e incubadas en agar Dixon modificado. Con el fin de obtener microorganismos metabólicamente activos, cada cepa fue subcultivada 3 veces antes de realizar los ensayos correspondientes.

5.10. Evaluación de la actividad inhibitoria

5.10.1. Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Con el fin de evaluar la actividad inhibitoria de las soluciones de TAE, AgNO₃ y AgNP, se determinó la CIM mediante el método de microdilución en caldo de acuerdo con el documento CLSI M27 (132), y se realizaron las modificaciones propuestas por Rojas y col. (2) para *Malassezia* spp. por tratarse de levaduras lipodependientes. Considerando que, tanto los extractos vegetales como el AgNO₃ y las AgNP sintetizadas, no están contemplados en los documentos del CLSI, la CIM se determinó mediante la lectura visual de la inhibición del crecimiento en tres puntos finales (133):

CIM-2 como la concentración más baja capaz de inhibir $\geq 50\%$ de crecimiento en comparación con el pocillo de control de crecimiento libre del compuesto;

CIM-1 como la concentración más baja capaz de inhibir $\geq 80\%$ de crecimiento en comparación con el pocillo de control de crecimiento libre del compuesto;

CIM-0 como la concentración más baja que inhibe completamente el crecimiento.

El itraconazol (ITZ) se usó como control de inhibición y se empleó la CIM-2 como punto final de lectura en concordancia con Rojas y col. (2).

Para definir actividad antifúngica, se siguieron los criterios establecidos por otros autores (134–142), con algunas modificaciones. De los mismos se desprende que los extractos de plantas son considerados activos cuando la CIM-2 $\leq 1024 \mu\text{g} / \text{mL}$, e inactivos para valores superiores. Mientras que para compuestos puros se establece un valor de

actividad de CIM-2 \leq 256 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (133). En este trabajo, las soluciones de AgNO_3 y AgNP fueron consideradas como compuestos puros y el TAE como un extracto de planta.

5.10.2. Concentración fungicida mínima (CFM)

La CFM de TAE, AgNO_3 y AgNP se determinó de acuerdo con los procedimientos establecidos por otros autores (143–145), con modificaciones.

Después de leer la CIM, el contenido de cada pocillo que presentó inhibición completa del crecimiento se homogeneizó con una micropipeta y el volumen completo (200 μL) de estos pocillos se sembró en placas de agar Dixon modificado. Las alícuotas se depositaron en el agar, luego se las dejó secar en estufa y se estrió uniformemente sobre toda la superficie del agar. Las placas se incubaron a 32 °C durante 72 h.

La CFM se definió como la concentración más baja a partir de la cual no hubo desarrollo de colonias (actividad de muerte del 99,9 %).

Todos los ensayos de CIM y CFM se realizaron por duplicado. Se obtuvieron valores de rango y moda. Los resultados se expresaron en términos de μg de EL / mL para TAE; y en términos de μg Ag / mL para AgNP y AgNO_3 .

5.10.3. Actividad fungicida / fungistática

Se calcularon las relaciones CFM:CIM-0 para cada cepa con el fin de estimar si el TAE, AgNO_3 y AgNP presentaban actividad fungicida o fungistática.

De acuerdo con la definición convencional utilizada para las pruebas bacterianas y por extrapolación para las pruebas con hongos, se consideró fungicida cuando la proporción era \leq 4 y fungistático cuando la proporción era $>$ 4 (145–148).

5.11. Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados fueron analizados utilizando el software InfoStat (versión 2017) proporcionado por la Cátedra de Estadística y Biometría, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

6. RESULTADOS

6.1. Material vegetal

Las hojas con coloración verde de plantas adultas de tapekué fueron recolectadas en la localidad de Riachuelo, Corrientes, Argentina (27°33'42.0"S - 58°43'35.9"W), durante la etapa de floración, en febrero de 2017, en las primeras horas de la mañana, una vez dispersado el rocío. Las plantas fueron identificadas por el Dr. Massimiliano Dematteis, taxónomo del IBONE, UNNE-CONICET, Corrientes, Argentina, donde se conserva un ejemplar de la especie vegetal.

6.2. Rendimiento, contenido de fenoles y flavonoides totales

Al aplicar la ecuación correspondiente, se determinó que el rendimiento de la extracción de los metabolitos presentes en las hojas de tapekué fue del 12 %. Por otro lado, el contenido de fenoles y flavonoides totales del TAE fue de $155,9 \pm 3,9$ mg EAG / g EL y $20,97 \pm 0,32$ mg EQ / g EL, respectivamente.

6.3. Caracterización de las AgNP

Durante la síntesis verde, el cambio de color de la solución indicó la formación de AgNP. El espectro UV-Visible mostró una banda de absorción máxima a 410 nm, correspondiente a la resonancia de plasmón de superficie típica de las nanopartículas (44) (**Figura 7**). Las imágenes por MET mostraron nanopartículas esféricas no aglomeradas de $14,01 \pm 2,1$ nm de diámetro (**Figura 8**). El histograma de distribución se muestra en la **Figura 9**.

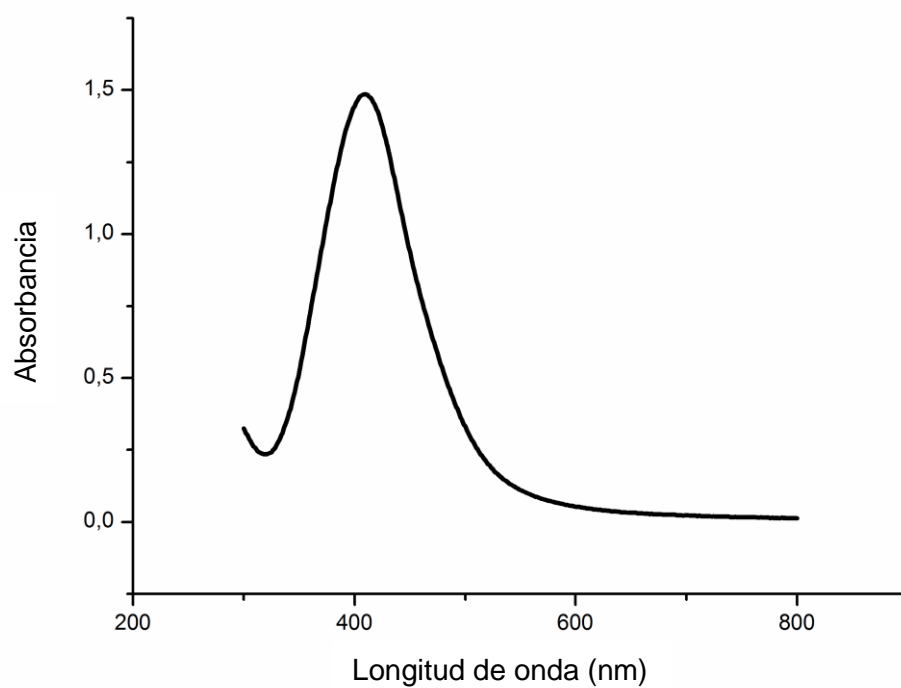


Figura 7. Espectro UV-Visible de las AgNP sintetizadas.

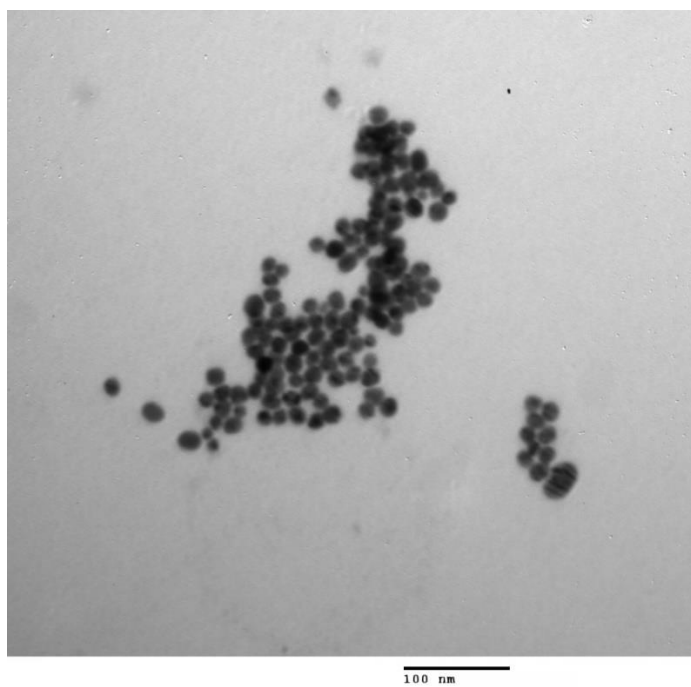


Figura 8. Imagen obtenida con MET de las AgNP sintetizadas.

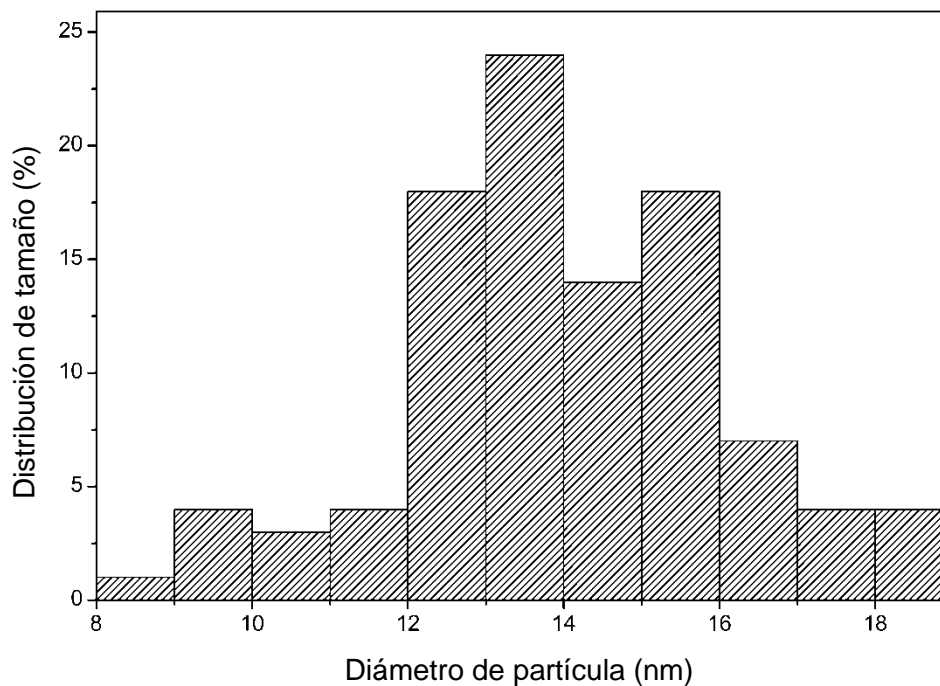


Figura 9. Histograma de distribución del tamaño de las AgNP.

El análisis por DLS mostró nanopartículas monodispersas fuertemente aniónicas con un PDI de 0,269; diámetro hidrodinámico de 36 ± 13 nm; y potencial zeta de -37 ± 6 mV.

El análisis por EDX mostró una fuerte señal de Ag elemental (**Figura 10**) con un pico de banda de absorción óptica en el rango de 3 a 4 keV, que es típico para la absorción de nanocristales de Ag. Otras señales elementales se registraron en cantidades más pequeñas.

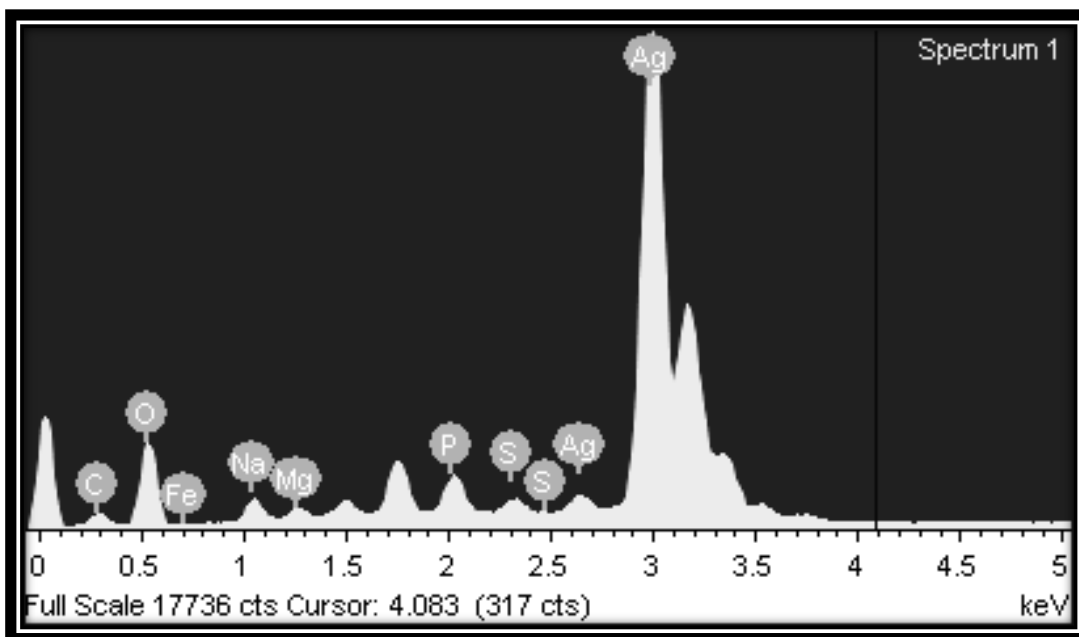


Figura 10. EDX de las AgNP sintetizadas.

El espectro FTIR de las AgNP mostró picos alrededor de 1636, 2100 y 3300 cm^{-1} (**Figura 11**).

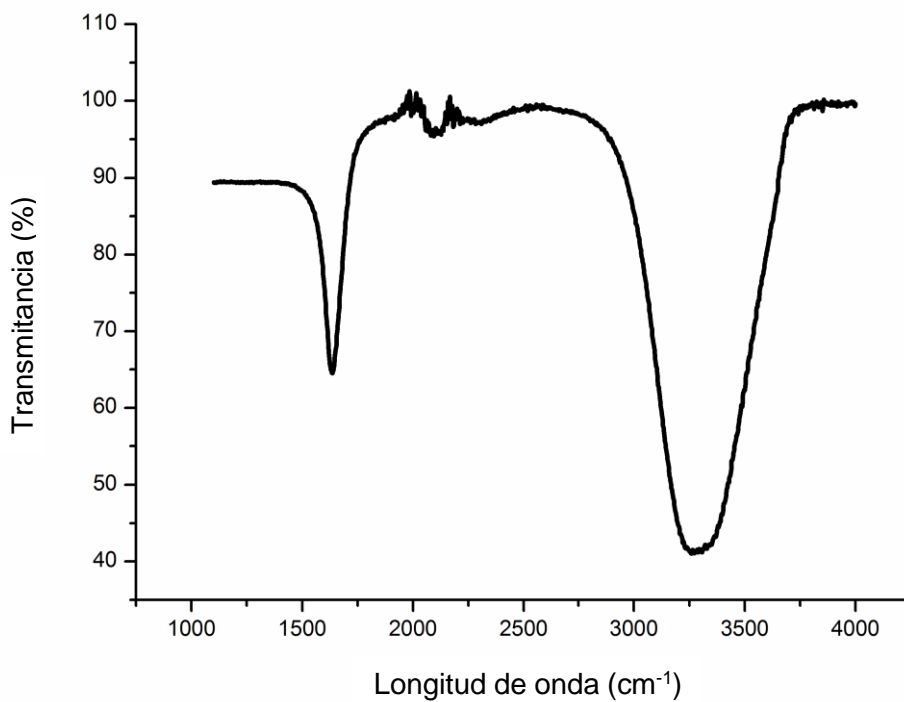


Figura 11. Espectro FTIR de las AgNP.

6.4. Actividad antioxidante

Los resultados de los ensayos de FRAP y DPPH para TAE, AgNO₃ y AgNP se presentan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Actividad antioxidante de TAE, AgNO₃ and AgNP.

Muestra	DPPH		FRAP ^(a)
	CE ₅₀ ^(b)	% inhibición	
TAE	306,5 ± 1,6	77,7 ± 1,8	596 ± 10
AgNO ₃	ND	3,6 ± 1,2	0 ± 0
AgNP	ND	35,2 ± 0,4	279 ± 1

^(a) μmol ET / g EL; ^(b) μg EL / mL; ND: No determinado.

6.5. Actividad citotóxica

El efecto del TAE, AgNO₃ y AgNP sobre la viabilidad de CMSP a las 24 y 72 horas de incubación se muestran en la **Figura 12**.

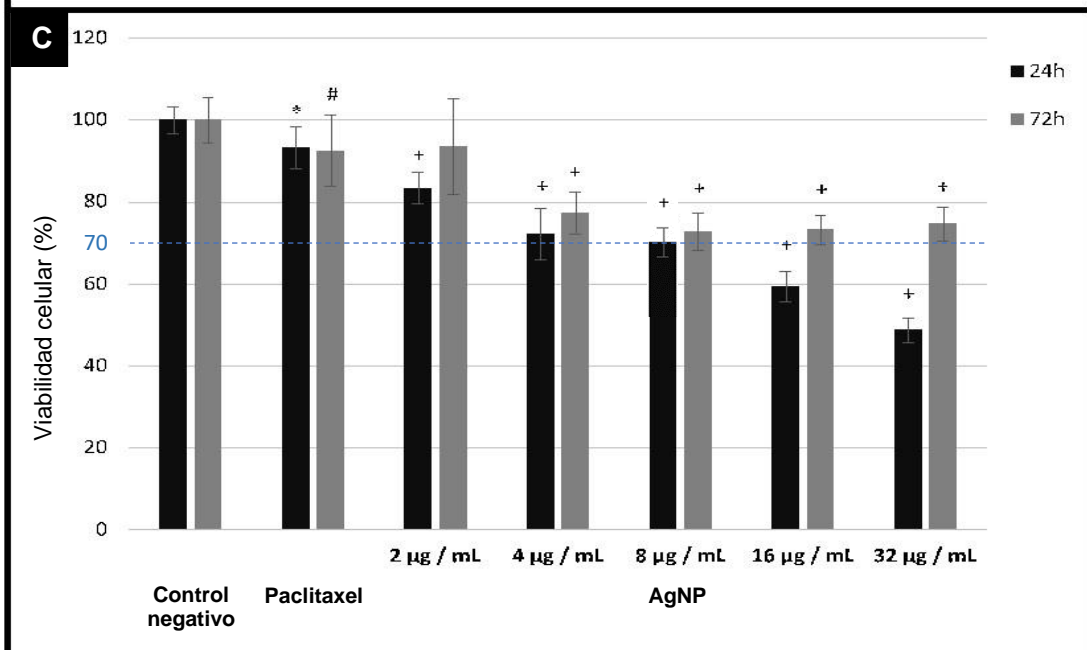
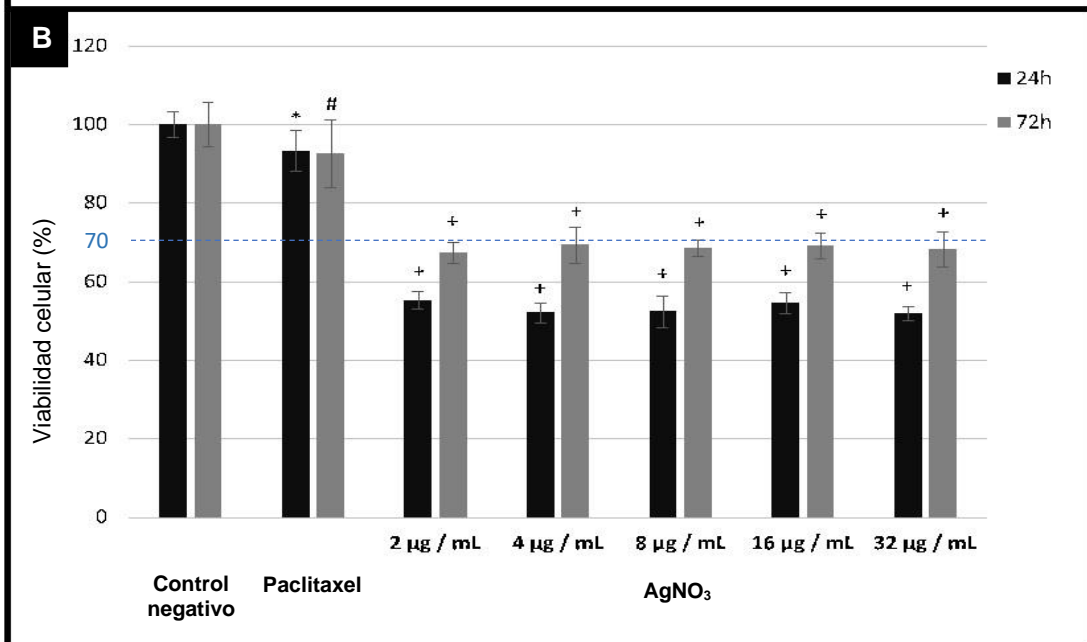
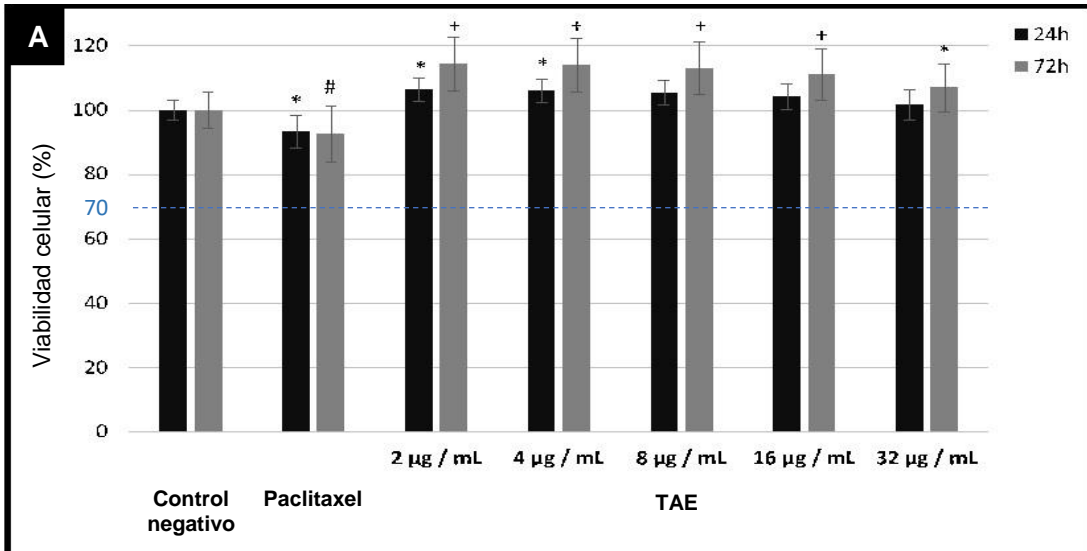


Figura 12. Porcentajes de viabilidad de las CMSP a las 24 y 72 horas de incubación. Resultados expresaron en términos de: **(A)** μg de EL / mL para TAE; **(B)** μg Ag / mL para AgNP; y **(C)** μg Ag / mL AgNO_3 . Control negativo: células no tratadas. Control positivo: paclitaxel (2,5 μg / mL). Para cada grupo de tratamiento y control, el número de determinaciones fue ≥ 12 . El símbolo (*) indica una diferencia estadísticamente significativa con el control negativo para una P entre 0,0137 y 0,0436; el símbolo (#) indica una diferencia estadísticamente significativa con el control negativo para una P entre 0,0051 y 0,0067; el símbolo (+) indica una diferencia estadísticamente significativa del control negativo para una $P < 0,0001$.

6.6. Actividad inhibitoria *in vitro*

En la **Tabla 5** se muestran los valores de rango y moda de CIM-2, CIM-1, CIM-0, CFM y CFM:CIM-0 obtenidos con TAE, AgNO_3 , AgNP e itraconazol (ITZ) frente a todas las cepas ensayadas. Mientras que en la **Tabla 6** se realiza una comparación entre los valores de moda de CIM-2 obtenidos con las AgNP y los valores de CIM de los antifúngicos de uso clínico más frecuentemente empleados en el tratamiento de las malasseziosis.

Tabla 5. Valores de rango y moda de CIM-2, CIM-1, CIM-0, CFM y CFM:CIM-0 para el extracto acuoso de tapekué (TAE), nitrato de plata (AgNO₃), nanopartículas de plata (AgNP) e itraconazol (ITZ) frente a todas las especies de *Malassezia* ensayadas. Los resultados de CIM y CFM se expresaron en términos de: µg de EL / mL para TAE; µg Ag / mL para AgNP; y µg Ag / mL AgNO₃.

Especies (N)	CIM-2		CIM-1		CIM-0		CFM		CFM:CIM-0		
	Compuesto	Rango	Moda	Rango	Moda	Rango	Moda	Rango	Moda	Rango	Moda
<i>M. furfur</i> (40)											
	TAE	>1024	ND	>1024	ND	>1024	ND	ND	ND	ND	ND
	AgNO ₃	1 – 8	4	1 – 8	4	2 – 8	8	4 – 32	16	2 – 4	2
	AgNP	0,06 – 4	0,125	0,125 – 4	0,125	0,125 – 4	0,25	0,25 – 8	0,5	1 – 4	2
	ITZ	0,03 – 0,125	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. furfur</i> CBS 7019											
	ITZ	ND	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. sympodialis</i> (25)											
	TAE	>1024	ND	>1024	ND	>1024	ND	ND	ND	ND	ND

AgNO₃	0,25 – 4	2	0,5 – 4	2	1 – 4	4	2 – 16	8	2 – 4	2
AgNP	0,015 – 2	0,125	0,03 – 2	0,125	0,03 – 4	0,25	0,06 – 4	0,25	1 – 4	2
ITZ	0,015 – 0,06	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. sympodialis</i> CBS 7222										
ITZ	ND	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. globosa</i> (9)										
TAE	>1024	ND	>1024	ND	>1024	ND	ND	ND	ND	ND
AgNO₃	0,25 – 1	0,5	0,25 – 2	0,5	0,5 – 4	2	1 – 16	8	2 – 4	2
AgNP	0,06 – 0,25	0,06	0,06 – 0,25	0,125	0,125 – 0,5	0,125	0,125 – 1	0,125	1 – 4	2
ITZ	0,015 – 0,06	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. globosa</i> CBS 7986										
ITZ	ND	0,015	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>M. restricta</i> (1)										
TAE	>1024	ND	>1024	ND	>1024	ND	ND	ND	ND	ND
AgNO₃	ND	0,5	ND	1	ND	2	ND	4	ND	2

AgNP	ND	0,25	ND	0,5	ND	1	ND	1	ND	1
ITZ	ND	0,03	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

CIM-2: concentración más baja del agente antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento microbiano en un porcentaje ≥ 50 % en comparación con el pocillo de control de crecimiento libre de agente antimicrobiano.

CIM-1: concentración más baja del agente antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento microbiano en un porcentaje ≥ 80 % en comparación con el pocillo de control de crecimiento libre de agente antimicrobiano.

CIM-0: concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento microbiano.

CFM: concentración más baja del agente antimicrobiano que no mostró desarrollo de colonias (actividad de muerte del 99,9 %).

ND: No determinado.

Tabla 6. Comparación de los valores de moda de CIM obtenidos con los antifúngicos de uso clínico convencional por Rojas y col. (2) con las AgNP sintetizadas en este trabajo. FLC: fluconazol. AMB: anfotericina B. MCZ: miconazol. VCZ: voriconazol. ITZ: itraconazol. KTZ: ketoconazol. Valores de CIM expresados en $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Droga \ Especie	<i>M. furfur</i>	<i>M. simpodialis</i>	<i>M. globosa</i>
FLC	4	0,25	0,5
AMB	1	0,25	1
MCZ	2	0,03	0,03
AgNP	0,125	0,125	0,06
VCZ	0,06	0,06	0,03
ITZ	0,03	0,03	0,03
KTZ	0,03	0,03	0,03

7. DISCUSIÓN

En los últimos años, la OMS ha destacado la importancia en la investigación y el desarrollo de nuevos medicamentos antimicrobianos como consecuencia del aumento de la morbilidad y los costos de salud asociados con el aumento de cepas resistentes (149). En respuesta a ello, las nanopartículas y las plantas medicinales han surgido como una alternativa prometedora y como potenciales fuentes de nuevos agentes antimicrobianos para el tratamiento de infecciones de la piel (83,150). Entre ellas, las afecciones cutáneas asociadas a *Malassezia* spp. son una de las principales causas de consulta en los centros de atención especializados en micología médica.

Por otro lado, el desarrollo de métodos eficientes de síntesis verde se ha convertido en un foco importante de investigación. La síntesis biológica de AgNP usando plantas ha demostrado ser una alternativa rentable, ecológica y valiosa para la producción a gran escala (151). El ayurveda, el antiguo sistema médico indio, fue quizás el primero en utilizar las preparaciones de hierbas con elementos metálicos, a menudo llamadas bhasmas, para el tratamiento de muchas enfermedades. El bhasma de plata es un medicamento conocido desde el siglo VII a. C. que se obtiene después de exponer la Ag a través de una variedad de procesos fisicoquímicos en presencia de hierbas medicinales. Hoy, se ha demostrado que son nanopartículas producidas biológicamente (152). Sin embargo, el mecanismo de síntesis de las nanopartículas que usan extractos de plantas aún no se comprende completamente, pero se sabe que los extractos vegetales contienen una variedad de metabolitos secundarios como flavonoides, terpenoides, polisacáridos, proteínas y alcaloides, que son los principales responsables de actuar como agentes reductores y de recubrimiento para la formación de AgNP estables (153).

7.1. Material vegetal

La elección de la especie vegetal empleada para la síntesis verde de AgNP se basó en el conocimiento ancestral de las plantas medicinales por los indígenas del NEA para el tratamiento de infecciones de la piel. Al aplicar el enfoque etnofarmacológico, basado en la selección de las especies de plantas de acuerdo con su aplicación medicinal tradicional (154), se buscó combinar el conocimiento etnomédico con la nanotecnología.

La información obtenida, por parte de los indígenas, sobre cuál parte de la planta utilizan (donde, posiblemente, el principio activo se encuentra en mayor proporción), cómo la procesan y administran (oral o tópicamente), junto con la recopilación de información con aval científico, proporcionaron los datos necesarios para perfilar el enfoque de esta investigación hacia plantas empleadas para el tratamiento tópico de infecciones de piel, y descartar aquellas que posiblemente presentan solo un efecto placebo en un contexto determinado. Es a partir de esta información que se decidió trabajar con las hojas de tapekué. Entre los múltiples usos tradicionales del tapekué, los indígenas del NEA lo utilizan externamente para tratar diversas afecciones cutáneas, entre ellas, a las manchas de la piel, en referencia a la pitiriasis versicolor. La medicina es preparada por maceración de las hojas y el macerado es aplicado directamente sobre la zona afectada (15,112,115,155–158).

Durante la etapa de recolección del material vegetal se tuvieron en cuenta determinados aspectos establecidos por otros autores (93,118,154,159), entre ellos:

- Las áreas de recolección seleccionadas estuvieron alejadas de la polución y de los cultivos agrícolas, debido a que la presencia de metales pesados y compuestos agroquímicos pueden influir en los ensayos posteriores. Aún más, se evitó recolectar cerca de: zanjas de drenaje, bordes de carreteras, escombreras de explotaciones mineras, vertederos y plantas industriales que puedan producir emisiones tóxicas. Asimismo, en zonas de pastoreo activo y en

sus inmediaciones, con el fin de evitar la contaminación microbiana procedente de los residuos de los animales.

- Se descartó aquella planta enferma o contaminada, debido a que la composición química de la planta puede estar afectada por la presencia de metabolitos generados por organismos endofíticos o productos de plantas inducidos como resultado de la interacción con esos organismos.
- Se especificó el momento de recolección debido a que las concentraciones de los componentes en una planta pueden variar durante el ciclo de crecimiento (planta joven, adulta o los años) e incluso durante el transcurso de un día.

Estos aspectos junto con los pasos establecidos permitieron estandarizar las condiciones, eliminar impurezas y evitar que el material vegetal sufra alteraciones en su composición, asegurando una materia prima de calidad.

7.2. Proceso de extracción y rendimiento

En la actualidad, existen numerosas técnicas de extracción y la elección depende de si se conoce o no la naturaleza química del principio activo. Cuando se conoce, el método de extracción debe dirigirse a la obtención de este compuesto con el mayor rendimiento y pureza posible. Sin embargo, cuando se desconoce su naturaleza química, la información brindada por los indígenas de cómo es preparada la medicina herbal puede dar un indicio del mejor método de extracción del principio activo. En el NEA, los indígenas utilizan principalmente agua para preparar la medicina herbal (160). Por otro lado, la mayoría de los productos que se comercializan en los mercados regionales son plantas secas (**Figura 13**) (161). Es por este motivo que se decidió utilizar las hojas secas de tapekué para la obtención del extracto acuoso.



Figura 13. Comercio de plantas medicinales en el mercado regional “El Piso”, Corrientes, Corrientes, Argentina. Fotografías de propia autoría.

Los extractos de plantas se obtienen generalmente mediante un proceso de maceración en el cual las plantas se ponen en contacto con el solvente a temperatura ambiente con agitación periódica. Cuanto más largo es el tiempo de contacto entre el disolvente y el material vegetal más se extrae, hasta llegar a un determinado equilibrio químico. Sin embargo, debido a que los microorganismos presentes en el material vegetal pueden desarrollarse y alterar la composición del extracto, al utilizar agua como solvente, se debe recurrir a otras técnicas para obtener un buen rendimiento de extracción en un menor tiempo. Del mismo modo, la agitación de la mezcla y la relación solvente-material

vegetal, aumentan la tasa de extracción. Por otro lado, el aumento de la temperatura durante la extracción permite reducir el tiempo necesario para llegar al equilibrio químico (160,162). Estos saberes justifican la metodología empleada para la obtención del extracto acuoso. Una vez obtenido, el mismo fue filtrado con papel de filtro Whatman no. 1, seguido por un filtro Millipore estéril de 0,22 µm de poro para obtener un extracto sin partículas y sin contaminación microbiana, y luego liofilizado para conservarlo en condiciones estériles hasta su uso.

En la **Tabla 7** se compara el rendimiento obtenido en este trabajo con los obtenidos por otros autores. Se observa que el rendimiento obtenido fue inferior a lo obtenido por otros autores.

Tabla 7. Tabla comparativa de los rendimientos obtenidos por distintos autores.

Especie	Parte	Extracto	R (%)	Referencia
<i>A. australe</i>	Hojas	Acuoso	12,0	Mussin
<i>A. australe</i>	Hojas	Acuoso	17,1	(163)
<i>A. australe</i>	Hojas	Acuoso	22,8	(164)
<i>A. australe</i>	Hojas	Acuoso	28,5	(113)

Las diferencias en los rendimientos de extracción entre los diferentes autores se deben a una suma de factores, entre ellas: la metodología de extracción y el material vegetal utilizado, ya que algunos emplean las hojas secas y otros las hojas frescas; el lugar y el momento de recolección; la naturaleza química de los metabolitos presentes en la planta y su afinidad con el solvente (165). Se ha demostrado que las condiciones en las que crecen las plantas producen modificaciones en su composición, lo que traduce en modificaciones en los rendimientos de extracción (166–168).

7.3. Contenido de fenoles y flavonoides totales

Los compuestos fenólicos o polifenoles representan un grupo extenso de compuestos químicos con gran variedad estructural y que, además, pueden estar asociados con carbohidratos, ácidos orgánicos y entre sí. Estos compuestos pueden clasificarse en diferentes grupos en función del número de anillos de fenol que contienen y de los elementos estructurales que unen estos anillos entre sí, siendo los flavonoides uno de los grupos de mayor interés en las investigaciones de las plantas medicinales.

La importancia de los polifenoles radica en que son metabolitos secundarios de las plantas y que generalmente son los compuestos involucrados en la defensa contra la radiación ultravioleta o la agresión de los patógenos. Además, de ser considerados los principales responsables de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las plantas (169).

Como en otros informes, el TAE obtenido en este trabajo ha demostrado la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, los cuales han sido asociados con propiedades antimicrobianas y como responsables de la propiedad reductora del extracto; estos pueden ser aprovechados con fines medicinales y para la síntesis verde de nanopartículas (113,114,163,164,170–173). Los flavonoides no son esenciales para la supervivencia de la planta pero tienen un papel determinante en la provisión de color, protección contra los rayos de alta energía solar y también proporcionan protección contra agentes patógenos (173). Su síntesis es promovida por la luz solar y la mayor concentración se ubica en los tejidos exteriores de las plantas, principalmente en las hojas, donde desempeñan su rol protector (174).

7.4. Síntesis y caracterización de las AgNP

El mecanismo de la síntesis verde de las nanopartículas a partir de plantas no está aclarado completamente; sin embargo, se sabe que las plantas contienen una variedad de compuestos fitoquímicos, los cuales actúan como agentes reductores y de recubrimiento que permiten formar AgNP estables (7).

En este trabajo, a medida que el TAE, ajustado a pH 9,5, era mezclado con la solución de AgNO₃, se evidenció un cambio de color de amarillo pálido a marrón oscuro en pocos minutos, debido a los grupos químicos ionizados presentes en el extracto, lo que permitió la rápida formación de AgNP.

Las imágenes por MET permitieron determinar el tamaño y la forma del núcleo metálico, el cual fue similar a lo informado por otros autores que sintetizaron AgNP a partir de plantas (9). El análisis por DLS permitió determinar el tamaño hidrodinámico, es decir, el tamaño de la nanopartícula en solución, que incluye el núcleo metálico, los fitoquímicos de recubrimiento y la capa de disolvente. Los valores PDI de la solución de nanopartículas fueron inferiores a 0,5 y esto sugiere que era un sistema monodisperso (175). Además, los valores absolutos de potencial zeta superiores a 30 mV indican nanopartículas estables y dicha estabilidad podría estar relacionada con la repulsión electrostática de las nanopartículas presentes en la suspensión coloidal (175,176). Estos resultados y su lectura explican la buena estabilidad de la solución coloidal de las AgNP sintetizadas, que permaneció estable como un coloide durante los 6 meses evaluados sin precipitación ni cambios de color. Del mismo modo, el espectro UV-Visible y el análisis DLS se mantuvieron similares.

El análisis por EDX corroboró la pureza de las AgNP y la presencia de trazas de otros elementos. Los picos correspondientes a aquellos elementos distintos a la Ag podrían haberse originado a partir de biomoléculas o elementos presentes en el TAE que se unieron a la superficie de las nanopartículas durante la síntesis.

El análisis por FTIR nos permitió identificar los grupos funcionales presentes en la superficie de las AgNP. El espectro mostró picos alrededor de 1636, 2100 y 3300 cm^{-1} correspondientes a los grupos funcionales de amida C = O (alrededor de 1640 cm^{-1}), estiramiento C \equiv C (alrededor de 2100 cm^{-1}) y estiramiento de vibración de amina NH / OH (alrededor de 3370 cm^{-1}), que son similares a los grupos funcionales de AgNP sintetizadas usando quercetina (125). Por otro lado, otros autores han demostrado que la quercetina está presente en los extractos de tapekué (114,177,178). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la quercetina es, posiblemente, el principal metabolito de recubrimiento de las AgNP sintetizadas de acuerdo con Jain y col. (125). Además, el valor del potencial zeta negativo obtenido posiblemente se deba a los grupos hidroxilo de quercetina presentes en la superficie de las nanopartículas, los cuales generan una carga negativa alrededor de las AgNP, provocado repulsión electrostática entre ellas y evitando su aglomeración (175,176).

La quercetina (3,3', 4', 5,7-pentahidroxiflavona) es un flavonoide típico, ampliamente distribuido en el reino vegetal y uno de los principales compuestos en algunas plantas, que exhibe propiedades antiinflamatorias, antialérgicas y protectoras contra múltiples enfermedades asociadas al estrés oxidativo. En los últimos años, este flavonoide ha atraído mucha atención principalmente como agente antioxidante (179).

7.5. Actividad antioxidante

Un agente antioxidante se define como cualquier sustancia que, al estar presente en concentración baja en comparación con la del sustrato oxidable, retarda o inhibe su deterioro oxidativo. La mayor parte de los antioxidantes naturales, son compuestos fenólicos derivados de plantas. Esto ha llevado a que, desde los años cincuenta, se realicen múltiples investigaciones enfocadas a extraer compuestos con propiedades antioxidantes a partir de las mismas. La razón por la cual los antioxidantes son

importantes para los humanos radica en el hecho de que el oxígeno es un elemento potencialmente tóxico en concentraciones altas o en la presencia de radiaciones, ya que puede ser transformado por la actividad metabólica en superóxido, peróxido de hidrógeno, oxígeno singlete y radicales hidroxilos, los cuales son más reactivos (180).

La evaluación de la actividad antioxidante de distintas sustancias de origen natural o sintético se puede realizar utilizando diferentes métodos, siendo los ensayos FRAP y DPPH los más empleados. En el ensayo de FRAP, la presencia de sustancias antioxidantes promueve la reducción de hierro oxidado (Fe^{3+}) a hierro reducido (Fe^{2+}) por donación de electrones (126). Mientras que el ensayo de inhibición del radical DPPH consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm (128).

En este trabajo, el TAE exhibió una importante actividad antioxidante. Cuando se lo comparó con la solución de AgNO_3 y de AgNP, se evidenció que AgNO_3 no mostraba actividad antioxidante, mientras que AgNP tenía una actividad antioxidante de casi un 55 % inferior al TAE para ambos ensayos (DPPH y FRAP). Esto llevó a que no se pudiera determinar para las soluciones de AgNO_3 y AgNP la cantidad necesaria para reducir en un 50 % la concentración inicial del radical DPPH (CE_{50}).

Los resultados obtenidos de actividad antioxidante para la solución de AgNP posiblemente se deban a una cantidad limitada de compuestos fenólicos disponibles en la superficie de las nanopartículas para actuar como agentes antioxidantes. Por lo tanto, los metabolitos del TAE desempeñaron un papel importante tanto como agentes reductores de Ag^+ , como agentes de recubrimiento de las AgNP.

No se encontró bibliografía que evalúe la actividad antioxidante del TAE. Por lo que este trabajo representa el primer informe sobre esta importante propiedad del extracto. Como se demostró previamente, el TAE mostró ser rico en compuestos fenólicos. La propiedad

antioxidante de una planta está dada principalmente por la presencia de compuestos fenólicos y en menor medida por otros componentes. Los compuestos fenólicos participan en la estabilización de radicales libres y metales al actuar como donantes de electrones. La efectividad antioxidante de muchos polifenoles es esencialmente el resultado de la facilidad con que el grupo hidroxilo se dona a un radical libre y la capacidad de la estructura aromática para soportar un electrón no apareado (181,182). Esto justifica por qué el TAE mostró mayor actividad antioxidante. Además, hay que tener presente que el efecto antioxidante depende de la composición y concentración de las sustancias antioxidantes presentes en el extracto (183).

7.6. Ensayo de citotoxicidad.

Los ensayos de evaluación de toxicidad *in vitro* frente a líneas celulares humanas representan un criterio muy importante en la validación de la seguridad de nuevas drogas y siempre deben incluirse en paralelo junto a las pruebas de evaluación de actividad biológica *in vitro*. En el proceso de validación de las propiedades antimicrobianas de nuevas sustancias es necesario determinar la concentración a partir de la cual un agente antimicrobiano presenta efectos tóxicos sobre el ser humano. Dicha concentración debe ser superior a la concentración necesaria para producir un efecto antimicrobiano, de lo contrario la sustancia sería perjudicial para el hombre (133,154,184).

En este trabajo, la citotoxicidad de las soluciones de TAE, AgNO₃ y AgNP se evaluó frente a CMSP. Las CMSP son células del sistema inmunitario que consisten en linfocitos (células T, células B, células NK) y monocitos. La citotoxicidad sobre CMSP representa el potencial de reacción inmune e inmunotoxicidad y permite predecir los efectos inmunes durante las evaluaciones preclínicas de seguridad utilizando ensayos *in vitro*. Además, ayuda a comprender las interacciones entre los nanomateriales y las

células del sistema inmunitario (185). De acuerdo a las recomendaciones de la norma ISO 10993-5 (130), las sustancias son consideradas no citotóxicas si el porcentaje de viabilidad celular es superior al 70 % a las concentraciones ensayadas.

En este estudio, el TAE no indujo citotoxicidad sobre las CMSP a las concentraciones evaluadas, después de 24 y 72 horas de incubación. Aún más, indujo una ligera proliferación celular en comparación con las células no tratadas. La no toxicidad del TAE es de suma importancia en el contexto de la producción de AgNP para aplicaciones médicas, especialmente como potencial tratamiento tópico de infecciones de piel.

Con AgNO_3 , se observó que la viabilidad celular fue inferior al 70 % a las concentraciones ensayadas después de 24 y 72 horas de incubación, resultando citotóxicas sobre las CMSP. Por otro lado, con la solución de AgNP se observó una reducción significativa en el % de viabilidad celular dependiente de la dosis y del tiempo. El % de viabilidad de CMSP solo alcanzó valores por debajo del 70 % para concentraciones de AgNP $\geq 16 \mu\text{g} / \text{mL}$ después de 24 horas de incubación; sin embargo, la viabilidad celular fue superior al 70 % después de 72 horas de incubación, lo que indica la no citotoxicidad de esta sustancia a las concentraciones ensayadas (130).

Dado que AgNO_3 mostró ser citotóxico, mientras que AgNP y TAE mostraron ser no citotóxicos, e incluso este último mostró un ligero efecto proliferativo; se deduce que la reducción en el % de viabilidad celular observado con las AgNP sintetizadas está relacionado con el contenido de Ag y que, posiblemente, los metabolitos del TAE presentes en la superficie de las nanopartículas disminuyan el efecto citotóxico de las mismas y modulen la respuesta inmunológica. Por consiguiente, la aplicación de Ag en el humano puede tener efectos tóxicos, pero estos efectos podrían ser menores si se incorpora Ag como nanopartículas recubiertas y no como sales de plata. En otras palabras, una cantidad dada de Ag en forma de Ag^+ es más tóxica que la misma cantidad de Ag en forma de nanopartículas recubiertas con fitocompuestos.

Estos resultados obtenidos fueron consistentes con Orta-García y col. (186) quienes también demostraron que las AgNP no recubiertas inducen efectos citotóxicos significativos sobre las CMSP a concentraciones relativamente bajas ($< 5 \mu\text{g} / \text{mL}$) y en períodos cortos de exposición (3 a 12 horas), sugiriendo que el recubrimiento reduce el área de superficie activa de las AgNP y, como consecuencia, de los sitios de interacción con los componentes celulares. Asimismo, Borase y col. (187) mostraron que las AgNP sintetizadas a partir de hojas de *Jatropha gossypifolia* no eran citotóxicas sobre las CMSP a las concentraciones ensayadas (hasta $50 \mu\text{g} / \text{mL}$). Los hallazgos de estos autores muestran también las ventajas del uso de AgNP recubiertas con fitocompuestos en productos que actualmente contienen AgNO_3 .

Se ha reportado que los metabolitos presentes en las plantas, principalmente los compuestos fenólicos, influyen en la respuesta inmune no-específica principalmente aumentando la fagocitosis y la proliferación de macrófagos y neutrófilos (188); aunque la realidad es que la respuesta inmune es muy compleja, al igual que las mezclas de componentes que se encuentran en los extractos de las plantas, pudiendo influir de diferente manera en la respuesta inmune. Por ejemplo, se han estudiado algunos compuestos fenólicos, del tipo flavonoides, como la quercetina que tiene la capacidad de activar linfocitos y de estimular la secreción de interferón gamma ($\text{INF-}\gamma$); y la rutina (quercetina-3-rutinósido) que estimula significativamente la secreción de $\text{INF-}\gamma$, sin elevar la proliferación de las CMSP (189). Por lo tanto, se debería realizar más estudios para evaluar el efecto de estas nanopartículas recubiertas con fitocompuestos sobre la respuesta inmune, dado que al ser una sustancia compleja puede influir de diversas maneras.

Este trabajo representa el primer informe en el cual se evaluó la citotoxicidad del TAE y de AgNP obtenidas a partir del TAE sobre CMSP. Los resultados señalan que el TAE y las AgNP sintetizadas no tienen efectos tóxicos a las concentraciones ensayadas. La no toxicidad de estas sustancias es de suma importancia en el contexto de garantizar la

seguridad para futuras aplicaciones médicas posibles, especialmente para los tratamientos tópicos. Brandt y col. (190) han demostrado que la plata a nanoescala tiene una absorción percutánea significativamente menor y una menor acumulación en múltiples órganos cuando se aplica sobre la piel. Sin embargo, el método de síntesis difiere al empleado en este trabajo, por consiguiente, para confirmar la seguridad y la eficacia de las AgNP sintetizadas se debe diseñar una fase preclínica y una clínica (154).

La ventaja más importante del uso tópico para el tratamiento de infecciones de la piel es que evita los efectos adversos asociados con las drogas sistémicas y parenterales. Por lo general, los tratamientos con antimicrobianos orales están asociados a efectos adversos gastrointestinales, renales y/o hepáticos. Las formulaciones tópicas permiten lograr concentraciones terapéuticas del compuesto activo en la zona afectada, manteniendo bajos niveles en suero y evitando potencialmente la toxicidad sistémica y las interacciones farmacológicas. Asimismo, su fácil administración permite una mejor adherencia del paciente al tratamiento, especialmente en niños (191,192). Por otro lado, los productos a base de plantas medicinales son muy bien aceptados por el público en general por ser considerados de origen natural. Lo que facilitaría la rápida aceptación de un producto de uso tópico que contenga AgNP de síntesis verde. Además, otros autores han demostrado que la aplicación tópica de AgNP mejora la cicatrización de la piel al disminuir el proceso inflamatorio (190,193,194).

7.7. Evaluación de la actividad inhibitoria

Existen una gran diversidad de ensayos *in vitro* disponibles para evaluar actividad antifúngica; sin embargo, los métodos de referencia estandarizados más reconocidos son los desarrollados por el CLSI y el EUCAST (132,195–197). En este trabajo, se decidió trabajar con los documentos del CLSI, ya que la lectura espectrofotométrica podría verse afectada por la naturaleza química de alguno de los compuestos (198). Y

el seguimiento de los pasos establecidos en el documento CLSI M27 (132), permite que las pruebas sean reproducibles (inter e intra-laboratorio) y comparables con otros agentes antimicrobianos.

La actividad antimicrobiana del TAE, AgNP y AgNO₃ se probó contra un total de 75 cepas de *Malassezia* spp. utilizando tres puntos finales de lectura (CIM-0, CIM-1 y CIM-2) junto con la determinación de la CFM, ya que aún no existe un consenso sobre cuál es el mejor predictor del comportamiento *in vivo* de estas sustancias. Además, la lectura en los 3 puntos y de la CFM nos permitió realizar una comparación entre ellos. Por otro lado, se ha demostrado que la aplicación de un punto final menos riguroso, como CIM-2 y CIM-1, representa mejor la actividad *in vitro* de algunos compuestos, y en ocasiones, proporciona una mejor correlación con el comportamiento *in vivo* y con otras mediciones de actividad antimicrobiana como la CFM (199–203). Sin embargo, hay que tener presente que no existe un método de referencia estandarizado para determinar CFM, por lo que fue necesario adaptar las metodologías desarrolladas por otros autores (143–145) en base al método estandarizado para bacterias, y adecuarlo para levaduras lipodependientes.

Aunque tapekué es empleado en la medicina tradicional del NEA para tratar las manchas blancas de la piel, en referencia a la pitiriasis versicolor, en este trabajo el TAE mostró ser inactivo contra los aislamientos de *Malassezia* spp. ensayados. Sin embargo, no podemos afirmar que la planta carece de la propiedad tradicional conocida, ya que existe la posibilidad de que el compuesto activo sea poco soluble en el solvente de extracción empleado, es decir en el agua. Esta postura se confirma con los resultados obtenidos por Portillo y col. (164), quienes mostraron que los extractos de tapekué obtenidos con solventes orgánicos tenían una mayor actividad antimicrobiana en comparación con el extracto acuoso.

Por otro lado, la solución de AgNO_3 mostró ser activa frente a *Malassezia* spp. pero con valores superiores de CIM y CFM en comparación a las AgNP sintetizadas. Por lo tanto, la solución de AgNP mostró tener una mayor actividad inhibitoria *in vitro* que los componentes utilizados para su síntesis. Otros autores han demostrado que el AgNO_3 (5) y los extractos de plantas medicinales presentan propiedades antimicrobianas (204). Y en este trabajo se demuestra que cuando se combinan ambos para obtener nanopartículas metálicas, específicamente AgNP, se logra obtener propiedades antifúngicas mejoradas que los componentes individuales.

Además, se observó variación en los valores de CIM y CFM entre aislamientos de la misma especie (variación intraespecie) y entre especies del mismo género (variación interespecies). Esto resalta la importancia de utilizar varios aislamientos de una misma especie cuando se desea evaluar actividad antimicrobiana. Para el caso de *M. restricta*, solo pudimos trabajar con un aislamiento, ya que, a pesar de ser la segunda especie más frecuente en pieles sanas y enfermas, es una de las especies más difíciles de cultivar y conservar, incluso en las condiciones más favorables (52,65). Además, en lo que a nuestra experiencia concierne, *M. restricta* presenta un crecimiento más lento en los medios de cultivo en comparación a las otras especies ensayadas, por lo que su crecimiento tiende a ser inhibido o tapado por otras levaduras de más rápido crecimiento cuando se la quiere aislar de la piel.

De acuerdo a valores de CIM y CFM, *M. globosa* fue la especie más fuertemente inhibida por las nanopartículas sintetizadas. Dicha especie es considerada el principal agente causante de la pitiriasis versicolor y la dermatitis seborreica (72,73), evidenciando el potencial uso de las AgNP sintetizadas como agente antifúngico tópico. Además, los valores obtenidos con la droga control (ITZ) fueron similares a los obtenidos por Rojas y col. (1,2), lo que permitió confirmar que se estaba trabajando bajo condiciones estandarizadas. Al comparar el valor de moda de la CIM-2 para las AgNP con los valores de moda de las CIM obtenidas por Rojas y col. (2) con los antifúngicos de uso

convencional (**Tabla 6**), se observó que AgNP presenta una actividad inhibitoria superior al fluconazol y a la anfotericina B pero inferior al ITZ, voriconazol y ketoconazol frente a *Malassezia* spp.

Por otro lado, los valores obtenidos de la relación CFM:CIM-0 de AgNO₃ y AgNP frente a los levaduras ensayadas fueron consistentes con una acción fungicida. Además, la mayoría de los valores de MIC-2 y MIC-0 para un mismo aislamiento variaron en alrededor de 2 diluciones, y en ningún caso se observó efecto de arrastre, conocido como *trailing effect*. Este efecto se encuentra en fármacos con acción fungistática, y no suele observarse en fármacos con acción fungicida. Por lo tanto, AgNO₃ y AgNP mostraron tener acción fungicida frente a las especies de *Malassezia* ensayadas. Sin embargo, esta simple relación no es suficiente para confirmar la presencia de este efecto, se debería realizar otros estudios, como los ensayos de tiempo muerte, para confirmar la acción fungicida.

De acuerdo a esta estimación, podría considerarse que es más adecuado emplear la CIM-0 como punto final de lectura debido a que la misma es utilizada para la mayoría de las drogas con acción fungicida (196,201). Sin embargo, es importante recordar que la elección de los puntos finales de lectura de las drogas clínicas están basados en la distribución de sus CIM, parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, modelos animales, tratamiento y evaluación clínica (205). Un ejemplo, es el caso de las equinocandinas frente a *Aspergillus* spp. en el cual se utiliza la concentración efectiva mínima (CEM), en lugar de CIM-2, como punto final de lectura a pesar de ser una droga con acción fungistática frente a este género (206).

En resumen, el TAE mostró ser inactivo, mientras que la solución de AgNO₃ y AgNP mostraron ser fungicidas frente a *Malassezia* spp. Sin embargo, la mayor relevancia se encuentra en las AgNP, las cuales no fueron citotóxicas a las concentraciones necesarias para inhibir el crecimiento fúngico, a diferencia del AgNO₃ que mostro ser

citotóxico. Además, en este trabajo se evidencia que la actividad antifúngica de las AgNP se debe a la Ag y no al extracto de la planta. El TAE desempeñaría un papel más importante en la formación de AgNP estables y, posiblemente, como modulador de la respuesta inmune y citotóxica (**Figura 14**).

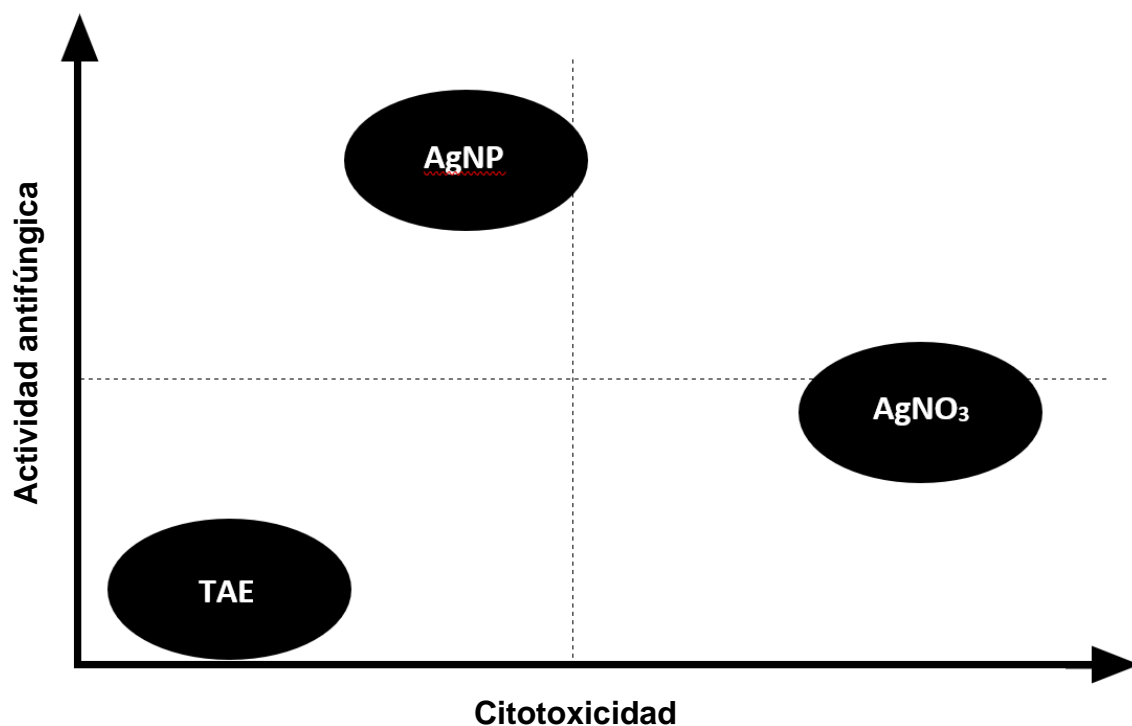


Figura 14. Representación gráfica de la relación encontrada entre la actividad antifúngica y la citotoxicidad del TAE, AgNO₃ y AgNP. Solo la solución de AgNP mostró una fuerte actividad antifúngica con una citotoxicidad moderada en comparación con TAE y AgNO₃.

La razón de la excelente actividad antimicrobiana de las AgNP aún queda por ser esclarecida. Es común suponer que la actividad antimicrobiana de las AgNP es similar a la de los Ag⁺. Sin embargo, se cree que las AgNP se adhieren y se anclan a la superficie de las levaduras y producen un aumento de especies reactivas de oxígeno. Esta interacción causa cambios y daños estructurales, perturbando notablemente las funciones vitales de las células, como la permeabilidad y el potencial de membrana, lo que lleva a la muerte celular (207–209). Además, se ha demostrado que la acumulación

de AgNP extracelular sugiere una liberación lenta de Ag^+ por las AgNP adyacentes que penetra activamente en la célula y conduce a la biosíntesis intracelular de AgNP. La interacción de las AgNP en el interior de las células con compuestos que contienen fósforo o azufre como el ADN, ARN y grupos tiol de proteínas puede causar más daño por inhibición de la replicación celular e inactivación de proteínas, dando mayor relevancia como agente antimicrobiano a las AgNP en relación al AgNO_3 (208,210,211). Dado que el modo de acción de las AgNP es posiblemente el resultado de múltiples procesos simultáneos, la mayoría de los mecanismos de resistencia que producen los microorganismos con los fármacos antimicrobianos clásicos, podrían ser ineficaces ante las AgNP. Esto ha llevado a que las nuevas estrategias contra los microorganismos resistentes a múltiples fármacos se basen cada vez más en la búsqueda de efectos sinérgicos entre los fármacos antimicrobianos de uso clínico con nanopartículas metálicas (202,212).

8. CONCLUSIÓN

- Se logró obtener el TAE, el cual presentó compuestos fenólicos, entre ellos, flavonoides.
- Se logró sintetizar AgNP a partir del TAE, las cuales mostraron ser esféricas y estables, con un diámetro de $14,01 \pm 2,1$ nm.
- El TAE exhibió una importante actividad antioxidante en comparación a la solución de AgNO_3 y de AgNP. Por otro lado, las AgNP sintetizadas presentaron una cantidad limitada de compuestos fenólicos en su superficie siendo la quercetina, posiblemente, el principal metabolito de recubrimiento. Por lo tanto, estos compuestos presentes en el TAE, desempeñaron un papel importante tanto como agentes reductores de Ag^+ y como agentes de recubrimiento de las AgNP.
- El TAE y las AgNP sintetizadas no fueron citotóxicas sobre las CMSP a las concentraciones ensayadas, mientras que el AgNO_3 resultó ser citotóxico. Por lo tanto, una cantidad dada de Ag en forma de Ag^+ es mucho más tóxica que la misma cantidad de Ag en forma de nanopartículas recubiertas con fitocompuestos.
- De acuerdo con el criterio de actividad antifúngica empleado, el TAE mostró ser inactivo, mientras que las soluciones de AgNO_3 y AgNP demostraron ser activas frente a *Malassezia* spp.
- La solución de AgNP mostró tener una mayor actividad inhibitoria *in vitro* frente a *Malassezia* spp. que los componentes utilizados para su síntesis.
- *M. globosa*, la especie más frecuentemente asociada a pitiriasis versicolor, fue la especie más fuertemente inhibida por las nanopartículas sintetizadas.
- Las soluciones de AgNO_3 y AgNP presentan efecto fungicida frente a las especies de *Malassezia* ensayadas.

- Los resultados obtenidos en este trabajo representan el primer informe en cual se evaluó la actividad de las AgNP y de los componentes utilizados para su síntesis frente a *Malassezia* spp.
- Los resultados obtenidos proporcionan evidencia científica que avala el uso de las AgNP sintetizadas para el tratamiento de las afecciones cutáneas causadas por *Malassezia* spp., además de justificar el uso tradicional de los bhasmas.

Existe una gran posibilidad de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos al combinar el conocimiento de la medicina tradicional con la nanotecnología. En este trabajo, la síntesis de AgNP empleando el extracto acuoso de una planta medicinal del NEA nos permitió redescubrir una tecnología, antiguamente conocida como bhasma y que, además, abre una nueva perspectiva frente a la problemática del aumento de la resistencia a los antimicrobianos. La importante actividad inhibitoria de las AgNP frente a *Malassezia* spp. y su baja toxicidad sobre las CMSP demostrados en este trabajo, sugieren que las AgNP sintetizadas pueden ser adecuadas tanto para la prevención como para el tratamiento de las afecciones causadas por *Malassezia* spp. Asimismo, las AgNP sintetizadas demostraron ser seguras a concentraciones suficientes para inhibir el crecimiento fúngico y tener una mejor actividad antifúngica en comparación a los componentes utilizados para su síntesis. Aún más, el método de síntesis demostró ser simple, ecológico, económico y valioso para la producción a gran escala de AgNP.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Rojas FD, Córdoba SB, Ángeles MDL, Laura S, Fernández MS, Cattana ME, et al. Antifungal susceptibility testing of *Malassezia* yeast: comparison of two different methodologies. *Mycoses*. 2016;1–8.
2. Rojas FD, Sosa MDLA, Fernández MS, Cattana ME, Córdoba SB, Giusiano G. Antifungal susceptibility of *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, and *Malassezia globosa* to azole drugs and amphotericin B evaluated using a broth microdilution method. *Med Mycol*. 2014;52:641–6.
3. Carrillo-Muñoz AJ, Rojas F, Tur-Tur C, Sosa M de los Á, Diez GO, Espada CM, et al. In vitro antifungal activity of topical and systemic antifungal drugs against *Malassezia* species. *Mycoses*. 2013;56:571–5.
4. 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*. 2016;7:17–28.
5. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*. 2009;27:76–83.
6. Song JY, Kim BS. Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2009;32(1):79–84.
7. Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv Colloid Interface Sci*. 2009;145:83–96.
8. Panáček A, Kolár M, Vecerová R, Pucek R, Soukupová J, Krystof V, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. *Biomaterials*. 2009;30:6333–40.
9. Rajan R, Chandran K, Harper SL, Yun S-I, Kalaichelvan PT. Plant extract

- synthesized silver nanoparticles: An ongoing source of novel biocompatible materials. *Ind Crop Prod.* 2015;70:356–73.
10. Rajakannu S, Shankar S, Perumal S, Subramanian S, Dhakshinamoorthy GP. Biosynthesis of Silver Nanoparticles using *Garcinia mangostana* Fruit Extract and their Antibacterial, Antioxidant Activity. *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2015;4(1):944–52.
 11. Kalishwaralal K, Barathmanikant S, Kumar Pandian SR, Deepak V, Gurunathan S. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2010;79:340–4.
 12. Monteiro DR, Gorup LF, Silva S, Negri M, De Camargo ER, Oliveira R, et al. Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling J Bioadhesion Biofilm Res.* 2011;27(7):711–9.
 13. Radzig MA, Nadtochenko VA, Koksharova OA, Kiwi J, Lipasova VA, Khmel IA. Antibacterial effects of silver nanoparticles on gram-negative bacteria: Influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2013;102:300–6.
 14. Wang P, Lombi E, Zhao F-J, Kopittke PM. Nanotechnology : A New Opportunity in Plant Sciences. *Trends Plant Sci.* 2016;21(8):699–712.
 15. Giusiano G, Rodolfi M, Mangiaterra M, Piontelli E, Picco AM. Hongos endófitos en 2 plantas medicinales del nordeste argentino. I: Análisis morfotaxonomico de sus comunidades foliares. *Boletín Micológico.* 2010;25:15–27.
 16. Rivolta S. Dei parassiti vegetali. Giulio Speirani e figli. 1873. 469–471 p.
 17. Eichstedt E. Pilzbildung in der Pityriasis versicolor. *Froriep Neue Notiz Natur*

- Heilk. 1846;39:270.
18. Rincón S, Cepero De García MC, Espinel-Ingroff A. A modified Christensen's urea and CLSI broth microdilution method for testing susceptibilities of six *Malassezia* species to voriconazole, itraconazole, and ketoconazole. *J Clin Microbiol.* 2006;44(9):3429–31.
 19. Boekhout T, Guého-Kellermann E, Mayser P, Velegraki A. *Malassezia* and the skin. 2010. 319 p.
 20. Guého E, Boekhout H, Ashbee HR, Guillot J, Van Belkum A, Faergemann J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Med Mycol.* 1998;36(1):220–9.
 21. Midgley G. The diversity of *Pityrosporum* (*Malassezia*) yeasts in vivo and in vitro. *Mycopathologia.* 1989;106(3):143–53.
 22. Guého-Kellermann E, Batra R, Boekhout T. *Malassezia* Baillon (1889). Vol. 3, The Yeasts, a taxonomic study. Elsevier B.V.; 2011. 1807–1832 p.
 23. Kreger-van Rij NJW, Veenhuis M. An electron microscope study of the yeast *Pityrosporum ovale*. *Arch Mikrobiol.* 1970;71(2):123–31.
 24. Breierová E, Kocková-Kratochvílová A, Šajbidor J, Ladziánská K. *Malassezia pachydermatis*: properties and storage. *Mycoses.* 2009;34(7–8):349–52.
 25. Cafarchia C, Latrofa MS, Figueredo LA, Da Silva Machado ML, Ferreira L, Guillot J, et al. Physiological and molecular characterization of atypical lipid-dependent *Malassezia* yeasts from a dog with skin lesions: adaptation to a new host? *Med Mycol.* 2011;49(4):365–74.
 26. Lorch JM, Palmer JM, Vanderwolf KJ, Schmidt KZ, Verant ML, Weller TJ, et al. *Malassezia vespertilionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated

- from bats. *Persoonia*. 2018;41:56–70.
27. Ashbee HR. Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol*. 2007;45(4):287–303.
 28. Saadatzadeh MR, Ashbee HR, Holland KT, Ingham E. Production of the mycelial phase of *Malassezia* in vitro. *Med Mycol*. 2001;39(6):487–93.
 29. Cannon PF. International Commission on the Taxonomy of Fungi (ICTF): name changes in fungi of microbiological, industrial and medical importance. Part 2. *Microbiol Sci*. 1986 Sep;3(9):285–7.
 30. Gaitanis G, Magiatis P, Hantschke M, Bassukas ID, Velegraki A. The *Malassezia* genus in skin and systemic diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(1):106–41.
 31. Guillot J, Gueho E, Midgley G, Chevrier G, Dupont B. Identification of *Malassezia* Species . A practical approach. *J Mycol Med*. 1996;6:103–10.
 32. Bond R, Anthony RM. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dogs. *J Appl Bacteriol*. 1995;78(5):537–42.
 33. Giusiano G, Sosa MDLA, Rojas F, Vanacore ST, Mangiaterra M. Prevalence of *Malassezia* species in pityriasis versicolor lesions in northeast Argentina. *Rev Iberoam Micol*. 2010;27(2):71–4.
 34. Giusiano G. *Malassezia*. Current knowledge and study perspectives. *Rev Argent Microbiol*. 2006;38(1):41–8.
 35. Kolecka A, Khayhan K, Arabatzis M, Velegraki A, Kostrzewa M, Andersson A, et al. Efficient identification of *Malassezia* yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Br J Dermatol*. 2014 Feb 1;170(2):332–41.
 36. Cabañes FJ, Theelen B, Castellá G, Boekhout T. Two new lipid-dependent *Malassezia* species from domestic animals. *FEMS Yeast Res*. 2007 Sep

- 1;7(6):1064–76.
37. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M, Cannon PF, Eriksson OE, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*. 2007 May;111(5):509–47.
 38. Wang Q, Theelen B, Groenewald M, Bai F, Boekhout T. Moniliellomycetes and Malasseziomycetes, two new classes in Ustilaginomycotina. *Persoonia*. 2014;33:41–7.
 39. Cabañes FJ. Malassezia Yeasts: How Many Species Infect Humans and Animals? *PLoS Pathog*. 2014;10(2):1–4.
 40. Crespo Erchiga V, Delgado Florencio V, Erchiga VC, Florencio VD. Malassezia species in skin diseases. *Curr Opin Infect Dis*. 2002;15(2):133–42.
 41. Rojas FD. Evaluación in vitro de la sensibilidad de Malassezia spp. frente a antifúngicos de uso clínico. Universidad de Buenos Aires; 2015.
 42. Rhimi W, Theelen B, Boekhout T, Otranto D, Cafarchia C. Malassezia spp. Yeasts of Emerging Concern in Fungemia. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(370).
 43. Guillot J, Bond R. Malassezia Yeasts in Veterinary Dermatology: An Updated Overview. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(79).
 44. Nagata R, Nagano H, Ogishima D, Nakamura Y, Hiruma M, Sugita T. Transmission of the major skin microbiota, Malassezia, from mother to neonate. *Pediatr Int*. 2012;54:350–5.
 45. Prohic A, Jovovic Sadikovic T, Krupalija-Fazlic M, Kuskunovic-Vlahovljak S. Malassezia species in healthy skin and in dermatological conditions. *Int J Dermatol*. 2016;55(5):494–504.

46. Theelen B, Cafarchia C, Gaitanis G, Bassukas ID, Boekhout T, Dawson TL. Malassezia ecology, pathophysiology, and treatment. *Med Mycol.* 2018;56:S10–25.
47. ROBERTS SOB. Pityrosporum orbiculare: incidence and distribution on clinically normal skin. *Br J Dermatol.* 1969 Apr 1;81(4):264–9.
48. McGinley KJ, Leyden JJ, Marples RR, Path MRC, Kligman A. Quantitative microbiology of the scalp in non-dandruff, dandruff, and seborrheic dermatitis. *J Invest Dermatol.* 1975;64:401–5.
49. Faergemann J, Aly R, Maibach HI. Quantitative variations in distribution of Pityrosporum orbiculare on clinically normal skin. *Acta Derm Venereol.* 1983;63(4):346–8.
50. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature.* 2013;498:367–70.
51. Oh J, Byrd AL, Deming C, Conlan S, NISC CSP, Kong HH, et al. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Vol. 514.* 2014. 59–64 p.
52. Angiolella L, Rojas F, Mussin J, Greco R, Sosa M de los A, Zalazar L, et al. Biofilm formation, adherence, and hydrophobicity of *M. sympodialis*, *M. globosa*, and *M. slooffiae* from clinical isolates and normal skin. Virulence factors of *M. sympodialis*, *M. globosa* and *M. slooffiae*. *Med Mycol.* 2020;
53. Ramasamy S, Barnard E, Dawson TL, Li H. The role of the skin microbiota in acne pathophysiology. *Br J Dermatol.* 2019;181(4):691–9.
54. Chen T-A, Hill PB. The biology of Malassezia organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet Dermatol.* 2005 Feb 1;16(1):4–

- 26.
55. Gaitanis G, Velegraki A, Mayser P, Bassukas ID. Skin diseases associated with *Malassezia* yeasts: Facts and controversies. *Clin Dermatol*. 2013 Jul 1;31(4):455–63.
56. Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. 2011. 2354 p.
57. Gemmer CM, Deangelis YM, Theelen B, Boekhout T, Dawson TL. Fast , Noninvasive Method for Molecular Detection and Differentiation of *Malassezia* Yeast Species on Human Skin and Application of the Method to Dandruff Microbiology. *J Clin Microbiol*. 2002;40(9):3350–7.
58. Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL. Skin diseases associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol*. 2004 Nov 1;51(5):785–98.
59. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1996;69:337–55.
60. Crespo-Erchiga V, Florencio VD. *Malassezia* yeasts and pityriasis versicolor. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19:139–47.
61. Aspiroz C, Moreno L-A, Rezusta A, Rubio C. Differentiation of three biotypes of *Malassezia* species on human normal skin . Correspondence with *M . globosa* , *M . sympodialis* and *M . restricta*. *Mycopathologia*. 1999;145:69–74.
62. Nakabayashi A, Sei Y, Guillot J. Identification of *Malassezia* species isolated from patients with seborrhoeic dermatitis, atopic dermatitis, pityriasis versicolor and normal subjects. *Med Mycol*. 2000;38:337–41.
63. Gaitanis G, Velegraki A, Alexopoulos EC, Chasapi V, Tsigonia A, Katsambas A. Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrhoeic

- dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. *Br J Dermatol*. 2006;154:854–9.
64. Gupta AK, Kohli Y, Summerbell RC, Faergemann J. Quantitative culture of *Malassezia* species from different body sites of individuals with or without dermatoses. *Med Mycol*. 2001;39:243–51.
65. Batra R, Caban FJ, Boekhout T, Gue E, Dawson TLJ, Gupta AK. *Malassezia* Baillon , emerging clinical yeasts. *FEMS Yeast Res*. 2005;5:1101–13.
66. Sugita T, Tajima M, Tsubuku H, Tsuboi R, Nishikawa A. Quantitative Analysis of Cutaneous *Malassezia* in Atopic Dermatitis Patients Using Real-Time PCR. *Microbiol Immunol*. 2006;50(7):549–52.
67. Wu G, Zhao H, Li C, Rajapakse MP, Scheynius A, Sun S, et al. Genus-Wide Comparative Genomics of *Malassezia* Delineates Its Phylogeny , Physiology , and Niche Adaptation on Human Skin. *PLOS Genet*. 2015;11(11):1–26.
68. Hay RJ. *Malassezia*, dandruff and seborrhoeic dermatitis: an overview. *Br J Dermatol*. 2011 Oct;165:2–8.
69. Mastrolonardo M, Diaferio A, Logroscino G. Seborrheic dermatitis, increased sebum excretion, and Parkinson's disease: a survey of (im)possible links. *Med Hypotheses*. 2003 Jun 1;60(6):907–11.
70. Aspres N, Anderson C. *Malassezia* yeasts in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Australas J Dermatol*. 2004 Nov;45(4):199–207.
71. Chowdhary A, Randhawa HS, Sharma S, Brandt ME, Kumar S. *Malassezia furfur* in a case of onychomycosis: colonizer or etiologic agent?
72. Crosier WJ, Wise KA. Onychomycosis due to *Pityrosporum*. *Australas J Dermatol*. 1993 Dec;34(3):109–12.

73. Escobar ML, Carmona-Fonseca J, Santamaría L. Onychomycosis due to *Malassezia*. *Rev Iberoam Micol.* 1999 Dec;16(4):225–9.
74. Moffarah AS, Mohajer M Al, Hurwitz BL, Armstrong DG. Skin and soft tissue infections. *Microbiol Spectr.* 2016;4(4).
75. Clebak KT, Malone MA. Skin Infections. *Prim Care - Clin Off Pract.* 2018;45(3):433–54.
76. Negre A, Bensignor E, Guillot J. Evidence-based veterinary dermatology: A systematic review of interventions for *Malassezia dermatitis* in dogs. *Vet Dermatol.* 2009;20(1):1–12.
77. Hald M, Arendrup MC, Svejgaard EL, Lindskov R, Foged EK, Saunte DML. Evidence-based Danish Guidelines for the Treatment of *Malassezia*-related Skin Diseases. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(1):12–9.
78. Choudhury S, Marte RL. *Malassezia pachydermatis* fungaemia in an adult on posaconazole prophylaxis for acute myeloid leukaemia. *Pathology.* 2014;46(5):466–7.
79. Gupta AK, Foley KA. Antifungal treatment for pityriasis versicolor. *J Fungi.* 2015;13–29.
80. Iatta R, Figueredo LA, Montagna MT, Otranto D, Cafarchia C. In vitro antifungal susceptibility of *Malassezia furfur* from bloodstream infections. *J Med Microbiol.* 2014;63:1467–73.
81. Rao CNR, Müller A, Cheetham AK. The chemistry of nanomaterials: synthesis, properties and applications. Wiley-VCH; 2004. 761 p.
82. Liz-Marzán LM, Kamat P V. Nanoscale Materials. In: *Nanoscale Materials.* Boston: Kluwer Academic Publishers; 2003. p. 500.

83. Aljuffali I, Huang C-H, Fang J-Y. Nanomedical Strategies for Targeting Skin Microbiomes. *Curr Drug Metab.* 2015;16(4):255–71.
84. Bansod SD, Bawaskar MS, Gade AK, Rai MK. Development of shampoo, soap and ointment formulated by green synthesised silver nanoparticles functionalised with antimicrobial plants oils in veterinary dermatology: treatment and prevention strategies. *IET Nanobiotechnology.* 2015;9(4):165–71.
85. Feldheim DL, Foss CA. *Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications.* Marcel Dek. American Chemical Society; 2002. 338 p.
86. Bera RK, Mandal SM, Raj CR. Antimicrobial activity of fluorescent Ag nanoparticles. *Lett Appl Microbiol.* 2014;58(6):520–6.
87. ATSDR. Toxicological profile for silver. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Public Health Service. 1990.
88. Lansdown ABG. A Pharmacological and Toxicological Profile of Silver as an Antimicrobial Agent in Medical Devices. *Adv Pharmacol Sci.* 2010;1–16.
89. Rahoriya P. *Green Synthesis of Silver Nanoparticles, Their Characterization and Antimicrobial Potential.* 2017.
90. Durán N, Marcato PD, Durán M, Yadav A, Gade A, Rai M. Mechanistic aspects in the biogenic synthesis of extracellular metal nanoparticles by peptides, bacteria, fungi, and plants. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90(5):1609–24.
91. Ge L, Li Q, Wang M, Ouyang J, Li X, Xing MMQ. Nanosilver particles in medical applications: Synthesis, performance, and toxicity. *Int J Nanomedicine.* 2014;9(1):2399–407.
92. Mittal AK, Chisti Y, Banerjee UC. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol Adv.* 2013;31(2):346–56.

93. Fabricant Daniel S, Farnsworth Norman R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect.* 2001;109(1):69–75.
94. WHO, IUCN, WWF. *Guidelines on the Conservation of Medicinal Plants.* 1993. 38 p.
95. WHO. *WHO Traditional Medicine Strategy: 2014-2023.* 2013.
96. Presidencia de la Nación. Región del Noreste. Ministerio del Interior, Obras Públicas y Vivienda. Available from:
http://www.mininterior.gov.ar/municipios/gestion/regiones_archivos/NEA.pdf
97. Pérez ME. La Variabilidad de las Precipitaciones en el Nordeste Argentino durante el período 1951/1990. *Comun Científicas y Tecnológicas UNNE.* 2004;(H-007):1–4.
98. Burgos JJ. El clima de la Región Nordeste de la República Argentina en relación con la vegetación natural y el suelo. *Boletín la Soc Argentina Botánica.* 1970;XI:37–101.
99. Barboza GE, Cantero JJ, Núñez C, Pacciaroni A, Ariza Espinar L. Medicinal plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana.* 2009;34(1–2):7–365.
100. Martinez-Crovetto R. Introducción a la etnobotánica aborígen del nordeste argentino. *Etnobiologica.* 1968;11:1–10.
101. Papa JC, Tuesca D, Nisensohn L. Control tardío de rama negra (*Conyza bonariensis*) sobre individuos sobrevivientes a un tratamiento previo con glifosato. *Rev Soja para Mejor la Prod.* 2010;45:81–4.
102. Zuloaga FO, Morrone O. *Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina II.* Missouri Botanical Garden Press. Missouri Botanical Garden Press;

1999. 1331 p.
103. Freire SE, Urtubey E, Sancho G, Bayón ND, Katinas L, Gutiérrez DG, et al. Inventario de la biodiversidad vegetal de la provincia de Misiones: Asteraceae. *Darwiniana*. 2006;44(2):375–452.
 104. Espinar LA, Novara LJ. Flora del valle de Lerma: Asteraceae Dumort. Tr. III. Astereae. *Aportes Botánicos Salta - Ser Flora Herb MCNS, Fac Ciencias Nat Univ Nac Salta*. 2005;7(12):1–118.
 105. Thabit RAS, Cheng X-R, Al-Hajj N, Rahman RT, Le G-W. Antioxidant and *Conyza bonariensis*: A Review. *Eur Acad Res*. 2014;2(6):8454–74.
 106. Cabrera A, Crisci J, Delucchi G, Freire S, Giuliano D, Iharlegui L, et al. *Catálogo Ilustrado De Las Compuestas (=Asteraceae) de la Provincia De Buenos Aires, Argentina: Sistemática, Ecología y Usos*. 1st ed. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata; 2000. 138 p.
 107. Katinas L, Gutierrez DG, Grossi M a., Crisci J. Panorama de la familia Asteraceae (= Compositae) en la Introducción Breve historia taxonómica de la familia. *Boletín la Soc Argentina Botánica*. 2007;42(1–2):113–30.
 108. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). Asteraceae. Available from: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=35420#null
 109. Correa Favila MA. Estudio químico e biológico de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (Asteraceae). 2006.
 110. Freire-Fierro A. *Botánica sistemática Ecuatoriana*. Missouri Botanical Garden; 2004. 209 p.
 111. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). *Acanthospermum*. Available

from:

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&anchorLocation=SubordinateTaxa&credibilitySort=Subordinate

[Taxa&rankName=Species&search_value=36444&print_version=SCR&source=from_print#SubordinateTaxa](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=36444&print_version=SCR&source=from_print#SubordinateTaxa)

112. Vivot E, Massa R, Cruañes MJ, Muñoz JDD, Ferraro G, Gutkind G, et al. Actividad Antimicrobiana In Vitro de Seis Especies Autóctonas de la Flora de Entre Ríos (Argentina). *Lat Am J Pharm.* 2007;26(4):563–6.
113. Mallmann R, Ethur EM, Bianchetti P, Faleiro D, Hoehne L, Goettert MI. Effectiveness of aqueous and hydroalcoholic extracts of *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze against diarrhea-inducing bacteria. *Brazilian J Biol.* 2018;78(4):619–24.
114. Rocha Martins LR, Brenzan MA, Nakamura CV, Dias Filho BP, Nakamura TU, Ranieri Cortez LE, et al. In vitro antiviral activity from *Acanthospermum - australe* on herpesvirus and poliovirus. *Pharm Biol.* 2011;49(1):26–31.
115. Ferández Pérez E. Plantas medicinales presentes en el vivero del centro ambiental de Itaipú binacional (Paraguay): Revisión crítica, catalogación y creación de una base de datos. 2014.
116. Integrated Taxonomic Information System (ITIS). *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze. Available from:
https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=36445#null
117. Umberto Quattrocchi FLS. CRC World Dictionary of MEDICINAL AND POISONOUS PLANTS: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology. Vol. 53, *Journal of Chemical Information and*

Modeling. 2012. 3960 p.

118. WHO WHO. WHO Guidelines on Good Agricultural and Collection Practices (GACP) for Medicinal Plants. 2003. 80 p.
119. Pérez de Nucci AM. La medicina tradicional del noroeste argentino: historia y presente. Ediciones Del Sol; 1988. 156 p.
120. Muñoz López de Bustamente F. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Mundi-Prensa Libros; 1996. 365 p.
121. Waterhouse AL. Determination of Total Phenolics. In: Current Protocol in Food Analytical Chemistry. 2002. p. I1.1.1-I1.1.8.
122. Dewanto V, Wu X, Adom KK, Lui RH. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J Agric Food Chem.* 2002;50(10):3010–4.
123. Gavade NL, Kadam AN, Suwarnkar MB, Ghodake VP, Garadkar KM. Biogenic synthesis of multi-applicative silver nanoparticles by using *Ziziphus Jujuba* leaf extract. *Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc.* 2015;136(PB):953–60.
124. Singh M, Kumar M, Kalaivani R, Manikandan S, Kumaraguru AK. Metallic silver nanoparticle: A therapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2013;36(4):407–15.
125. Jain S, Mehata MS. Medicinal Plant Leaf Extract and Pure Flavonoid Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles and their Enhanced Antibacterial Property. *Sci Rep.* 2017;7:1–13.
126. Quiroz-Reyes CN, Aguilar-Méndez MA, Ramírez-Ortíz ME, Ronquillo-De Jesús E. Comparative study of ultrasound and maceration techniques for the extraction of polyphenols from cocoa beans (*Theobroma cacao* L.). *Rev Mex Ing Química.*

- 2013;12(1):11–8.
127. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Leb und-Technologie*. 1995;28:25–30.
 128. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *J Sci Technol*. 2004;26(2):211–9.
 129. Maldonado-Cubas J, San Martin-Martínez E, Quiroz-Reyes CN, Casañas-Pimentel RG. Cytotoxic effect of *Semialarium mexicanum* (Miers) Mennega root bark extracts and fractions against breast cancer cells. *Physiol Mol Biol Plants*. 2018;24(6):1185–201.
 130. International Organization for Standardization. ISO 10993-5:2009. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009. 34 p.
 131. Bauer M, Tauhardt L, Lambermont-Thijs HML, Kempe K, Hoogenboom R, Schubert US, et al. Rethinking the impact of the protonable amine density on cationic polymers for gene delivery: A comparative study of partially hydrolyzed poly(2-ethyl-2-oxazoline)s and linear poly(ethylene imine)s. *Eur J Pharm Biopharm*. 2018;133:112–21.
 132. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, M27-4th Edition. 4th ed. 2017. 46 p.
 133. Mussin J, Giusiano G. Ethno–Phytopharmacology: Product Validation Process Based on Traditional Knowledge of Medicinal Plants. In: *Agricultural, Forestry and Bioindustry Biotechnology and Biodiscovery*. 2020. p. 331–53.
 134. Pessini GL, Dias Filho BP, Nakamura CV, Garcia Cortez DA. Antibacterial Activity of Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(8):1115–20.

135. Sanches NR, Garcia Cortez DA, Schiavini MS, Nakamura CV, Dias Filho BP. An Evaluation of Antibacterial Activities of *Psidium guajava* (L.). *Brazilian Arch Biol Technol.* 2005;48(3):429–36.
136. Tanaka JCA, da Silva CC, de Oliveira AJB, Dias Filho BP. Antibacterial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. *Brazilian J Med Biol Res.* 2006;39:387–91.
137. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez AG, Nakamura CV, Dias Filho BP. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(7):1027–31.
138. Svetaz L, Tapia A, López SN, Furlán RLE, Petenatti E, Pioli R, et al. Antifungal chalcones and new caffeic acids esters from *Zuccagnia punctata* acting against soybean infecting fungi. *J Agric Food Chem.* 2004;52(11):3297–300.
139. Alvino Leite MC, de Brito Bezerra AP, de Sousa JP, de Oliveira Lima E. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. *Med Mycol.* 2015;53(3):275–84.
140. Malheiros A, Filho VC, Schmitt CB, Yunes R a., Escalante A, Svetaz L, et al. Antifungal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* using bioassay-guided fractionation. *J Pharm Pharm Sci.* 2005;8(2):335–9.
141. Salvat A, Antonnacci L, Fortunato RH, Suarez EY, Godoy HM. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol.* 2001;32(5):293–7.
142. Kuete V. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: A review. *Planta Med.* 2010;76(14):1479–91.
143. CLSI. M26-A. Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents. Vol. 19. 1999. 32 p.

144. Espinel-Ingroff A, Fothergill A, Peter J, Rinaldi MG, Walsh TJ. Testing Conditions for Determination of Minimum Fungicidal Concentrations of New and Established Antifungal Agents for. *J Clin Microbiol.* 2002;40(9):3204–8.
145. Pfaller MA, Sheehan DJ, Rex JH. Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(2):268–80.
146. Meletiadis J, Antachopoulos C, Stergiopoulou T, Pournaras S, Roilides E, Walsh TJ. Differential fungicidal activities of amphotericin B and voriconazole against *Aspergillus* species determined by microbroth methodology. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3329–37.
147. Pankey GA, Sabath LD. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram- Positive Bacterial Infections. *Clin Infect Dis.* 2004;38:864–70.
148. Hazen KC. Fungicidal versus fungistatic activity of terbinafine and itraconazole: an in vitro comparison. *J Am Acad Dermatol.* 1998;38:S37–41.
149. Tacconelli E, Magrini N. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. WHO. 2017. 7 p.
150. Rai M, Kon K, Ingle A, Duran N, Galdiero S, Galdiero M. Broad-spectrum bioactivities of silver nanoparticles: The emerging trends and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(5):1951–61.
151. Iravani S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry.* 2011;13:2638–50.
152. Mukkavalli S, Chalivendra V, Singh BR. Physico-chemical analysis of herbally prepared silver nanoparticles and its potential as a drug bioenhancer. *OpenNano.* 2017;2:19–27.

153. Gan PP, Li SFY. Potential of plant as a biological factory to synthesize gold and silver nanoparticles and their applications. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2012;11(2):169–206.
154. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig E-M, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv*. 2015;33(8):1582–614.
155. Sánchez M, Kramer F, Bargardi S, Palermo JA. Melampolides from Argentinean *Acanthospermum australe*. *Phytochem Lett*. 2009;2:93–5.
156. Amparo TR, Seibert JB, Vieira PM de A, Teixeira LFM, dos Santos ODH, de Souza GHB. Herbal medicines to the treatment of skin and soft tissue infections: advantages of the multi-targets action. *Phyther Res*. 2019;1–10.
157. Lima MC, Paiva de Sousa C, Fernandez-Prada C, Harel J, Dubreuil JD, de Souza EL. A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microb Pathog*. 2019;130:259–70.
158. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod*. 2000;63(7):1035–42.
159. EMA EMA. Committee on Herbal Medicinal Products: Guideline on Good Agricultural and Collection Practice for Starting Materials of Herbal Origin. 2006. 11 p.
160. Das K, Tiwari RKS, Shrivastava DK. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *J Med Plants Res*. 2010;4(2):104–11.
161. Amat AG, Vajia MA. Plantas Medicinales y Etnofarmacología. *Acta Farm Bonaer*. 1991;10(3):153–9.

162. Brusotti G, Cesari I, Dentamaro A, Caccialanza G, Massolini G. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. *J Pharm Biomed Anal.* 2014;87:218–28.
163. Castro LC, Sauter IP, Ethur EM, Kauffmann C, Dall'agnol R, Souza J, et al. In vitro effect of *Acanthospermum australe* (Asteraceae) extracts on *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. *Rev Bras Plantas Med.* 2014;15(4):589–94.
164. Portillo A, Vila R, Freixa B, Adzet T, Cañigüeral S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2001;76(1):93–8.
165. Miao J, Li X, Fan Y, Zhao C, Mao X, Chen X, et al. Effect of different solvents on the chemical composition, antioxidant activity and alpha-glucosidase inhibitory activity of hawthorn extracts. *Int J Food Sci Technol.* 2016;51(5):1244–51.
166. Maia JGS, Helio M, da Silva MHL, Zoghbi M das GB, Andrade EHA. Composition of the Essential Oils of *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. *J Essent Oil Res.* 2014;14(5):325–6.
167. Tzakou O, Vagias C, Gani A, Yannitsaros A. Volatile constituents of essential oils isolated at different growth stages from three *Conyza* species growing in Greece. *Flavour Fragr J.* 2005;20(4):425–8.
168. Mabrouk S, Elaissi A, Ben Jannet H, Harzallah-Skhiri F. Chemical composition of essential oils from leaves, stems, flower heads and roots of *Conyza bonariensis* L. from Tunisia. *Nat Prod Res Former Nat Prod Lett.* 2011;25(1):77–84.
169. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: Food

- sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):727–47.
170. Fabri RL, Nogueira MS, Dutra LB, Bouzada MLM, Scio E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família asteraceae. *Rev Bras Plantas Med.* 2011;13(2):183–9.
171. Nethengwe MF, Opoku AR, Dlodla P V., Madida KT, Shonhai A, Smith P, et al. Larvicidal, antipyretic and antiplasmodial activity of some Zulu medicinal plants. *J Med Plants Res.* 2012;6(7):1255–62.
172. Diaz P, Jeong SC, Lee S, Khoo C, Koyyalamudi SR. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chin Med.* 2012;7(1):26.
173. Buer CS, Imin N, Djordjevic MA. Flavonoids: New roles for old molecules. *J Integr Plant Biol.* 2010;52(1):98–111.
174. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 2002;17(6):271–8.
175. Du L, Xu Q, Huang M, Xian L, Feng JX. Synthesis of small silver nanoparticles under light radiation by fungus *Penicillium oxalicum* and its application for the catalytic reduction of methylene blue. *Mater Chem Phys.* 2015;160:40–7.
176. Sukirtha R, Priyanka KM, Antony JJ, Kamalakkannan S, Thangam R, Gunasekaran P, et al. Cytotoxic effect of Green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. *Process Biochem.* 2012;47(2):273–9.
177. Shimizu M, Horie S, Arisawa M, Hayashi T, Suzuki S, Yoshizaki M, et al. Chemical and Pharmaceutical Studies on Medicinal Plants in Paraguay. Isolation and Identification of Lens Aldose Reductase Inhibitor from “Tapecue”,

- Acanthospermum australe O.K. Chem Pharm Bull. 1987;35(3):1234–7.
178. Rocha Martins LR, Ranieri Cortez LE, Dias-Filho BP, Nakamura C V, Ferreira AG, Garcia Cortez DA. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de ¹H e ¹³C do acetato de acantoaustralida. Rev Bras Farmacogn. 2006;16(4):490–6.
179. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. Eur J Pharmacol. 2008;585(2–3):325–37.
180. Castañeda Muñoz ML. Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. Universidad Industrial de Santander. 2007.
181. Ahmad N, Sharma S, Alam MK, Singh VN, Shamsi SF, Mehta BR, et al. Rapid synthesis of silver nanoparticles using dried medicinal plant of basil. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2010;81(1):81–6.
182. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review. Food Chem Toxicol. 2008;46(2):446–75.
183. Sokół-Łetowska A, Oszmiański J, Wojdyło A. Antioxidant activity of the phenolic compounds of hawthorn, pine and skullcap. Food Chem. 2007;103(3):853–9.
184. Gertsch J. How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. J Ethnopharmacol. 2009;122(2):177–83.
185. Jeong H, Hwang J, Lee H, Hammond PT, Choi J, Hong J. In vitro blood cell viability profiling of polymers used in molecular assembly. Sci Rep. 2017;7(1):1–13.
186. Orta-García ST, Plascencia-Villa G, Ochoa-Martínez AC, Ruiz-Vera T, Pérez-

- Vázquez FJ, Velázquez-Salazar JJ, et al. Analysis of cytotoxic effects of silver nanoclusters on human peripheral blood mononuclear cells “in vitro.” *J Appl Toxicol.* 2015;35:1189–99.
187. Borase HP, Patil CD, Sauter IP, Rott MB, Patil S V. Amoebicidal activity of phytosynthesized silver nanoparticles and their in vitro cytotoxicity to human cells. *Fed Eur Microbiol Soc.* 2013;345:127–31.
188. Grigore A. Chapter 5. Plant Phenolic Compounds as Immunomodulatory Agents. In: *Intech.* 2016. p. 75–98.
189. Cherng J-M, Chiang W, Chiang L-C. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food Chem.* 2008;106(3):944–50.
190. Brandt O, Mildner M, Egger AE, Groessl M, Rix U, Posch M, et al. Nanoscalic silver possesses broad-spectrum antimicrobial activities and exhibits fewer toxicological side effects than silver sulfadiazine. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2012;8(4):478–88.
191. McPherson ML, Cimino NM. Topical NSAID Formulations. *Pain Med.* 2013;14:S35–9.
192. Gelmetti C. Local antibiotics in dermatology. *Dermatol Ther.* 2008;21(2):187–95.
193. Kwan KHL, Liu X, To MKT, Yeung KWK, Ho C ming, Wong KKY. Modulation of collagen alignment by silver nanoparticles results in better mechanical properties in wound healing. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2011;7(4):497–504.
194. Liu X, Lee PY, Ho CM, Lui VCH, Chen Y, Che CM, et al. Silver nanoparticles mediate differential responses in keratinocytes and fibroblasts during skin wound healing. *ChemMedChem.* 2010;5(3):468–75.

195. Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 2016;6:71–9.
196. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, M38-3th Edition. 3th ed. 2017. 62 p.
197. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. Definitive Document E.Def 7.3.1. 2017. 21 p.
198. Faleiro ML. The mode of antibacterial action of essential oils. In: Méndez-Vilas, editor. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances.* 2011. p. 1143–56.
199. Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Messer SA, Pfaller MA. Evaluation of endpoints for antifungal susceptibility determinations with LY303366. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(6):1387–91.
200. Ernst EJ, Roling EE, Petzold CR, Keele DJ, Klepser ME. In Vitro Activity of Micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: Microdilution, Time-Kill, and Postantifungal-Effect Studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(12):3846–53.
201. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, M07-11th Edition.* 11th ed. 2018. 112 p.
202. Mussin JE, Roldán MV, Rojas F, Sosa M de LÁ, Pellegrini N, Giusiano G. Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with ketoconazole against *Malassezia furfur*. *AMB Express.* 2019;9(131):1–9.
203. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution

- Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd Edition, M27-A3. 2008. 40 p.
204. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod.* 2020;83(3):770–803.
 205. Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Cordoba S, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* Species Complex: an International Study of Wild-Type Susceptibility Endpoint Distributions and Epidemiological Cutoff Values for Fluconazole, Itraconazole, Posaconazole, and Voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(11):5898–906.
 206. Joseph JM, Jain R, Danziger LH. Micafungin: A new echinocandin antifungal. *Pharmacotherapy.* 2007;27(1):53–67.
 207. Lara HH, Romero-Urbina DG, Pierce C, Lopez-Ribot JL, Arellano-Jiménez MJ, Jose-Yacaman M. Effect of silver nanoparticles on *Candida albicans* biofilms: an ultrastructural study. *J Nanobiotechnology.* 2015;13(1):91.
 208. Vazquez-Muñoz R, Avalos-Borja M, Castro-Longoria E. Ultrastructural analysis of *Candida albicans* when exposed to silver nanoparticles. *PLoS One.* 2014;9(10):1–10.
 209. Hwang IS, Lee J, Hwang JH, Kim KJ, Lee DG. Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals. *FEBS J.* 2012;279(7):1327–38.
 210. Le AT, Le TT, Nguyen VQ, Tran HH, Dang DA, Tran QH, et al. Powerful colloidal silver nanoparticles for the prevention of gastrointestinal bacterial infections. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol.* 2012;3(4).
 211. Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol.*

2012;112:841–52.

212. Sportelli MC, Longano D, Bonerba E, Tantillo G, Torsi L, Sabbatini L, et al. Electrochemical Preparation of Synergistic Nanoantimicrobials. *Molecules*. 2020;25(49):1–11.

10. ANEXOS

Agar Dixon modificado

Medio cultivo utilizado para *Malassezia* spp.

Composición:

Extracto de Malta-----	36 g
Peptona-----	6 g
Bilis de Buey-----	20 g
Tween 40-----	10 mL
Glicerol-----	2 mL
Ácido oleico-----	2 mL
Agar-----	15 g
Cloranfenicol-----	250 mg
Agua destilada-----	1000 mL

Procedimiento:

Disolver el agar. Agregar el resto de los componentes (con excepción del Tween 40 y el glicerol) y mezclar. Una vez bien disuelto, agregar el Tween 40 y el glicerol. Llevar a ebullición y autoclavar a 121 °C durante 15 minutos a una atmósfera de presión.