



Instituto Universitario de Ciencias de la Salud
Fundación H. A. Barceló
Doctorado en Ciencias de la Salud

**Capacidad antifúngica de extractos acuosos de
frutos de *Ilex paraguariensis* frente a hongos
dermatofitos**

Tesis doctoral

Doctorando: Beda Elizabeth Mereles Rodríguez

Directora de Tesis: Dra. Alicia Arechavala
Co-Director de Tesis: Dr. Miguel Schmalko

Resumen

Numerosos estudios científicos dan cuenta acerca de las propiedades biomédicas y farmacológicas de los derivados de *Ilex paraguariensis* (Yerba mate). Sobre sus frutos, existen muy pocos estudios científicos realizados en cuanto a sus propiedades fitoquímicas y/o farmacológicas; y prácticamente nulos sobre la capacidad antimicrobiana de los mismos.

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antifúngica *in vitro* de extractos acuosos de frutos de *I. paraguariensis* sobre hongos dermatofitos.

Se trabajó con cepas aisladas de muestras clínicas, de las especies *Trichophyton mentagrophytes complex*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton tonsurans* y *Nannizzia gypsea*. Para evaluar la capacidad antifúngica del extracto acuoso de yerba mate (EAFYM), se preparó una solución madre de 500 mg/ml. Se aplicó el método cualitativo de difusión en agar Müeller Hinton con un inóculo fúngico de $0,4-5 \times 10^4$ UFC/ml, y discos de papel embebidos con el EAFYM con concentraciones que oscilaron entre 10 mg/ml a 40 mg/ml. Asimismo se aplicaron métodos cuantitativos de microdilución en caldo RPMI y dilución en agar Müeller Hinton, con un inóculo fúngico de $1-3 \times 10^3$ UFC/ml. Con las diluciones realizadas la concentración más alta del EAFYM fue de 125 mg/ml y la más baja de 0,49 mg/ml. Se realizaron controles de crecimiento fúngico, esterilidad y de antifúngicos comerciales de referencia. La incubación se realizó a 30 °C con controles diarios hasta 96 h. En la técnica cualitativa, la lectura consistió en la medición del halo de inhibición (mm) del crecimiento fúngico. En las técnicas cuantitativas, en la observación visual del desarrollo fúngico a distintas concentraciones del EAFYM y la determinación de la mínima concentración que produjo inhibición completa (CIM) del crecimiento fúngico.

Por el método de difusión en agar se observó acción fungistática del EAFYM a una concentración de 40 mg/ml. Mediante las técnicas de dilución se determinó que la CIM del EAFYM que inhibió el desarrollo fúngico estuvo entre 31,25 y 125 mg/ml.

Se concluye que el EAFYM posee actividad antifúngica *in vitro* frente a las cepas de dermatofitos estudiadas.

Palabras clave

Dermatofitos, frutos de yerba mate, actividad antifúngica

Abstract

Numerous scientific studies account for the biomedical and pharmacological properties of derivatives of *Ilex paraguariensis* (Yerba mate). About their fruits, there are very few scientific studies made regarding its phytochemical and / or pharmacological properties; and practically null on their antimicrobial capacity.

The objective of this study was to evaluate the antifungal capacity *in vitro* of aqueous extracts of fruits of *I. paraguariensis* on dermatophyte fungi.

We worked with strains isolated from clinical samples of the species *Trichophyton mentagrophytes* complex, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton tonsurans* and *Nannizzia gypsea*. To evaluate the antifungal capacity of the aqueous extract of yerba mate (EAFYM), a stock solution of 500 mg/ml was prepared. The qualitative method of diffusion in Müller Hinton agar was applied with a fungal inoculum of $0.4-5 \times 10^4$ CFU/ml, and paper discs embedded with EAFYM with concentrations ranging from 10 mg/ml to 40 mg/ml. Likewise, quantitative methods of microdilution in RPMI broth and dilution in Müller Hinton agar were applied, with a fungal inoculum of $1-3 \times 10^3$ CFU/ml. With the dilutions performed, the highest concentration of EAFYM was 125 mg/ml and the lowest was 0.49 mg/ml. Controls of fungal growth, sterility and commercial reference antifungals were performed. Incubation was performed at 30 °C with daily controls up to 96 h. In the qualitative technique, the reading consisted of measuring the halo of inhibition (mm) of fungal growth. The quantitative techniques, consisted in the visual observation of fungal development at different concentrations of EAFYM and the determination of the minimum concentration that produced complete inhibition (MIC) of fungal growth.

The antifungal activity of EAFYM was observed by the agar diffusion method at a concentration of 40 mg/ml. The dilution techniques determined that the CIM of the EAFYM that inhibited fungal development was between 31.25 and 125 mg/ml.

It is concluded that EAFYM has *in vitro* antifungal activity against the dermatophyte strains studied.

Key words

Dermatophytes, yerba mate fruits, antifungal activity

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alicia Arechavala, por su generosidad, sus valiosos consejos, su constante apoyo y el tiempo dedicado, muchas gracias.

Al Dr. Miguel Schmalko, por sus importantes consejos profesionales y el tiempo dedicado.

A mi colega y amiga Miriam Chade, por su constante apoyo y aliento para culminar la tesis.

A mis colegas Jacqueline Fiedler y Azucena Bruquetas por su colaboración durante el desarrollo de la parte experimental.

A mis colegas de la Cátedra de Micología; Celina Vedoya, Ernesto Velásquez y Vanesa Sosa, que me apoyaron de una u otra forma para la realización de la tesis.

A los docentes de la FCEQyN. UNaM; Patricia Scipioni, Fernando Felissia, Gabriela De Battista y Gabriela Pergher, por su colaboración y valiosos consejos profesionales.

A mi esposo Jorge y mi hija Constanza, por su apoyo incondicional en todo momento.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATF: antifúngico

AATF: actividad antifúngica

AA: agar agua

ASD: agar Sabouraud dextrosa

ASHP: agar selectivo para hongos patógenos

AHA: agar harina de avena

APD: agar papa dextrosa

AMH: agar Müller Hinton

AHyL: agar Hongos y levaduras

CC: control de crecimiento

CE: control de esterilidad

CIM: concentración inhibitoria mínima

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CTRIM: clotrimazol

DMT: dermatofito

EAFYM: extracto acuoso de frutos de yerba mate

FLUCZ: fluconazol

GRISE: griseofulvina

HFND: hongos filamentosos no dermatofitos

ITRAC: itraconazol

MML: método de microdilución en medio líquido

MDS: método de dilución en medio sólido

PCE: punto de corte epidemiológico

SF: solución fisiológica

Sn: solución

TERBI: terbinafina

UFC/ml: unidad formadora de colonias por mililitro

YM: yerba mate

LISTA DE TABLAS

Tabla N°1. Clasificación de los dermatofitos según su ecología.

Tabla N° 2. Característica de los cultivos de los dermatofitos más frecuentes.

Tabla N° 3. Valores de corte epidemiológico de ATF. Rosco Diagnóstica.

Tabla N° 4. Disolventes para los antifúngicos utilizados.

Tabla N° 5. Diluciones del ATF soluble en agua.

Tabla N° 6. Diluciones de los ATF insolubles en agua.

Tabla N° 7. Tiempo y temperatura de incubación para hongos ensayados.

Tabla N° 8. Puntos de corte ($\mu\text{g/ml}$) de *Candida* spp. frente al fluconazol.

Tabla N° 9. Rangos de CIM aceptables para los ATF ($\mu\text{g/ml}$) para los controles de calidad.

Tabla N° 10. Halos de inhibición (mm) de *T. mentagrophytes* frente a los ATF comerciales probados.

Tabla N° 11. ANOVA. Halos de *T. mentagrophytes* para los diferentes ATF probados.

Tabla N° 12. Halos de inhibición (mm) de *T. rubrum* frente a los ATF comerciales probados.

Tabla N° 13. ANOVA. Halos de Inhibición de *T. rubrum* para los diferentes ATF probados.

Tabla N° 14. Halos de inhibición (mm) de *M. canis* frente a los ATF comerciales probados.

Tabla N° 15. ANOVA. Halos de Inhibición de *M. canis* para los diferentes ATF probados

N° 16. Halos de inhibición (mm) de *N. gypsea* frente a los ATF comerciales probados.

Tabla N° 17. ANOVA. Halos de Inhibición de *N. gypsea* para los diferentes ATF probados.

Tabla N° 18. Rango de diámetro de halos de inhibición (mm) de crecimiento de dermatofitos frente a los ATF comerciales probados.

Tabla N° 19. Halos de inhibición (mm) de *T. mentagrophytes* frente al EAFYM a diferentes concentraciones. EAFYM₁: EAFYM de Apóstoles. EAFYM₂: EAFYM de Oberá.

Tabla N° 20. ANOVA. Halos de Inhibición de *T. mentagrophytes* para los EAFYM probados.

Tabla N° 21. Halos de inhibición (mm) de *M. canis* frente a EAFYM a diferentes concentraciones. EAFYM₁: EAFYM de Apóstoles. EAFYM₂: EAFYM de Oberá.

Tabla N° 22. ANOVA. Halos de Inhibición de *M. canis* para los EAFYM probados.

Tabla N°23. CIM de los ATF probados frente a las cepas del complejo *T. mentagrophytes*.

Tabla N° 24. CIM de los ATF probados frente a las cepas de *T. rubrum*.

Tabla N° 25. CIM de los ATF probados frente a las cepas de *M. canis*.

Tabla N° 26. CIM de los ATF probados frente a las cepas de *N. gypsea*.

Tabla N° 27. CIM de los ATF probados frente a las cepas de *T. tonsurans*.

Tabla Nº 28. Rangos de CIM de los ATF probados frente a distintas especies de DMT.

Tabla Nº 29. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *T. mentagrophytes*. MML.

Tabla Nº 30. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *T. rubrum* estudiadas. MML.

Tabla Nº 31. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *M. canis* estudiadas. MML.

Tabla Nº 32. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *N. gypsea* estudiadas. MML.

Tabla Nº 33. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *T. tonsurans* estudiadas. MML.

Tabla Nº 34. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *T. mentagrophytes*. MDS.

Tabla Nº 35. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *T. rubrum* estudiadas. MDS.

Tabla Nº 36. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *M.canis* estudiadas. MDS.

Tabla Nº 37. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *N. gypsea* estudiadas. MDS.

Tabla Nº 38. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *T. tonsurans* estudiadas. MDS.

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1. Zona productora de YM. Secretaría de Agroindustria. Ministerio de Producción y trabajo. Argentina.

Figura N° 2. Observaciones microscópicas (400X). A: observación de esporas fúngicas alrededor de pelo infectado. B: observación de hifas hialinas septadas en muestra de piel.

Figura N° 3. Colonias y estructuras microscópicas (400X) de algunas especies de DMT. A: colonia de *T. mentagrophytes*. B: abundantes microconidios e hifas espiraladas de *T. mentagrophytes*. C: colonia de *N. gypsea*. D: macroconidias de *N. gypsea*.

Figura N° 4. Cepa de *T. mentagrophytes* repicada en AHA a partir del cual se logró abundante esporulación.

Figura N° 5. Procedimiento para la preparación del inóculo de hongos dermatofitos.

Figura N° 6. Esquema para las diluciones del ATF soluble en agua. Diluyente H₂O.

Figura N° 7. Segundo paso de las diluciones de los ATF solubles en agua.

Figura N° 8. Esquema para las diluciones de los ATF insolubles en agua. Diluyente DMSO.

Figura N° 9. Segundo paso de las diluciones de los ATF insolubles en agua. Diluyente RPMI1640.

Figura N° 10. Cargado de los ATF en la microplaca de cultivo.

Figura. N° 11. Proceso de inoculación de la microplaca.

Figura N° 12. Espejo lector de placas de microdilución.

Figura N° 13. Zonas de recolección de los frutos de *I. paraguariensis* para la obtención de EAFYM.

Figura N° 14. Fotografía de frutos verdes de YM recolectados.

Figura N° 15. Fotografía de frutos maduros de YM recolectados.

Figura N° 16. Pardeamiento de frutos de YM.

Figura N° 17. Fotografías de frutos de YM escaldados y envasados para su conservación.

Figura N° 18. Fotografía de cepa de *T. rubrum* con halos de inhibición nítidos frente a los ATF probados.

Figura N° 19. En la fotografía se observan halos de inhibición de *T. mentagrophytes* frente a EAFYM de YM (40mg/ml).

Figura N° 20. Placas de microcultivo con 96 h de incubación. Filas A-F: hongos DMT. Filas G y H: cepas controles del género *Candida* y *Aspergillus*.

Figura N° 21. CIM de EAFYM frente a DMT. Placa de cultivo con 96 h de incubación.

Figura N° 22. Observación microscópica. *T. mentagrophytes*. Puede apreciarse la disminución del desarrollo fúngico a mayor concentración del EAFYM.

Figuras N° 23, 24 y 25. Repiques para confirmación de CIM del EAFYM frente a DMT.

Figura N° 26. CIM = 125mg/ml del EAFYM frente a *T. mentagrophytes* (Cepa 1). MDS.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1. Comparación de medias de halos de inhibición de *T. mentagrophytes* para los ATF evaluados. Los límites de confianza se encuentran en distintos niveles.

Gráfico N° 2. Comparación de medias de halos de inhibición de *T. rubrum* para los ATF evaluados. Los límites de confianza se encuentran en distintos niveles.

Gráfico N°3. Comparación de medias de halos de inhibición de *M. canis* para los ATF evaluados. Los límites de confianza se encuentran en distintos niveles.

Gráfico N°4. Comparación de medias de halos de inhibición de *N. gypsea* para los ATF evaluados. Los límites de confianza se encuentran en distintos niveles.

Gráfico N°5. Comparación de medias de halos de inhibición de *T. mentagrophytes* frente a los EAFYM₁ EAFYM₂. Los límites de confianza se encuentran superpuestos.

Gráfico N° 6. Comparación de medias de halos de inhibición de *M. canis* para los EAFYM₁ EAFYM₂. Los límites de confianza se encuentran superpuestos.

INDICE DE CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS DEL PROYECTO	7
MARCO TEÓRICO.....	8
1. Micosis	8
2. Micosis cutáneas	8
3. Dermatofitosis	9
3.1 Clasificación taxonómica	10
3.3 Características morfológicas de los dermatofitos	11
3.4 Epidemiología.....	13
3.5 Factores predisponentes	15
3.6 Patogénesis	16
3.7 Manifestaciones clínicas.....	18
3.8 Diagnóstico micológico de las dermatofitosis.....	24
3.9 Tratamiento antifúngico (ATF) de las dermatofitosis	27
4. Clasificación de antifúngicos de acuerdo al grupo químico al que pertenecen	29
5. Resistencia a los antifúngicos	31
6. Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos comerciales	32
7. Antifúngicos de origen natural.....	34
8. Métodos de extracción y caracterización de extractos vegetales.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS	39
1. Tipo de diseño.....	39
2. Universo	39
3. Muestras	39
4. Estructura de los datos.....	40
5. Métodos para el aislamiento e identificación de las cepas fúngicas.....	43
6. Métodos para determinar la sensibilidad frente a los antifúngicos	45

6.1. Prueba de sensibilidad en medio sólido (Método cualitativo)	46
6.2 Prueba de sensibilidad en medio líquido (Método cuantitativo)	51
6.3 Pruebas de evaluación de actividad antifúngica de extractos acuosos de frutos de <i>I. paraguariensis</i> (Yerba mate)	63
6.3.1. Frutos de <i>I. paraguariensis</i> utilizados	64
6.3.2. Obtención de extractos de frutos de YM	66
6.3.3. Prueba de sensibilidad cualitativa. Método de difusión en medio sólido	67
6.3.4. Estudio de la actividad del EAFYM por métodos cuantitativos	68
6.3.4.1 Método de microdilución en medio líquido (MML) (con modificaciones respecto al documento 38- A2 del CLSI)	68
6.3.4.2 Método de dilución en medio sólido (MDS)	69
RESULTADOS	71
1. Determinación de la sensibilidad de hongos dermatofitos a los antifúngicos comerciales por el método de difusión en agar	71
2. Determinación de la sensibilidad de hongos dermatofitos al EAFYM por el método de difusión en agar	77
3. Determinación de la sensibilidad de hongos dermatofitos a los antifúngicos comerciales por el método de microdilución en medio líquido	81
4. Determinación de la sensibilidad de dermatofitos al extracto acuoso de frutos de yerba mate por el método de microdilución en medio líquido (MML)	86
5. Determinación de la sensibilidad de dermatofitos al extracto acuoso de frutos de yerba mate por el método de dilución en medio sólido (MDS)	92
DISCUSIÓN	96
CONCLUSIONES	104
Reflexión final	106
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
ANEXOS	122

INTRODUCCIÓN

Las micosis cutáneas incluyen una amplia variedad de procesos en los que pueden estar afectados la piel y sus anexos (pelo y uñas). Las más frecuentes son las ocasionadas por dermatofitos, hongos filamentosos parásitos de la queratina que comprenden tres géneros anamorfos: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. Según su localización se manifiestan por afección pilar, engrosamiento ungueal o por placas con eritema y descamación con bordes activos. Son de evolución subaguda o crónica, la invasión profunda es excepcional. (Medvedeff y cols., 2003; Nardiny cols., 2006; Rubio Calvo y cols., 2007; Cuétara, 2007; Mereles Rodríguez y cols., 2013; Arenas, 2014).

Se generan por contacto directo con el hongo en su hábitat, o por contacto con una persona o animal infectado. Según su hábitat natural y su preferencia por el hospedero, los dermatofitos pueden ser geófilos, zoófilos y antropófilos; aunque su capacidad de multiplicación, en algunas de ellas, es preferencial pero no exclusiva. El ser humano puede ser infectado por bastantes especies zoófilas y algunas geófilas. El equilibrio entre la relación parásito-huésped se consigue a lo largo de la convivencia entre ambos. Cuando ésta ha tenido lugar a lo largo de milenios existe una buena adaptación, la respuesta inmune puede ser mínima, el proceso es poco agudo, pero la consecuencia de esa permisividad es la tendencia a la cronicidad. Así, las dermatofitosis por especies antropófilas en el ser humano suelen producir unos cuadros más crónicos que las producidas por especies zoófilas. Se supone que las primeras han estado desde siempre con nosotros, mientras que las últimas se han adaptado más recientemente, cuando el ser humano incorporó a su vida animales domésticos y peridomésticos (Rubio y cols., 1999; Medvedeff y cols., 2003; Prats, 2007).

Es difícil determinar el impacto real de las infecciones fúngicas pero parece evidente que las micosis cutáneas son las más importantes en términos de morbilidad. Constituyen un problema sanitario de alcance mayor en la población mundial de todas las edades, y se calcula que generan, al menos, del 5 al 10% de las consultas dermatológicas. Se estima que la infección fúngica de la lámina ungueal es una de las infecciones fúngicas de mayor incidencia. Las onicomicosis son responsables del 50 % de las lesiones ungueales y su tratamiento es complejo y muchas veces insatisfactorio (Allevato y cols., 2007; Negróni, 2008).

La elección del tratamiento antifúngico puede diferir a la hora de escoger un fármaco sobre otro, dependiendo del agente causal, la zona afectada, patologías concomitantes, fármacos asociados o incluso disponibilidad del fármaco (Sánchez Carazo y cols., 1999). Su utilización debe estar indicada, valorando los beneficios, frente a los posibles efectos secundarios.

El tratamiento de las micosis en general es largo y tedioso. Particularmente el tratamiento de las onicomicosis constituye un reto terapéutico y es común la aparición de recaídas, lo que trae como consecuencia un alto costo y el abandono del tratamiento por parte del paciente. Los derivados azólicos y las alilaminas, utilizados en la terapia antifúngica de las micosis de piel lampiña pasaron a ser efectivos, pero la onicomicosis continúa siendo un problema (Llambrich y cols., 2002; Medvedeff y cols., 2003). Su tratamiento es complejo y demanda, el profundo conocimiento de las características clínicas, una adecuada interpretación de los resultados de laboratorio, las interacciones medicamentosas, así como los efectos tóxicos y contraindicaciones de los medicamentos empleados en su tratamiento. La ausencia frecuente de estas condiciones ha creado, para las onicomicosis, la fama de enfermedades incurables o que requieren tratamientos prolongados, costosos y con numerosos efectos colaterales (Negróni, 2008).

En los últimos años, el número de casos de micosis con falla terapéutica se ha incrementado en el mundo, lo cual es atribuible a una deficiencia en la función inmunológica, baja biodisponibilidad de los antimicóticos, alteraciones en el metabolismo de los antifúngicos, interacciones medicamentosas y resistencia antifúngica primaria o secundaria (Manzano-Gayosso y cols., 2008).

Aunque la comunicación de casos con mala respuesta terapéutica va en aumento, hasta el momento se han realizado pocos estudios de sensibilidad a nivel mundial (Méndez-Tovar y cols., 2007). Se ha demostrado resistencia a los azoles en alrededor del 20% de las cepas de dermatofitos estudiadas (Méndez-Tovar y cols., 2007; Manzano-Gayosso y cols., 2008). Los resultados de los distintos estudios realizados varían dependiendo de la especie estudiada (Serrano Martino y cols., 2003).

Las pruebas de sensibilidad permiten conocer si los microorganismos ensayados son sensibles o resistentes a los antifúngicos; si los resultados se interpretan con sentido común, son de utilidad para el uso clínico. Los resultados obtenidos pueden influir en la elección de un tratamiento empírico, pues el conocimiento del perfil de sensibilidad de las cepas autóctonas, es información útil para elegir el tratamiento más adecuado. Además permiten conocer y vigilar la epidemiología de la resistencia de las especies circulantes en la región, datos importantes en la política de control de la infección fúngica. Asimismo, son pruebas cruciales para el descubrimiento y desarrollo de nuevos antimicrobianos (Córdoba y cols., 2016).

El rol creciente de los hongos en las infecciones humanas, unido al aumento clínico y microbiológico de resistencia a los antimicóticos, ha estimulado el desarrollo de nuevos y diversos compuestos con mayor espectro de acción antifúngica y menor toxicidad que las actuales moléculas, y encuentran muy buena acogida los productos de origen natural debido a la extensa fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica (Thomson y

cols., 2011). Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos, ya sea en fármacos o en las preparaciones tradicionales, con la finalidad de controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia de los microorganismos y los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos. Mediante técnicas microbiológicas se ha demostrado una amplia gama de productos y extractos de plantas superiores con actividad contra algunos microorganismos asociados con enfermedades infecciosas (Rangell, 2001).

Ilex paraguariensis, es una planta que crece fundamentalmente en Argentina, Brasil, Chile y Paraguay, cuyas hojas y tallos son procesados para obtener la yerba mate, la que es consumida como una infusión muy popular en estas regiones. Su popularidad ha aumentado a nivel mundial debido a la demanda por bebidas saludables, alimentos más naturales y por los potenciales beneficios para la salud de la yerba mate (antioxidante, antimicrobiano, acción contra la obesidad y diabetes, digestivo, estimulante). En estudios realizados se obtuvieron resultados prometedores en cuanto a la capacidad antimicrobiana de las hojas de la yerba mate (Schapovaloff y cols., 2009). Se han identificado componentes tales como: linalool, α -ionona, β -ionona, α -terpineol, ácido octanoico, geraniol, 1-octanol, nerolidol, geranilactetona, y eugenol que han demostrado ser activos frente a un amplio espectro de bacterias gram-positivas y gram-negativas. Investigaciones recientes han ampliado el espectro de uso de la yerba mate como agente antimicrobiano, protección de cultivos y acción contra patógenos transmitidos por alimentos (Burriss y cols., 2011). Poco se ha estudiado sobre la propiedad antifúngica del fruto de la yerba mate.

Es un hecho de observación clínica cada vez más frecuente que muchos pacientes con micosis cutáneas presentan resistencia al tratamiento antifúngico y fundamentalmente aquellos que presentan onicomicosis. Esta afección presenta formas clínicas muy

variadas, además un mismo signo puede ser compartido por varias enfermedades, y en general no responden al tratamiento antimicótico, a pesar de que los esquemas de tratamiento son los recomendados (Manzano-Gayosso y cols., 2008), lo que implica un aumento considerable en el costo del tratamiento y disminución de la calidad de vida del paciente. A pesar de ello, se han realizado muy pocos estudios de sensibilidad a los antifúngicos a nivel mundial (Méndez Tovar y cols., 2007) y en la provincia de Misiones no se registran publicaciones referidas al tema.

Es una realidad que los antifúngicos disponibles actualmente, tienen una toxicidad importante y alto costo. Los compuestos derivados de plantas pueden constituir sustitutos más seguros y eficaces que los agentes antimicrobianos producidos sintéticamente (Maoz, 1998). La provincia de Misiones por razones geológicas, presenta abundante vegetación que incluye una variedad de plantas con características medicinales. Entre éstas se encuentra la yerba mate, cuya producción y consumo poseen un fuerte arraigo territorial y puede constituirse en un recurso importante en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas en el tratamiento de las micosis.

Se han llevado a cabo estudios sobre los componentes activos de *I. paraguariensis* (Yerba mate) y la actividad antibacteriana de extractos obtenidos de las hojas de la misma (Burriss y cols., 2011). Sin embargo, no se han realizado estudios que demuestren la actividad antifúngica de los frutos de la yerba mate; la que de comprobarse, podría constituir una alternativa natural de tratamiento y con menos efectos secundarios que el de los tratamientos convencionales para las micosis cutáneas, y en particular para las onicomycosis, cuyo tratamiento presenta generalmente altas tasas de fracaso en la práctica clínica (Llambrich y cols., 2002).

Los frutos de *I. paraguariensis* constituyen actualmente un residuo que no representa ningún valor comercial en la industria yerbatera. Inevitablemente se

encuentran presentes en la cosecha y posterior procesamiento del material vegetal y deben ser separados a fin de que el producto comercial cumpla con las especificaciones del Código Alimentario Argentino (CAA). En la actualidad los frutos son descartados y utilizados simplemente como abono (Cogoi, 2016).

La utilización de los frutos de yerba mate, considerados residuos sin valor comercial, para la investigación de su poder antifúngico, constituye un tema de especial interés desde el punto de vista social y económico. Con los resultados de este estudio se intentará demostrar la actividad antimicótica *in vitro* de extractos acuosos del fruto de la yerba mate, frente a los hongos dermatofitos, principales agentes productores de micosis cutáneas. Esto servirá para que en un futuro, se puedan realizar estudios de identificación y separación de los componentes activos, y con los estudios *in vivo* correspondientes, se logrará contribuir sin duda, al mejoramiento del arsenal de fármacos antimicóticos, de menor costo y efectos colaterales que los disponibles en la actualidad, al tiempo que se preservará un recurso vegetal autóctono medicinal.

HIPÓTESIS

Los extractos acuosos de los frutos de *I. paraguariensis*, poseen actividad antifúngica *in vitro* contra los hongos dermatofitos.

OBJETIVOS

Objetivo general:

El objetivo del proyecto es determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos acuosos de frutos de *I. paraguariensis* sobre hongos dermatofitos aislados de muestras clínicas.

Objetivos específicos:

1. Determinar la sensibilidad *in vitro* de cepas de hongos dermatofitos, con discos comerciales de antifúngicos convencionales, por el método de difusión en medio sólido.
2. Determinar la sensibilidad *in vitro* de cepas de hongos dermatofitos a los extractos acuosos de frutos de yerba mate, mediante el método de difusión en medio sólido.
3. Determinar la concentración inhibitoria mínima de antifúngicos convencionales de uso comercial con actividad contra los dermatofitos, por el método de microdilución en medio líquido.
4. Determinar la concentración inhibitoria mínima de extractos acuosos de frutos de yerba mate, con actividad antifúngica frente a los hongos dermatofitos, por el método de microdilución en medio líquido.
5. Determinar la concentración inhibitoria mínima de extractos acuosos de frutos de yerba mate, con actividad antifúngica frente a los hongos dermatofitos, por el método de dilución en medio sólido.
6. Comparar el perfil de sensibilidad de los dermatofitos frente a los extractos acuosos de frutos de yerba mate respecto a los obtenidos con los antifúngicos convencionales.

MARCO TEÓRICO

1. Micosis

Se denomina micosis a las infecciones de origen fúngico, que afectan a cualquier tejido, de sintomatología variada, cuadros clínicos leves, moderados o graves, que en ocasiones conducen a la muerte; afectan a cualquier edad, sexo, condición socioeconómica y comparten con las infecciones parasitarias, bacteriológicas y virales la misma importancia médica (López Martínez, 2008). Se clasifican atendiendo a su localización anatomoclínica en: superficiales, cutáneas, profundas localizadas, profundas o sistémicas (Rubio Calvo y cols., 2007).

2. Micosis cutáneas

Las micosis cutáneas incluyen una amplia variedad de procesos en los que pueden estar afectados los tejidos queratinizados (piel, pelo y uñas) (Rubio Calvo y cols., 2007).

Dentro de las micosis cutáneas, encontramos las: dermatofitosis (causadas por *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp. y *Epidermophyton floccosum*); las candidiasis (*Candida* spp.) y micosis por otras levaduras (*Geotrichum* spp., *Wickerhamomyces* spp.), las onicomycosis por hongos filamentosos no dermatofitos (HFND) (*Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., etc.) y la pitiriasis versicolor (*Malassezia* spp.) (Cuétara, 2007). Los dermatofitos, son los hongos más frecuentemente involucrados en las afecciones cutáneas (Medvedeff y cols., 2003; Manzano Gayosso, 2005; Nardin y cols., 2006; Mereles y cols., 2013).

Es difícil determinar el impacto real de las infecciones fúngicas pero parece evidente que las micosis cutáneas son las más importantes en términos de morbilidad. Constituyen

un problema sanitario de alcance mayor en la población mundial de todas las edades, y se calcula que generan, al menos, del 5 % al 10 % de las consultas dermatológicas. Se estima que la infección fúngica de la lámina ungueal es una de las infecciones fúngicas de mayor incidencia en el mundo, afectando aproximadamente al 2 % a 5 % de la población (Allevato y cols., 2007).

Las onicomycosis son responsables del 50 % de las lesiones ungueales y su tratamiento es complejo y muchas veces insatisfactorio. El rol de los dermatofitos en este tipo de lesiones, es indiscutible, mientras que el aislamiento de levaduras y de hongos filamentosos no dermatofitos, requiere siempre una confirmación y la exclusión de otras causas de alteraciones ungueales. Los dermatofitos son responsables de más del 90 % de las micosis ungueales que afectan los pies y las especies de mayor prevalencia son *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. En uñas de las manos, las levaduras del género *Candida*, son predominantes. Los hongos filamentosos no dermatofitos (HFND) son responsables de menos del 5 % de las onicomycosis estudiadas (Negroni, 2008).

3. Dermatofitosis

Son las micosis ocasionadas por hongos dermatofitos, parásitos de la queratina, por lo que afectan piel y sus anexos (pelo y uña). Son hongos filamentosos pluricelulares, potencialmente patógenos para el hombre y los animales, poseen gran capacidad de adaptación a las condiciones ambientales más diversas y tienen especial afinidad para parasitar las estructuras queratinizadas, por lo que reciben el nombre de hongos queratinofílicos (Medvedeff y cols., 2003; Velasco Pastor y cols., 2006; Sánchez Saldaña y cols., 2009).

3.1 Clasificación taxonómica

Los dermatofitos están mayoritariamente agrupados en tres géneros anamorfos: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. Estos géneros se diferencian por los elementos que intervienen en la reproducción asexual (microconidios y macroconidios) y un amplio número de estructuras vegetativas (artroconidios, clamidoconidios, hifas en espiral, en raqueta o en candelabro, órganos nodulares y pectinados). Los teleomorfos de los géneros *Trichophyton* y *Microsporum* pertenecen a los géneros *Arthroderma* y *Nannizzia*. No se ha descrito fase teleomorfa para el género *Epidermophyton*. Se han identificado 43 especies anamorfos, aunque no todas son patógenas para el ser humano (Velasco Pastor y cols., 2006; Cabañes Saenz, 2007; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014; Sybren de Hoog y cols., 2017).

3.2 Clasificación de los dermatofitos según su ecología

De acuerdo a su hábitat natural, se clasifica a los dermatofitos en tres grupos: antropófilos, zoófilos y geófilos. En la Tabla N° 1, se puede observar la clasificación según su distribución ecológica de las especies más frecuentes a nivel mundial. El reservorio de las especies antropófilas es exclusivamente el ser humano. Las infecciones, provocan escasa respuesta inflamatoria, pudiendo ocasionar lesiones crónicas, con baja tendencia a la curación espontánea. Se transmiten de un ser humano a otro directamente o indirectamente por fómites, dando lugar a epidemias en colectividades, como piscinas, duchas, etc. En el caso de los hongos zoófilos su hábitat natural son los animales, pero también ocasionalmente pueden afectar al ser humano provocando epidemias familiares.

Las fuentes más habituales de contagio son los perros, gatos, conejos y ganado vacuno. La transmisión puede ocurrir por contacto directo con el animal infectado o indirectamente por material contaminado. Los cuadros clínicos que producen suelen

presentar con importante respuesta inflamatoria. Los geófilos tienen su hábitat en el suelo, en especial en restos de queratina desprendidos de animales y personas, que caen en el suelo y están en proceso de descomposición (Medvedeff y cols., 2003; Sandoval y cols., 2012; Arenas, 2014).

De forma esporádica pueden parasitar al hombre directamente o a través de animales, cuando lo hacen, producen una reacción inflamatoria intensa (Velasco Pastor y cols., 2006; Ausina Ruiz y cols., 2006).

Tabla N°1. Clasificación de los dermatofitos según su ecología

Geófilos	Zoófilos	Antropófilos
<i>Nannizzia gypsea</i>	<i>M. canis</i>	<i>E. floccosum</i>
<i>M. cookei</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. audouinii</i>
<i>M. fulvum</i>	<i>M. equinum</i>	<i>T. violaceum</i>
	<i>Lophophyton gallinae</i>	<i>T. rubrum</i>
	<i>M. persicolor</i>	<i>T. interdigitale</i>
	<i>T. verrucosum</i>	<i>T. tonsurans</i>
	<i>T. equinum</i>	

3.3 Características morfológicas de los dermatofitos

En el examen microscópico de las afecciones de piel, pelo y uña, los dermatofitos se presentan como filamentos hialinos, ramificados y tabicados, a veces divididos en artroconidios (Prats, 2007; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014).

En la invasión de los pelos, inicialmente todos los dermatofitos parasitan el interior del tallo piloso y forman filamentos ramificados, por lo tanto, en este primer período de invasión todas las especies se presentan en forma idéntica. Después se dividen en artroconidios que forman una disposición característica en las infecciones por

Microsporum y *Trichophyton*. *E. floccosum* no ataca la porción pilosa. *Microsporum* es visualizado microscópicamente como una vaina de pequeñas esporas que rodea el tallo de pelo, dispuestas en forma de mosaico. *Trichophyton* se presenta como cadenas de esporas que se ubican dentro (endothrix) o por fuera (ectothrix) del tallo del pelo, en este último caso, según el tamaño de las esporas, se dividen en ectothrix microides (pequeños) y ectothrix megasporos (grandes) (Caballero Martinez y cols., 2005; Prats, 2007; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014).

La realización de cultivos en medios habituales, posibilita la diferenciación en género y especie de los hongos dermatofitos. Los métodos de identificación de acuerdo con sus características fenotípicas, son los más utilizados en la práctica asistencial. Son hongos hialinos que forman colonias en general de colores claros, con gamas de color restringidas a tonos blanquecinos, amarillentos y marronáceos. Si bien la coloración de las colonias y su textura pueden ayudar a identificar estas especies, las características microscópicas son las que determinan generalmente su identificación; en ocasiones es necesario agregar pruebas complementarias como el estudio de características nutricionales o el estudio enzimático. La prueba de perforación del pelo *in vitro*, se emplea para la diferenciación entre especies como *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* (Medvedeff y cols., 2003; Caballero Martinez y cols., 2005; Prats, 2007; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014).

Los dermatofitos pueden diferenciarse por las características morfológicas en los cultivos (Velasco Pastor y cols., 2006; Arenas, 2014; Manzano Gayosso, 2015). En la tabla N° 2 se pueden observar principales características macroscópicas y microscópicas de las especies más comunes.

Tabla Nº 2. Característica de los cultivos de los dermatofitos más frecuentes

Características de las colonias				Características microscópicas		
Especie	Crecimiento	Anverso	Reverso	Hifas	Macroconidias	Microconidias
<i>M. canis</i>	Moderado (7-15 días)	Velosa/Plana Blanco amarillento	Anaranjado	En raqueta Clamidosporas	Abundantes, fusiformes, extremo ahusado, paredes gruesas, rugosas, 6 o más septos	Ocasionales, redondeadas, sésiles
<i>N. gypsea</i>	Moderado	Pulverulenta/Plana Beige/ Canela	Marrón		Abundantes, fusiformes, paredes más bien delgadas y rugosas, 2-6 septos	Ocasionales
<i>T. mentagrophytes</i>	Moderado	Pulverulenta/Plana/Centro acuminado/Blanco /crema	En ocasiones pardo	En raqueta Espirales	Escasos, fusiformes, alargados, paredes delgadas y lisas, 2-4 septos	Abundantes, en racimos, globosos
<i>T. interdigitale</i>	Moderado	Velosa/Plana/Centro granuloso/ Blanco/crema	En pocas ocasiones pigmenta	Abundantes espirales	Escasos, fusiformes, alargados, paredes delgadas y lisas, 2-4 septos	Abundantes, en racimos, globosos
<i>T. rubrum</i>	Moderado	Velosa/Plana Blanco	Rojo vinoso	Pectinadas Clamidosporas	Ocasionales, largos, forma de lápiz, paredes delgadas y lisas	Piriformes a los lados de las hifas
<i>T. tonsurans</i>	Moderado	Pulverulenta/Cerebriforme/ Plegada/ Blanco grisácea	Café rojizo	Clamidosporas Artrosporas	Escasos, forma de cigarro, en ocasiones deformes, paredes delgadas y lisas	Piriformes o globosos
<i>E. floccosum</i>	Moderado	Finamente velosa/Plegada Blanco amarillento	Amarillo/ Marrón	En raqueta Clamidosporas	En clava, lisas, aisladas o en racimo, 2-3 septos	Ausentes
<i>T. verrucosum</i>	Lento (10-15 días)	Glabra/Plegado Blanco grisáceo	No presenta pigmentos	Clamidosporas en cadena	En "cola de rata"	Piriformes
<i>M. audouinii</i>	Moderado	Gris/ Aterciopelada/Plana "Piel de ratón"	Café rojizo	Pectinadas Clamidosporas	En huso, extremos afilados, pared gruesa, 6 o más septos	Poco frecuente
<i>T. violaceum</i>	Lento	Glabra/Cerebriforme Púrpura o crema	Púrpura en ocasiones	Candelabros fávicos	Poco frecuente	Poco frecuente

3.4 Epidemiología

La incidencia de las dermatofitosis es alta a nivel mundial, afecta ambos sexos y a todas las edades. En la actualidad, se describen aproximadamente unas cuarenta especies, las cuales no se suelen aislar con la misma frecuencia en todos los laboratorios, ya que existe una clara variabilidad climática, geográfica, socioeconómica etc., que origina cambios en los patrones de distribución de los agentes etiológicos de las dermatofitosis. Si bien la distribución de la dermatofitosis es universal, predominan en las zonas tropicales con climas cálidos y húmedos, existiendo diferencias en cuanto a la distribución geográfica de las distintas especies de dermatofitos. Las migraciones y la mayor posibilidad de viajar han permitido el traslado de algunas de estas especies de su zona endémica hacia otras regiones (Prats, 2007; Sanchez Saldaña y cols., 2009).

Afecta ambos sexos, pero en la edad adulta predominan en los varones. La tiña de cuero cabelludo es más frecuente en los niños y en personas de raza negra. En las últimas décadas, la incidencia de tiña del cuero cabelludo está disminuyendo, mientras que la tiña de los pies y la onicomicosis son cada vez más frecuentes. Según la OMS, la frecuencia global de las micosis superficiales es muy alta, del 20 al 25 % de la población general, de ellos 5-10 % son por dermatofitos. La diseminación de los dermatofitos se produce por contacto directo con un hospedador infectado, a través de una artrospora o un fragmento de hifa adherido o contenido en un corneocito o, de forma indirecta a través de un objeto contaminado (ej: fómites compartidos como peines, sombreros, limas, alicates, etc). Los seres humanos también pueden contraer la enfermedad de animales infectados: perros, gatos, y otros animales no domésticos (Medvedeff y cols., 2003; Velasco Pastor y cols., 2006; Ausina Ruiz y col., 2006; Prats, 2007; Sanchez Saldaña y cols., 2009).

En efecto, tan sólo diez especies se aíslan con una frecuencia elevada en la mayoría de los laboratorios de micología clínica humana, representando el 99 % de los cultivos positivos. De estas especies, *M. canis*, *N. gypsea*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* y *E. floccosum*, pueden llegar a ser las responsables de más del 90 % de los casos. Algunos de estos dermatofitos (ej. *T. mentagrophytes* y *N. gypsea*) son en realidad complejos de especies (“species complex”) que incluyen distintas variedades o incluso grupos de especies (Medvedeff y cols., 2003; Cabañes Saenz, 2007; Prats, 2007).

En nuestra provincia las especies más frecuentes son: *M. canis* causante de más del 90 % de las tiñas de cuero cabelludo en niños; *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*, en lesiones interdigitales y de uñas y, en menor proporción: *T. tonsurans*, *E. floccosum*, y *N. gypsea* (Medvedeff y cols., 2003).

3.5 Factores predisponentes

Diversas circunstancias pueden favorecer estas infecciones: uno de los factores es el clima, ya que en lugares húmedos y tropicales se observa el mayor número de infecciones micóticas. Los malos hábitos higiénicos, el hacinamiento, uso de duchas comunitarias, el uso de zapatos cerrados, las zapatillas, ropa sintética, etc., son otros de los factores que favorecen al desarrollo de una dermatofitosis (Ausina Ruiz y col., 2006; Prats, 2007; Sánchez Saldaña y cols., 2009).

Las dermatofitosis pueden afectar a todas las edades, pero la producción de sebo, los hábitos en la vestimenta y las fluctuaciones en el estado inmunitario condicionan diferencias en las formas clínicas que predominan. Así, en los niños son más frecuentes las tiñas del cuero cabelludo, raras en adultos por la protección que proporciona el sebo, mientras que en los ancianos lo son las onicomicosis. Existen enfermedades que predisponen a la aparición de dermatofitosis como la diabetes, Síndrome de Cushing,

linfomas, pacientes infectados por VIH y pacientes inmunodeprimidos en general, como así también los traumatismos (Medvedeff y cols., 2003; Velasco Pastor y cols., 2006; Prats, 2007).

3.6 Patogénesis

En individuos inmunocompetentes, los dermatofitos no infectan la epidermis indemne, sino que solo afectan la capa córnea y desvitalizada. No tienen capacidad invasora. Los ácidos grasos de cadena larga presentes en el manto lipídico cutáneo confieren una resistencia natural frente a los dermatofitos; esto sucede coincidiendo con la pubertad. Sin embargo; la presencia de un medio adecuado en la piel del huésped (calor y humedad) es un elemento de importancia crítica en el desarrollo de una dermatofitosis y la afinidad de los dermatofitos por la queratina, es la condición básica de su existencia, teniendo afinidad de acuerdo a la especie por diferentes tipos de queratina. Además, por razones desconocidas, hay individuos con mayor predisposición a padecer dermatofitosis que otros (Ausina Ruiz y col., 2006; Sánchez Saldaña y cols., 2009).

La patogénesis de la infección clínica, depende de la producción de enzimas como las queratinasas, elastasas y otras enzimas proteolíticas, como así también el estado inmune del huésped, donde la respuesta inflamatoria que desencadenan es muy variable. Además la pared celular del hongo contiene un factor llamado MANAN el cual bloquea los mecanismos inmunitarios de autodefensa ayudando a la permanencia del hongo en la epidermis. Por otro lado cabe resaltar que ciertos dermatofitos, como *T. rubrum*, son capaces de producir sustancias que inhiben la respuesta inmunitaria (Ausina Ruiz y col., 2006; Cabañes Saenz, 2007; Sánchez Saldaña y cols., 2009).

Una vez que la infección se ha establecido en el estrato córneo, existen factores que determinan el tamaño y duración de la lesión. Esto está determinado por dos elementos:

el índice de desarrollo del hongo y el índice de renovación epidérmica. El índice de desarrollo micótico debe ser igual o exceder al índice de renovación epidérmico, o el microorganismo será eliminado. La respuesta inflamatoria a nivel del borde de la lesión, estimularía un aumento del índice de renovación epidérmica, en un intento de eliminar los microorganismos invasores.

Así, los conidios de los dermatofitos al llegar a la piel, crecen en la capa córnea de manera radiada para formar lesiones anulares con intensa reacción inflamatoria. Esta reacción conduce a la destrucción y eliminación del hongo del área central, aunque el micelio fúngico continúa su crecimiento de manera centrífuga hacia la piel no infectada. Las lesiones se transforman en placas anulares con un centro aclarado y el proceso inflamatorio se distribuye sólo en la periferia, lo que se denomina “borde activo”, constituido por pápulas y/o vesículas (Ausina Ruiz y col., 2006; Cabañes Saenz, 2007; Sanchez Saldaña y cols., 2009; Manzano Gayosso, 2015).

En general, el dermatofito no invade nuevamente el área central. Asimismo, se acepta que en el suero existe un factor sérico antidermatofítico, factor sérico fungistático, sintetizado en el hígado, que contribuye no sólo a frenar la invasión del dermatofito hacia el grosor de la piel, sino que además tiene un efecto protector, sin el cual el individuo estaría constantemente parasitado por los dermatofitos. El sistema de inmunidad humoral, también desempeña un papel en el desarrollo de resistencia adquirida a las infecciones por dermatofitos, encontrándose producción de IgG, IgM, IgA, IgE, precipitinas, hemaglutininas, pero sin implicancia en la respuesta humoral protectora (Ausina Ruiz y col., 2006; Cabañes Saenz, 2007; Sanchez Saldaña y cols., 2009; Manzano Gayosso, 2015).

Por su avidez hacia las estructuras queratinizadas, los dermatofitos tienen poca o nula tendencia a penetrar más profundamente; sin embargo, cuando esto sucede es

precisamente a través del pelo y de los epitelios del folículo piloso, los que así parasitados llegan a romperse dentro de la dermis y provocan una reacción inflamatoria granulomatosa en contra del cuerpo extraño que representan dichas estructuras queratinizadas. Este fenómeno se denomina granuloma dermatofítico o granuloma de Majocchi, el cual se manifiesta clínicamente por pápulas o nódulos que pueden localizarse en cualquier segmento anatómico. Por otro lado, en la infección de cuero cabelludo sin expresión de una reacción inflamatoria granulomatosa, la invasión del micelio fúngico dentro de la vaina externa del pelo, con crecimiento hacia el bulbo del pelo, se detiene en la zona de incompleta queratinización. El pelo se debilita y se rompe, dejando pocos milímetros sobre la superficie del cuero cabelludo. En la dermatofitosis de las uñas, la destrucción de la queratina es por la formación de canales, dentro de los cuales se presentan hifas. Es una manera de evidenciar la capacidad queratolítica de los hongos, causada por enzimas y por fuerzas mecánicas (Cabañes Saenz, 2007; Manzano Gayosso, 2015).

3.7 Manifestaciones clínicas

Tradicionalmente, las infecciones causadas por los dermatofitos han sido llamadas de acuerdo al sitio anatómico involucrado precedido por la palabra *Tinea*, a saber: *Tinea barbae*, *Tinea capitis*, *Tinea corporis*, *Tinea cruris*, *Tinea manuum*, *Tinea pedis*, *Tinea unguium* y *Tinea incógnita* (Velasco Pastor y cols., 2006; Ausina Ruiz y cols., 2006, Bonifaz, 2012; Arenas, 2014).

Tinea barbae: la tiña de la barba o sicosis micótica afecta al pelo facial terminal de los varones (barba y bigote). Los agentes etiológicos más frecuentes son *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. verrucosum* y *M. canis*. Puede producir dos tipos de lesión: a- Placa descamante marginada, con bordes vesiculosos, la reacción del huésped no es severa, el centro de la lesión en algunos casos no es alopecica. *T. rubrum* generalmente

es la especie más aislada. b- Folliculitis severa, pustulosa (análoga al querión de Celso del cuero cabelludo), se producen abscesos con secreción de material purulento, que ocasiona la caída de los pelos atacados en la raíz. Raramente toda la zona de la barba está comprometida, formándose zonas de induración, verrucosas, con adenopatías regionales. Los agentes etiológicos son dermatofitos zoofílicos, como: *T. mentagrophytes* y *T. verrucosum*, aislado del ganado vacuno (Velasco Pastor y cols., 2006; Ausina Ruiz y cols., 2006; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014).

Tinea capitis: es el resultado de la invasión de los pelos del cuero cabelludo por dermatofitos. Los agentes etiológicos más frecuentes son *M. canis* y *T. tonsurans*. Afectan principalmente a niños de 3 a 14 años. Las fuentes de infección pueden ser a través de fómites, del contacto con animales domésticos, como perros y gatos, o poco frecuente del contacto con una persona infectada, se ve favorecida por la mala higiene y el nivel socioeconómico bajo. Se observa invasión difusa del cuero cabelludo, donde la superficie se presenta de color grisáceo y descamación abundante. Produce numerosas placas, de unos pocos milímetros de extensión, donde los pelos sanos se mezclan con los enfermos, estos últimos se encuentran cortados al ras y aparecen en la superficie del cuero cabelludo como puntos negros. El proceso es asintomático, de evolución crónica y no tiende a la autorresolución. Existen portadores asintomáticos que dificultan la erradicación del proceso. Se distinguen dos tipos clínicos: tiñas no inflamatorias o tonsurantes, y tiñas inflamatorias (Velasco Pastor y cols., 2006; Ausina Ruiz y cols., 2006; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014). Las tiñas no inflamatorias pueden ser a su vez, de dos tipos: la tricofítica y la microspórica. Ambas son muy comunes en la edad escolar, se caracterizan por ser muy contagiosas; curan espontáneamente al llegar la pubertad debido a la secreción sebácea. Lesionan el pelo sin afectar el folículo, lo que determina una alopecia reversible. Clínicamente se manifiestan con placas que suelen ser únicas o poco numerosas, todos

los pelos dentro de la zona afectada están comprometidos y se presentan opacos, despulidos y cortados a pocos milímetros de la superficie, se los puede arrancar con facilidad con una pinza de depilar sin provocar dolor. En las tiñas tricofíticas, se producen lesiones descamativas en el cuero cabelludo, con numerosas zonas de cabellos ralos, de pocos milímetros de extensión, donde la parasitación del cabello es endothrix, en el cual las hifas invaden y se fragmentan en el interior del cabello sin destruir la cutícula formando arthroconidios. Se presenta en niños, aunque con menor frecuencia puede observarse en adultos, particularmente en mujeres. Por el contrario en las tiñas microspóricas la parasitación del cabello suele ser ectothrix, donde las hifas no invaden el interior del cabello, sino que se disponen y se fragmentan a su alrededor, debajo de la cutícula que es destruida. El diagnóstico diferencial debe plantearse con la alopecia areata, y la psoriasis. Las tiñas inflamatorias o querión de Celso están ocasionadas, en su mayoría, por especies zoófilas (*M. canis*) o geófilas (*N. gypsea*) que desencadenan una respuesta inflamatoria importante. Se inician como las tiñas tonsurantes, pero en pocas semanas se presentan como lesiones elevadas, de color rojo intenso, hemisféricas, de consistencia blanda, exhiben muchas pústulas foliculares y al ser apretadas, manan pus por múltiples puntos. Los cabellos se encuentran aglutinados por las costras que cubren la lesión y son arrancados fácilmente ya que la propia reacción inflamatoria destruye el pelo. Según el número de folículos afectados puede curar con alopecia cicatrizal. Es frecuente que se acompañe de adenopatías regionales, aunque no suele haber fiebre ni afectación del estado general. El querión es más común en los niños y los agentes más frecuentemente aislados son: *M. canis*, *N. gypsea*, *T. mentagrophytes* y *T. verrucosum* (Velasco Pastor y cols., 2006; Ausina Ruiz y cols., 2006; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014).

Tinea corporis: tiña del cuerpo o de la piel lampiña. Afecta a zonas como hombros, tronco, miembros inferiores y superiores (excepto palma, planta e ingule) Cuando afecta la

cara se denomina *Tinea faciei*. Se transmite directamente o a través de fómites, desde animales y personas infectadas, o por autoinoculación desde otras localizaciones. Los niños suelen infectarse por *M. canis* al contactar con perros o gatos. Las lesiones generalmente son placas que crecen en dirección centrífuga, de bordes bien limitados, elevados y a menudo escamosos, vesiculosos y/o pustulosos, en tanto que la zona central presenta un color ligeramente pardo y se cubre de escamas muy finas. Este borde más activo que contrasta con la zona central menos activa, le confiere un aspecto anular muy característico. El prurito es un síntoma común. Y en pacientes diabéticos e inmunodeprimidos, las lesiones pueden ser desproporcionadamente extensas.

Hay una forma especial denominada granuloma de Majocchi, causada mayoritariamente por *T. rubrum*, en la que las lesiones son más profundas y a menudo granulomatosas. Se manifiesta con pápulas violáceas agrupadas en placas irregulares que pueden dejar cicatrices residuales al curar. Las especies más frecuentemente aisladas son: *M. canis*, *T. rubrum*, *T. tonsurans* y *E. floccosum* (Velasco Pastor y cols., 2006; Ausina Ruiz y cols., 2006; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014).

Tinea cruris: es una dermatofitosis del área crural (ingle, zonas perianal y perineal y parte superior de muslos). Es más frecuente en épocas calurosas y húmedas del año, sobre todo en varones jóvenes que practican deportes, sudan profusamente, llevan ropas ajustadas y/o son obesos. Los agentes etiológicos más frecuentes son: *T. rubrum*, *T. interdigitale* y *E. floccosum*. Este último produce placas eritemato-vesiculoso-escamosas que ataca la cara interna del muslo, su borde periférico es continuo, ligeramente elevado por micropápulas con vesículas en su vértice y es bien eritematoso. La parte central de la placa es pardo clara y ligeramente escamosa. La lesión es pruriginosa y progresa rápidamente. Las lesiones producidas por *T. rubrum* y *T. interdigitale* son inicialmente muy parecidas a las anteriores, pero con el tiempo abarcan una extensión mucho mayor,

pueden llegar hasta la parte media del muslo, comprometen las nalgas y la región suprapúbica; el borde es discontinuo, exhibiendo ramilletes de vesículas que asientan sobre una piel eritematosa y que están separados entre sí por puentes de piel sana. Estas dermatosis tienden a hacerse crónica y, a medida que pasa el tiempo, los síntomas subjetivos, como el prurito, se atenúan. Suelen acompañarse además, de tiña pedis crónica y con frecuencia de onicomicosis distal subungueal.

En los pacientes inmunocomprometidos, en particular los pacientes VIH positivos, la *Tinea cruris* tiene un aspecto atípico. La totalidad de las placas se cubre de escamas gruesas y presenta un color pardo claro, el prurito es escaso y su extensión es mayor (Velasco Pastor y cols., 2006; Ausina Ruiz y cols., 2006; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014).

Tinea pedis: también conocida como “pie de atleta”, es la tiña más frecuente en la actualidad y sus agentes causales más frecuentes son: *T. rubrum*, *E. floccosum* y *T. interdigitale*., afectando la planta del pie, bordes laterales, dorso y espacios interdigitales. Afecta fundamentalmente a adultos jóvenes deportistas, son muy raras en la infancia, predomina en verano y se ha relacionado con el uso prolongado de calzados deportivos oclusivos y con el hecho de caminar descalzos por vestuarios públicos. La manifestación clínica más común es la de intertrigo entre el 4º y 5º dedo del pie con maceración, fisuras y prurito. A veces se extiende a otros espacios interdigitales y llega a comprometer el pliegue digitoplantar. Es habitual que la afectación sea bilateral, aunque también pueden comprometer una sola de las plantas y cuando afectan a las manos habitualmente sólo atacan a una de ellas (síndrome de dos pies y una mano). Cuando la dermatofitosis plantar se vuelve crónica, se torna menos pruriginosa, desaparecen casi todas las vesículas y las zonas de la piel afectadas se cubren de escamas gruesas. Pueden presentarse en tres formas clínicas: la intertriginosa, la hiperqueratósica y la vesiculo-

ampollar (Velasco Pastor y cols., 2006; Ausina Ruiz y cols., 2006; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014).

La tiña del pie intertriginosa es un proceso crónico que se caracteriza por descamación, maceración y eritema interdigital, con fisuración frecuente del fondo del pliegue. Esta forma puede ser una puerta de entrada para infecciones estreptocócicas que ocasionan celulitis y linfangitis de repetición en la extremidad correspondiente. El agente causal habitual de este proceso es *T. rubrum* y con frecuencia se acompaña de onicomycosis. Generalmente estas lesiones se observan en adultos y ancianos. Las dermatofitosis plantares de evolución aguda o subaguda pueden manifestarse con lesiones vesiculo-ampollares sobre una base inflamatoria, que en general solo afectan al arco plantar y las zonas laterales de un pie. Puede confundirse con eccema dishidrótico, eccema de contacto alérgico, psoriasis y dermatitis plantar juvenil (Velasco Pastor y cols., 2006; Ausina Ruiz y cols., 2006; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014).

Tinea manuum: están afectadas las áreas palmar e interdigital de la mano, que frecuentemente se presenta como una hiperqueratosis unilateral difusa.

Clínicamente se manifiesta con una dermatitis descamativa crónica difusa, con algunas vesículas, que pueden confundirse con un eccema o una psoriasis. Usualmente es causada por miembros del género *Trichophyton* (Velasco Pastor y cols., 2006; Ausina Ruiz y cols., 2006; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014).

Tinea unguium: este término se emplea solamente para las infecciones de uñas causadas por dermatofitos. Lo más frecuente es la afectación de la uña de los primeros dedos de los pies. Los principales factores de riesgo son: sexo masculino, edad avanzada, dermatofitosis en otra localización (sobre todo en manos y pies), tabaquismo y enfermedad arterial periférica. En ambientes calurosos y húmedos, el lecho ungueal puede convertirse en un reservorio difícil de erradicar, que motiva infecciones recurrentes

en otras localizaciones. Se la clasifica en cuatro formas clínicas: a- Onicomycosis subungueal distal lateral, b- Onicomycosis blanco superficial, c- Onicomycosis subungueal proximal, d- Distrofia total. Generalmente producidas por *T. rubrum* y en menor proporción por *T. interdigitale* (Velasco Pastor y cols., 2006; Ausina Ruiz y cols., 2006; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014).

Tinea incógnita: o también denominada tiña ignota, afección que resulta del tratamiento de una tiña, habitualmente de piel lampiña y en especial de la cara, de forma inadecuada con cremas con glucocorticoides o preparados tópicos polivalentes. Con éstos se alivia el prurito y se enmascara la morfología habitual de la enfermedad, dificultando el diagnóstico. El aspecto clínico de las lesiones, depende principalmente de la respuesta inflamatoria de la piel afectada. Los agentes aislados más frecuentemente son: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *M. canis* y *E. floccosum* (Velasco Pastor y cols., 2006; Ausina Ruiz y cols., 2006; Bonifaz, 2012; Arenas, 2014).

3.8 Diagnóstico micológico de las dermatofitosis

Para el diagnóstico correcto de las dermatofitosis es necesario tomar la muestra clínica, transportarla y procesarla correctamente; utilizar medios de cultivos adecuados y disponer de personal experimentado en la interpretación de los resultados (Medvedeff y cols., 2003; Cuétara, 2007).

El diagnóstico micológico de laboratorio se realiza empleando los siguientes procedimientos micológicos:

- Toma de la muestra clínica: debe realizarse antes de que se instaure cualquier tratamiento. Las muestras de piel, pelos o uñas se obtendrán después de una desinfección de la zona afectada con etanol de 70°. Estas se obtienen por raspado de la piel y de las uñas, y si es posible, también pueden cortarse pequeños fragmentos de las

uñas afectadas. Los cabellos enfermos, rotos y de aspecto frágil, han de arrancarse con pinzas estériles. Todo este material se recoge en Placas de Petri estériles, que pueden conservarse a temperatura ambiente. En las tiñas inflamatorias supuradas (querión) debe tomarse la muestra del pus, que se recogerá, con jeringa, y o bien con un escobillón que incorpore un medio de transporte tipo Stuart; también deben recogerse cabellos si están afectados (Medvedeff y cols., 2003; Prats, 2007).

- Examen microscópico directo: posee un gran valor para el diagnóstico presuntivo de las micosis causadas por este tipo de hongos, ya que nos permite evaluar la calidad de la muestra y orientarnos sobre la presencia de elementos fúngicos sin esperar al cultivo. Este examen implica la observación microscópica del material obtenido de la lesión clínica (escamas de piel, uñas o pelos). Las escamas del raspado cutáneo se transfieren desde el contenedor a un portaobjetos, en el que previamente se ha depositado una gota de hidróxido de potasio (10 % o 20 %), el cual disgrega las células queratinizadas y facilita la observación de estructuras tubulares hialinas, largas y septadas, en ocasiones formando artroconidios. Estas preparaciones pueden contrastarse, añadiendo azul de lactofenol, que tiñe las estructuras fúngicas. Los cabellos pueden observarse directamente entre cubre y portaobjetos, para detectar la invasión de éstos: parasitación ectothrix con la presencia de micelio y artroconidios rodeando al pelo; y parasitación endothrix dentro de la corteza del pelo (Medvedeff y cols., 2003; Prats, 2007; Sanchez Saldaña y cols., 2009; Manzano Gayosso, 2015).

- Cultivo de la muestra clínica: las muestras deben cultivarse en medios apropiados para el crecimiento de estos hongos, para ello se emplean distintos medios de cultivo, selectivos para el aislamiento de hongos dermatofitos, identificando las especies más frecuentes, luego se incuban en un ambiente a temperatura de 28 °C, durante 10-15 días. Los dermatofitos son hongos hialinos que forman colonias que presentan en general

colores claros, con gamas de color restringidas a tonos blanquecinos, amarillentos y marronáceos. Si bien la coloración de las colonias y su textura ayudan a identificar estas especies, las características microscópicas son las que determinan su identificación en la mayoría de los casos.

- Identificación de los aislamientos: el diagnóstico definitivo de dermatofitosis se apoya, en la práctica diaria, en las características fenotípicas del microorganismo (Medvedeff y cols., 2003; Cabañes Saenz, 2007; Prats, 2007; Sanchez Saldaña y cols., 2009; Manzano Gayosso, 2015). Existen diferentes estructuras microscópicas a tener en cuenta para la identificación de estos hongos (clamidosporas, distintos tipos de hifas, etc.). No obstante, la forma y distribución de macroconidios y microconidios es fundamental a la hora de definir los géneros y especies. Por este motivo, se suele utilizar una clave de identificación, de los dermatofitos más frecuentemente aislados, para que al caracterizar las estructuras de la cepa que se obtuvieron del cultivo, pueda ser identificado el hongo causal de la infección. Para determinar la presencia de estas estructuras a partir del cultivo, se realiza una preparación entre portaobjetos y cubreobjetos con un pequeño fragmento de una de las colonias con el fin de observarlas al microscopio. Se aconsejan líquidos de montaje tipo lactofenol de Amman, lactofenol azul de algodón o lactofucsina. En algunos casos, especialmente en el primocultivo y en caso de utilizar medios de cultivo para dermatofitos, es difícil observar la formación de estos conidios. O bien no presentan la forma característica, o simplemente no se han formado. En este caso se deberá realizar paralelamente un subcultivo en un medio carente de inhibidores agar Sabouraud dextrosa (SDA), agar papa dextrosa (APD), y/o un microcultivo con el fin de observar más adecuadamente la conidiogénesis, en medios tales como agar harina de avena (AHA) o agar lactrimel (Medvedeff y cols., 2003; Cabañes Saenz, 2007). Cuando existen dificultades en la identificación de estos hongos

utilizando sus características morfológicas, ya sea por semejanza entre las especies o por falta de estructuras útiles para su identificación, se suelen utilizar otros caracteres distintos a los morfológicos, haciendo uso de técnicas que incluyen ensayos nutricionales, estudios enzimáticos y ensayo de perforación del pelo *in vitro* (Medvedeff y cols., 2005; Cabañes Saenz, 2007). Los métodos fenotípicos para la identificación de microorganismos, no son suficientes para una correcta clasificación taxonómica; es necesario el empleo de técnicas de biología molecular y espectrofotometría de masas para la identificación certera a nivel de especie; así como para la obtención de información importante como relaciones filogenéticas y estudios epidemiológicos, entre otros (Tartabini y cols., 2013; Mohammadi y cols., 2015; Maldonado y cols., 2017).

3.9 Tratamiento antifúngico (ATF) de las dermatofitosis

La elección del tratamiento ATF puede presentar variaciones a la hora de escoger un fármaco sobre otro dependiendo del agente causal, la zona afectada, patologías concomitantes, fármacos asociados o incluso disponibilidad del fármaco (Sánchez Carazo y cols., 1999).

La terapia antifúngica de las dermatofitosis, puede ser tópica, sistémica o una combinación de ambas dependiendo de la localización, extensión y severidad de las lesiones, la edad del paciente y la especie de dermatofito involucrada en la infección (Fernández Torres, 2005; Hay, 2018). Su utilización debe estar indicada, valorando los beneficios, frente a los posibles efectos secundarios. La terapia tópica suele ser suficiente para lesiones localizadas y en escaso número (derivados imidazólicos, terbinafina, ciclopiroxolamina, amorolfina, etc) (Bonifaz, 2012). Si las mismas, no responden a la medicación local, son extensas, hiperqueratósicas, inflamatorias o con foliculitis, así como en los casos de micosis del cuero cabelludo o en los casos de onicomicosis; resulta más

efectivo la aplicación de un tratamiento sistémico (griseofulvina, fluconazol, itraconazol, terbinafina) (Conti Díaz, 2006; Molina de Diego, 2011).

A partir de 1970, con los derivados azólicos y las alilaminas, los tratamientos para las micosis de piel lampiña pasaron a ser efectivos, pero la onicomicosis continúa siendo un problema.

El tratamiento de las micosis en general es largo y tedioso, pero el de las onicomicosis en particular constituye un reto terapéutico complejo determinado por las características anatómicas del substrato ungueal. Según el área o masa ungueal afectada, el tratamiento puede tener un resultado variable puesto que la respuesta terapéutica va a ser diferente, la curación micológica no va ligada necesariamente a la curación clínica. Ello implica que en el diseño de un tratamiento actualizado de las onicomicosis deba considerarse varios factores (Llambrich y cols., 2002). A pesar de que se dispone de diversas drogas específicas para el tratamiento de las onicomicosis, algunas de ellas son poco eficaces para lograr la eliminación completa de la infección con la aparición de recidivas, lo que trae como consecuencia un alto costo y el abandono del tratamiento por parte del paciente (Medvedeff y cols., 2003).

La onicomicosis, requiere generalmente una combinación de terapia tópica y sistémica. Su tratamiento es complejo y demanda, el profundo conocimiento de las características clínicas, una adecuada interpretación de los resultados de los exámenes micológicos de laboratorio, tener en cuenta las interacciones medicamentosas, así como los efectos tóxicos y contraindicaciones de los medicamentos empleados en su tratamiento. La ausencia frecuente de estas condiciones ha creado, para las onicomicosis, una fama inmerecida de enfermedades incurables o que requieren tratamientos prolongados, costosos y con numerosos efectos colaterales (Negroni, 2008).

4. Clasificación de antifúngicos de acuerdo al grupo químico al que pertenecen

Azoles: constituyen un grupo de compuestos sintéticos formados por anillos heteropentacíclicos con átomos de nitrógeno unidos, a su vez, mediante átomos de hidrógeno a otros anillos aromáticos. Inhiben la actividad de la enzima 14- α -desmetilasa bloqueando la desmetilación de lanosterol a ergosterol, componente principal de la membrana celular de los hongos. Como consecuencia de ello, se altera la membrana celular y se acumulan compuestos no desmetilados que inhiben el crecimiento fúngico.

Los azoles tienen un anillo con átomos de N libres unidos mediante enlace C-N a otros anillos aromáticos. La naturaleza de estos anillos modifica las propiedades fisicoquímicas, efecto terapéutico, toxicidad etc. En función del número de N que posee el anillo se dividen en imidazoles (2N) y triazoles (3N) (Allevato y cols., 2007; Córdoba y cols., 2016).

La incidencia de efectos adversos de este grupo es escasa, con mayor frecuencia ocurren molestias gastrointestinales: náuseas, vómitos, dolor, distensión abdominal y diarrea; cefalea y exantema. La incidencia de aumento de transaminasas y de bilirrubina es del 1 a 2 %. Se recomienda no utilizar este grupo de fármacos en el embarazo y en la lactancia (Allevato y cols., 2007).

El uso de los imidazoles se limita sólo al tratamiento de las micosis superficiales.

Dentro de este grupo, los utilizados para el tratamiento de la dermatofitosis son: clotrimazol, miconazol, ketoconazol, sertaconazol, bifonazol, entre otros. Los triazoles son moléculas de amplio espectro de acción; son menos tóxicas y más estables metabólicamente que los imidazoles. Están indicadas en el tratamiento de las micosis tanto superficiales como sistémicas. Los representantes este grupo que suelen ser

utilizados en el tratamiento de las dermatofitosis son principalmente el itraconazol, y en menor medida el fluconazol (Velasco Pastor y cols., 2006; Allevato y cols., 2007).

- **Alilaminas:** son compuestos altamente lipofílicos que alcanzan concentraciones terapéuticas en tejido adiposo, uñas y piel, por lo que están indicados principalmente en el tratamiento de las dermatofitosis. Son compuestos con baja toxicidad. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la actividad de la enzima escualeno-epoxidasa, impidiendo la síntesis del lanosterol. Como resultado de ello, el escualeno acumulado en la célula fúngica provoca la muerte celular. Los principales representantes de este grupo son la terbinafina y la naftifina, las cuales presentan buena actividad *in vitro* frente a dermatofitos (Elewski, 1998; Velasco Pastor y cols., 2006; Allevato y cols., 2007).

- **Derivados de morfolina:** estos compuestos tienen actividad fungistática y fungicida. Actúan bloqueando la producción del ergosterol e inhibiendo la enzima 14-alfa-reductasa y la 7-delta-8-isomerasa. El principal representante de este grupo es la amorolfina. Este ATF tópico es de amplio espectro y tiene buena actividad frente a dermatofitos (Fernández Torres, 2005; Velasco Pastor y cols., 2006)

- **Griseofulvina:** detiene el crecimiento de la célula en la fase de mitosis. La griseofulvina ha sido la droga de primera línea para el tratamiento de las dermatofitosis durante muchos años. Sin embargo, comparado con el itraconazol y la terbinafina, es menos eficaz (Allevato y cols., 2007). Sigue siendo el tratamiento de elección para la tiña microspórica.

- **Ciclopiroxolamina:** es una hidroxipiridina. Actúa interfiriendo en la síntesis de la membrana celular fúngica e inhibe su actividad respiratoria. Es un ATF tópico indicado en el tratamiento de las dermatofitosis de piel y uñas (Velasco Pastor y cols., 2006).

5. Resistencia a los antifúngicos

La resistencia de los hongos a los ATF se presenta cada vez con mayor frecuencia. Existen numerosos casos de mala respuesta, que podrían ser debidos a varios factores. Durante muchos años, los compuestos antimicóticos fueron escasos y poco efectivos. A partir de 1970, para tratar las dermatofitosis se contaban con griseofulvina y nistatina, muy efectivos para las afecciones de piel lampiña, no así para el tratamiento de las onicomycosis.

Con el advenimiento de los azoles tópicos como el miconazol y clotrimazol, y posteriormente los azoles sistémicos como ketoconazol, itraconazol, fluconazol y voriconazol, el tratamiento de las micosis superficiales y sistémicas se simplificó, mejorando las expectativas de curación en estas infecciones. Sin embargo, con la pandemia del sida, así como el uso indiscriminado de drogas esteroides, cirugías y trasplantes, muchos investigadores notaron casos de fallas en la terapéutica antimicótica a diversos compuestos (Allevato y cols., 2007; Méndez Tovar y cols., 2007; Manzano Gayosso y cols., 2008).

Los casos de mala respuesta pueden ser atribuibles a la deficiencia inmunológica del paciente, a la baja biodisponibilidad de los antimicóticos, alteraciones en el metabolismo de los ATF (como el síndrome de malabsorción), interacciones medicamentosas y resistencia antifúngica primaria y secundaria, y esto obliga a repetir el tratamiento, prolongar el tiempo de administración o cambiar de fármacos y, aun así, en ocasiones, la respuesta es deficiente con un aumento considerable en el coste del tratamiento. Así, desde el comportamiento clínico, surge la sospecha de que la resistencia (primaria o secundaria) a los ATF, se da principalmente en quienes reciben estos medicamentos como profilaxis (en casos de trasplantes, sida, enfermedades autoinmunes

tratadas con corticosteroides) o tratamientos repetidos por micosis recidivantes (Allevato y cols., 2007; Méndez Tovar y cols., 2007; Manzano Gayosso y cols., 2008).

Se han realizado estudios para determinar la sensibilidad de los dermatofitos a los azoles, los que demostraron una resistencia en alrededor de un 20 % de las cepas estudiadas. Aunque la comunicación de casos con mala respuesta terapéutica va en aumento se han realizado pocos estudios de sensibilidad a nivel mundial (Méndez-Tovar y cols., 2007). Los resultados de los distintos estudios realizados varían dependiendo de la especie estudiada (Serrano Martino y cols., 2003). Son pocos los estudios de sensibilidad publicados a nivel mundial y los resultados.

6. Pruebas de sensibilidad a los antifúngicos comerciales

Estas pruebas de sensibilidad tienen por objetivo conocer si los microorganismos ensayados son sensibles o resistentes a los ATF. Las condiciones de realización de estas pruebas son diferentes a lo que ocurre en el organismo humano, sin embargo, cuando los resultados se interpretan correctamente, son de utilidad para el uso clínico. Los resultados obtenidos pueden influir en la elección de un tratamiento empírico, pues el conocimiento del perfil de sensibilidad de las cepas autóctonas es información útil para elegir el tratamiento más adecuado. Además permiten conocer y vigilar la epidemiología de la resistencia de las especies circulantes en la región, datos importantes en la política de control de la infección fúngicas. Asimismo, son pruebas cruciales para el descubrimiento y desarrollo de nuevos antimicrobianos (Córdoba S. y cols., 2016).

Los procedimientos generales para determinar la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos son:

- Dilución en caldo: se diluye el antimicrobiano en una serie de tubos que contienen un caldo apropiado para el crecimiento del microorganismo que se va a ensayar. Se inocula el microorganismo, se incuba a una temperatura adecuada y se determina la concentración del antimicrobiano que produce la inhibición del crecimiento del microorganismo.

- Dilución en agar: se diluye el antimicrobiano en un medio de cultivo apropiado y solidificado con agar. Se inoculan los microorganismos en la superficie del medio. Se incuba a una temperatura adecuada y se determina la concentración del antimicrobiano que produce la inhibición del crecimiento.

- Difusión en agar con disco: se inocula el microorganismo en la superficie del agar. Se deposita un disco con una concentración conocida de antimicrobiano. Se incuba a una temperatura adecuada. Se produce una zona de inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor del disco. Dependiendo del tamaño de la zona, se puede determinar si el microorganismo es sensible, intermedio, o resistente al antimicrobiano (Córdoba S. y cols., 2016).

Los métodos de difusión en agar son cualitativos; con ellos se puede determinar si el microorganismo es sensible, intermedio, o resistente al antimicrobiano. Los métodos de dilución en caldo o agar son cuantitativos y permiten determinar la concentración del antimicrobiano que produce la inhibición del crecimiento del microorganismo (CIM).

En el caso del estudio de la sensibilidad a los antifúngicos, existen métodos estandarizados, tanto para hongos levaduriformes como para hongos filamentosos. Para la realización de pruebas de sensibilidad de hongos filamentosos se cuentan con los siguientes documentos estandarizados: documento EDef. 9. 3.1 del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) y el documento M38, 3rd ed. del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), este último incluye a los dermatofitos.

7. Antifúngicos de origen natural

El rol creciente de los hongos en las infecciones humanas, unido al aumento clínico y microbiológico de resistencia a los antimicóticos, ha estimulado el desarrollo de nuevos y diversos compuestos con mayor espectro de acción antifúngica y menor toxicidad que las actuales moléculas, y encuentran muy buena acogida los productos de origen natural debido a la extensa fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica (Thomson y cols., 2011).

Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado las plantas como fuente para la elaboración de medicamentos, ya sea en fármacos o en las preparaciones tradicionales, con la finalidad de controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, vencer los problemas de resistencia de los microorganismos y los efectos colaterales que poseen los antimicrobianos. Por lo tanto, el desarrollo de medicamentos nuevos, eficientes y de bajo costo es de gran importancia.

Mediante técnicas microbiológicas se ha demostrado una amplia gama de productos y extractos de plantas superiores con actividad contra algunos microorganismos asociados a enfermedades infecciosas (Rangell, 2001; Oliveira Penteado y cols., 2016).

I. paraguariensis, descrita como una nueva especie en el año 1822, por Auguste C. De Saint Hilaire, es una planta que crece fundamentalmente en el noreste de Argentina, Sur de Brasil y Este de Paraguay, países donde actualmente es cultivada.

Los requerimientos ecológicos de esta especie, incluyen una precipitación media anual no inferior a 1.200 mm, un área de distribución silvestre sin déficit hídrico y temperatura media anual de 21 a 22 °C (Giberti, 1992). En nuestro país se cultiva únicamente en dos provincias: Misiones y noreste de Corrientes, debido a las condiciones agroecológicas necesarias para su desarrollo (Cogoi, 2016).

En Misiones los productores de yerba mate se encuentran distribuidos en los 17 departamentos de la provincia, observándose una mayor concentración en los de la región centro. En Corrientes los productores se localizan en los departamentos de Ituzaingó y Santo Tomé. Figura N° 1.

I. paraguariensis es un arbusto perenne de la familia *Aquifoliaceae*. Se procesan las hojas y tallos para obtener la “yerba mate”, la que es consumida como una infusión muy popular en estas regiones. Si bien se la ha cultivado y consumido por siglos en América del Sur, su popularidad ha aumentado a nivel mundial debido a la demanda por bebidas saludables, alimentos más naturales y por los potenciales beneficios para la salud de la yerba mate (antioxidante, antimicrobiano, acción contra la obesidad y diabetes, digestivo, estimulante) (Burriss y cols., 2011).

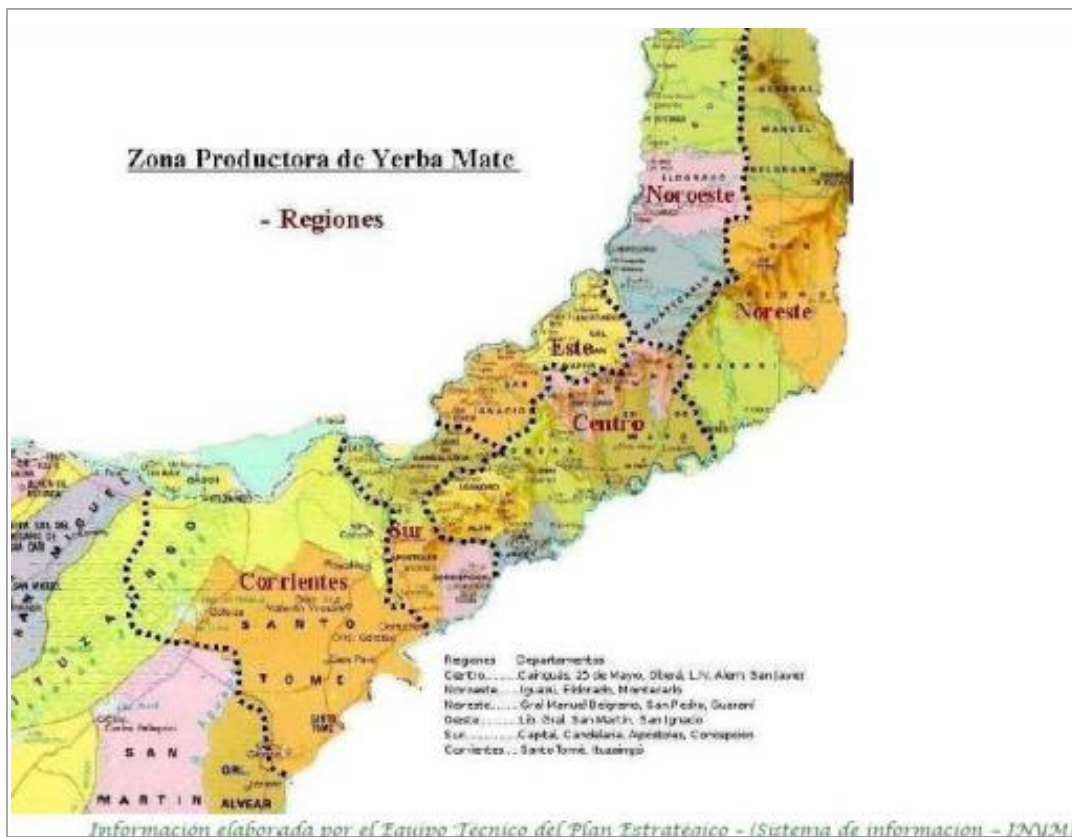


Figura N° 1. Zona productora de YM. Secretaría de Agroindustria. Ministerio de Producción y trabajo. Argentina.

Hay estudios que indican que los extractos acuosos de hojas de *I. paraguariensis* presentan actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y otras bacterias (Schapovaloff y cols., 2009; Oliviera Penteado y cols., 2016) y sobre hongos filamentosos como el *Fusarium* (Medvedeff y cols., 2013). Su composición química ha sido y continúa siendo motivo de estudio, debido al interés en las propiedades farmacológicas de los compuestos que posee. Sus importantes actividades biológicas han sido atribuidas principalmente a compuestos fenólicos. Se ha probado la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos y metanólicos con altos contenidos de compuestos fenólicos (193.9 g GAE / y 173.0 g GAE / kg) (Prado Martin y cols., 2013). Se han identificado componentes tales como: linalool, α -ionona, β -ionona, α -terpineol, ácido octanoico, geraniol, 1-octanol, nerolidol, geranilactetona, y eugenol que han demostrado ser activos frente a un amplio espectro de bacterias gram-positivas y gram-negativas. Investigaciones recientes han ampliado el espectro de uso de la yerba mate como agente antimicrobiano, protección de cultivos y acción contra patógenos transmitidos por alimentos (Burriss y cols., 2011; Prado Martin y cols., 2013; Cogoi, 2016).

La fructificación de *I. paraguariensis* comienza en el mes de diciembre. Los frutos inmaduros son de color verde y al madurar cambian al rojo oscuro.

En la industria yerbatera, los frutos de *I. paraguariensis* constituyen un residuo que hasta la actualidad no representa valor comercial. Se encuentran presentes en la cosecha y posterior procesamiento del material vegetal, pero son separados a fin de que el producto comercial cumpla con las especificaciones del Código Alimentario Argentino (máximo 0,5 % de semillas y drupas) (Cogoi, 2016).

Existen estudios realizados, que sugieren el valor potencial de los frutos de la *I. paraguariensis* como fibra y valiosa fuente mineral. También podrían ser una fuente de compuestos bioactivos como metilxantinas y polifenoles. Su utilización podría ser rentable

y al mismo tiempo ayudar a minimizar los problemas de eliminación de en la industria yerbatera. Se sugiere además el valor potencial de los frutos de *I. paraguariensis* para el desarrollo de nuevos productos en las industrias alimentaria y farmacéutica (Cogoi, 2013).

Numerosas publicaciones dan cuenta acerca de las propiedades biomédicas y farmacológicas de los derivados de *I. paraguariensis*. La posibilidad de su utilización como un antimicrobiano natural es un concepto que ha sido estudiado, pero no aún en profundidad. Sobre sus frutos, existen muy pocos estudios científicos realizados en cuanto a sus propiedades fitoquímicas y/o farmacológicas; y prácticamente nulos sobre la capacidad antimicrobiana de los mismos.

8. Métodos de extracción y caracterización de extractos vegetales

El proceso para obtener extractos vegetales es variable, todos estos componentes se obtienen en conjunto cuando se extraen de los diferentes órganos tanto vegetativos como reproductivos, previamente triturados con un tamaño de partícula determinado y en contacto con cantidad suficiente de solvente. Entre las técnicas de extracción se encuentran las decocciones, infusiones y las tinturas. Las farmacopeas han incluido dentro de sus especificaciones regulaciones con fundamento científico para garantizar la calidad de estos preparados, los cuales no precisan de un control tan exacto como los medicamentos oficiales, pero deben observarse cuidados en cuanto a la limpieza y conservación de las plantas, limpieza de los utensilios usados, además del tiempo y lugar de almacenamiento.

La Farmacopea Argentina (FA) normaliza las drogas sintéticas y naturales usadas con fines medicinales en nuestro país. La definición de “droga vegetal” incluye: “las plantas o sus partes enteras, molidas o pulverizadas (flores, frutos, semillas, tubérculos,

cortezas, etc.) frescas o secas, así como los jugos, gomas, látex, aceites esenciales o fijos y otros componentes similares, que se emplean puras o mezcladas en la elaboración de medicamentos”. La FA incluye a la YM dentro de las drogas vegetales y define los parámetros de calidad necesarios para ser usada con fines medicinales. Según el tipo de método empleado se pueden obtener altos rendimientos de extracción de los componentes activos y pueden presentar gran versatilidad en la separación de los mismos por técnicas de cromatografías que permiten aislar los componentes principales.

El método de extracción utilizado para la obtención de los extractos analizados varía de acuerdo con el objetivo del estudio. En el caso de la YM, la infusión acuosa se utiliza para emular el consumo de la misma como alimento. El método analítico más utilizado es el HPLC, principalmente con gradiente de elución para optimizar la separación de las diferentes clases de componentes debido a la heterogeneidad en sus características químicas (FA, 1978; Filip y cols., 2001; FA, 2003; Mesa y cols., 2019).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Tipo de diseño

La estrategia metodológica utilizada en el proyecto fue:

- Según el estado de arte: de tipo descriptivo
- Según el grado de control: de tipo experimental
- Según el estudio de la dimensión temporal: de tipo transversal
- Según el momento en que se construyen los datos: de tipo prospectivo
- Según el tipo de tarea que se realiza: de campo
- Según el enfoque metodológico: cuantitativo

2. Universo

Se utilizaron cepas de dermatofitos aisladas de muestras clínicas de infecciones fúngicas cutáneas, de pacientes internados y ambulatorios, de ambos sexos, sin límite de edad, derivadas al Servicio de Diagnóstico Micológico de la Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales (FCEQyN). Universidad Nacional de Misiones (UNaM), Argentina, de diferentes servicios hospitalarios de la ciudad de Posadas (Misiones).

3. Muestras

Las muestras estuvieron constituidas por cepas viables de hongos dermatofitos (DMT) de las especies *M. canis*, *N. gypsea*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes complex* y *T. tonsurans*. El criterio de selección dependió de la posibilidad de acceder a ellos, en este caso, las cepas aisladas de pacientes que acudieron al servicio de diagnóstico micológico, con el debido consentimiento informado del paciente, y que forman parte del cepario del Servicio de Diagnóstico Micológico de la FCEQyN. UNaM.

4. Estructura de los datos (Bottinelli, M., 2007)

4.1. Unidades de análisis (UA): las UA fueron cada una de las cepas en estudio de las siguientes especies de hongos DMT:

- Especie *M. canis*
- Especie *N. gypsea*
- Especie *T. rubrum*
- Especie *T. mentagrophytes complex*
- Especie *T. tonsurans*

Se utilizaron cada una de las cepas disponibles de cada especie fúngica.

4.2. Variables (V): los atributos de las UA analizados fueron:

- Especies de DMT: *M. canis*, *N. gypsea*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*.
- Variabilidad inherente a cada cepa en estudio.
- Concentración de extractos acuosos de frutos de YM (EAFYM).
- Concentración de ATF convencionales (Itraconazol, fluconazol, terbinafina, clotrimazol).
- Tiempo de incubación (24, 48, 72 y 96 h).
- Sensibilidad (S) *in vitro* de las cepas de DMT frente a ATF convencionales (a ≠ tiempo y ≠ concentraciones de los ATF convencionales) (Métodos difusión en agar y métodos de microdilución en medio líquido (MML) y en medio sólido (MDS), para determinar la concentración inhibitoria mínima-CIM) (Córdoba y cols., 2016)
- S *in vitro* de las cepas frente a los EAFYM (a ≠ tiempo y ≠ concentraciones del extracto). Métodos difusión en agar y métodos de dilución MML y MDS. (Córdoba y cols., 2016)

4.3. Escalas de valores (R):

4.3.1 Con la aplicación del método de difusión en agar: la inhibición del DMT frente al ATF en estudio, se midió el halo de inhibición del crecimiento fúngico y se expresó ese valor en milímetros (mm) (No existen puntos de corte establecidos para hongos DMT).

Los valores que se obtuvieron mediante la aplicación de esta prueba dependieron de:

- Variabilidad inherente a cada cepa en estudio

Dependieron de las cepas de *M. canis*, *N. gypsea*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*

- Variabilidad inherente a cada ATF comercial en estudio

El intervalo de concentraciones para cada ATF comercial probado (teniendo en cuenta que la tableta de ATF mide 9 mm de diámetro) fueron:

Clotrimazol ≥ 20 y 9 mm

Fluconazol ≥ 22 y 9 mm

Griseofulvina ≥ 10 y 9 mm

Itraconazol ≥ 16 y 9 mm

Terbinafina ≥ 20 y 9 mm

- Variabilidad inherente a la concentración del EAFYM en estudio

El intervalo de concentraciones para cada EAFYM en estudio estuvo entre 10 mg/ml y 40 mg/ml

4.3.2 En la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) se consideró como CIM, la concentración más baja del ATF que muestra inhibición evidente de crecimiento fúngico (para cada cepa y para cada ATF probado).

Los valores que se obtuvieron mediante la aplicación de las dos pruebas para determinar CIM dependieron de:

- Variabilidad inherente al método de estudio de sensibilidad aplicado

Dependieron de la aplicación de MML y MDS.

- Variabilidad inherente a cada cepa en estudio

Dependieron de las cepas de *M. canis*, *N. gypsea*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*.

- Variabilidad inherente a cada ATF comercial en estudio

El intervalo de concentraciones para cada ATF, incluyeron los puntos críticos:

-Para itraconazol: 0,03-16 µg/ml

-Para terbinafina: 0,03-16 µg/ml

-Para fluconazol: 0,125-64 µg/ml

- Variabilidad inherente a la concentración del EAFYM en estudio

El intervalo para del EAFYM: 0,25-125 µg/ml

4.4. Indicadores y dimensiones:

Los procedimientos y dimensiones a utilizados para medir las variables fueron:

- Métodos microbiológicos clásicos: para el aislamiento de las cepas fúngicas, para la identificación de las especies fúngicas, en base a características morfológicas y bioquímicas de las mismas, fue necesario tener en cuenta las siguientes dimensiones: especie fúngica, crecimiento fúngico, temperatura y tiempo de incubación, medios de cultivo.

- Método de difusión en medio sólido para el estudio de sensibilidad de los DMT a los ATF convencionales y el EAFYM. Las dimensiones a tener en cuenta fueron: especie

fúngica, concentración del inóculo, concentración del EAFYM, concentración del ATF convencional, puntos de corte, temperatura y tiempo de incubación.

- Método de dilución en caldo (MML) y en agar (MDS) para determinar la CIM de los ATF convencionales y del EAFYM, que inhibieron el desarrollo de las cepas de DMT estudiadas. Las dimensiones tenidas en cuenta fueron: especie fúngica, concentración del inóculo, concentración del EAFYM, concentración del ATF convencional, puntos de corte, temperatura y tiempo de incubación.

4.5 Fuente de información

El tipo de información es primaria.

4.6 Instrumentos herramientas

Ejecución, observación, registro y análisis de datos. Análisis estadístico con el programa Statgraphics (2009), mediante diseño factorial de una variable.

5. Métodos para el aislamiento e identificación de las cepas fúngicas

Para el aislamiento de las cepas fúngicas, se utilizaron métodos micológicos clásicos (Medvedeff y cols., 2003; Medvedeff y cols., 2005; Negroni y cols., 2011):

- Examen directo de la muestra: se realizó observación microscópica directa del material en busca de elementos fúngicos (piel y faneras) con KOH al 20 % (Figura N° 2).

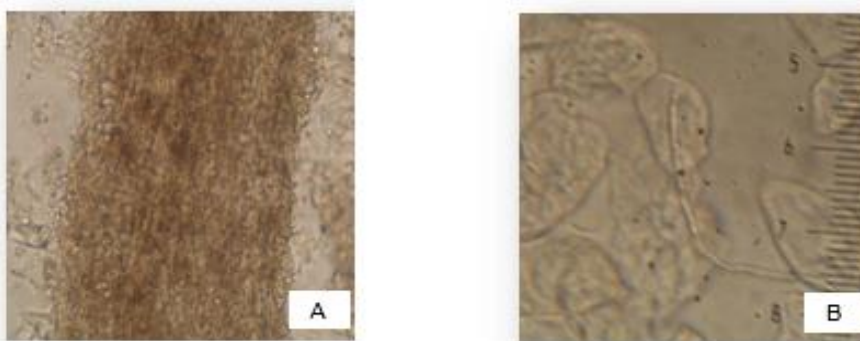


Figura N° 2. Observaciones microscópicas (400X). A: observación de esporas fúngicas alrededor de pelo infectado. B: observación de hifas hialinas septadas en muestra de piel.

- Cultivo de las muestras: se realizó en una batería de medios cultivos que aseguren el aislamiento del hongo; tales como agar Sabouraud dextrosa (ASD) 4 % (Merck-Merck Química Argentina), agar Hongos y levaduras (AHyL) (Britania), agar selectivo para hongos patógenos (ASHP) (Merck-Merck Química Argentina). Los cultivos se incubaron a 28 °C. Los controles se efectuaron periódicamente hasta detectar el crecimiento.

- Identificación de especies: se realizaron en base a las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los cultivos desarrollados (Figura N° 3). Para diferenciar entre *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* se realizaron prueba de ureasa y perforación al pelo *in vitro*.

Método de conservación de cepas fúngicas

Las cepas de dermatofitos aislados fueron conservadas en agar agua (AA) y agar harina de avena (AHA), para evitar el pleomorfismo o pérdida de capacidad de esporulación y refrigeradas a 4-8 °C.

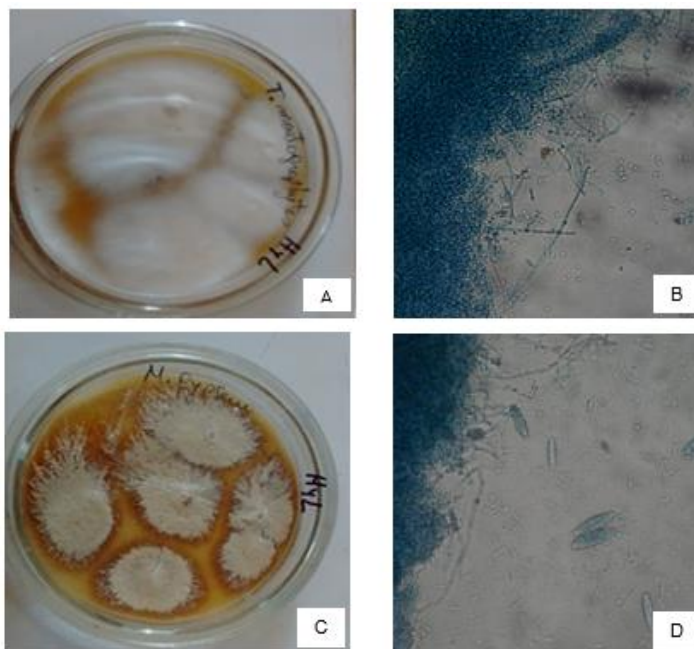


Figura N° 3. Colonias y estructuras microscópicas (400X) de algunas especies de DMT. A: colonia de *T. mentagrophytes*. B: abundantes microconidios e hifas espiraladas de *T. mentagrophytes*. C: colonia de *N. gypsea*. D: macroconidios de *N. gypsea*.

6. Métodos para determinar la sensibilidad frente a los antifúngicos

Las pruebas de sensibilidad a los ATF fueron desarrolladas mediante técnicas cualitativas y cuantitativas.

En la primera etapa de la ejecución del proyecto, por su sencillez y menor costo, se procedió a la realización de las pruebas de sensibilidad por el método de difusión en agar.

Las pruebas cuantitativas se realizaron posteriormente para establecer en forma más certera la mínima concentración de los ATF comerciales utilizados, y del EAFYM que inhiben a las diferentes especies de hongos dermatofitos estudiados.

Las pruebas de sensibilidad cualitativas de difusión en agar, se realizaron siguiendo el documento M51-A del CLSI que desarrolló este método para hongos miceliales no dermatofitos que causan infección invasora. En este trabajo, se adaptó esta técnica para aplicarlas a los dermatofitos, con el fin de poder determinar en forma cualitativa la

concentración del EAFYM que presente actividad inhibitoria del crecimiento fúngico. En la aplicación de este tipo de técnica se utilizaron como controles cepas levaduriformes con las indicaciones sugeridas en el documento M44, 3rd ed., del CLSI.

En cuanto a las pruebas cuantitativas, para la evaluación de la sensibilidad frente a los antifúngicos convencionales, se aplicó el método de microdilución en caldo, siguiendo el documento CLSI M38, 3rd ed., estandarizado para determinar la CIM de hongos miceliales más frecuentes e incluye a los dermatofitos.

Debido a que no existe metodología estandarizada para la evaluación de la capacidad inhibitoria de los extractos de plantas; para la evaluación de la actividad antifúngica del EAFYM, se utilizaron dos métodos. Por un lado, se aplicó el método de microdilución en caldo, tomando como referencia el documento CLSI M38, 3rd ed., con modificación de las diluciones del ATF en estudio, basados en los resultados obtenidos por la aplicación de las pruebas cualitativas.

Al mismo tiempo se aplicó, el método de dilución en agar para la detección de compuestos antifúngicos, técnica sugerida para la detección de compuestos antifúngicos a partir de extractos de plantas (Derita y cols., 2007).

6.1. Prueba de sensibilidad en medio sólido (Método cualitativo)

(Documento CLSI 51-A, 2010; Córdoba y cols., 2016).

6.1.1. Medio de cultivo para prueba de sensibilidad en medio sólido

Se utilizó el medio de cultivo agar Müller Hinton (AMH) sin suplemento, a pH controlado que debe oscilar entre 7,2 y 7,4 a 25 °C. Una vez esterilizado, se dispensó 25 ml en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro, de modo de asegurarse de que poseyeran un espesor de 4 mm \pm 1mm.

6.1.2. Antifúngicos para pruebas de sensibilidad por difusión en medio sólido

Los ATF ensayados son los habitualmente utilizados en la práctica médica para este tipo de microorganismos:

- Terbinafina (TERBI)
- Itraconazol (ITRAC)
- Griseofulvina (GRISE)
- Fluconazol (FLUCZ)
- Clotrimazol (CTRIM)

Se utilizaron ATF contenidos en tabletas Neo-Sensitabs, Rosco Diagnostica (Proveedor Medica-Tec, Buenos Aires, Argentina). Dichas tabletas han sido estandarizadas de acuerdo con los valores límite (puntos de corte) de concentración mínima inhibitoria (CIM recomendados por el CLSI). En la tabla N° 3 se observan los valores límite para los ATF utilizados. Cabe indicar, que debido a la falta de disponibilidad en el comercio de tabletas Neo-Sensitabs de griseofulvina, se prepararon discos de papel de filtro embebidos con la droga pura en polvo (Sigma-Aldrich, Argentina S.R.L., Buenos Aires, Argentina); con la potencia utilizada en las tabletas de Neo-Sensitabs (25 µg).

Tabla N°3. Valores de corte epidemiológico de ATF. Rosco Diagnostica.* Depende de la dosis

NEO-SENSITABS	Potencia	Código	Zona diámetro en mm		
			S	I	R
Clotrimazol	10 µg	CTRIM	≥ 20	19-12	≤ 11
Fluconazol	25 µg	FLUCZ	≥ 22	21-15	≤ 14
Griseofulvina	25 µg	GRISE	≥ 10	-	Sin zona
Itraconazol	8 µg	ITRAC	≥ 16	15-10*	< 10
Terbinafina	30 µg	TERBI	≥ 20	19-12	≤ 11

6.1.3. Control de calidad de las tabletas de antifúngicos

Para realizar los controles de calidad de los antifúngicos, se utilizaron como control cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6258.

6.1.4. Preparación del inóculo fúngico

Los hongos dermatofitos se cultivaron durante 5-7 días o hasta la formación de conidios, a 30 °C en tubos con agar harina de avena (AHA) para inducir la esporulación. La manipulación de los microorganismos se realizó en cabina de seguridad biológica (Figura N° 4).

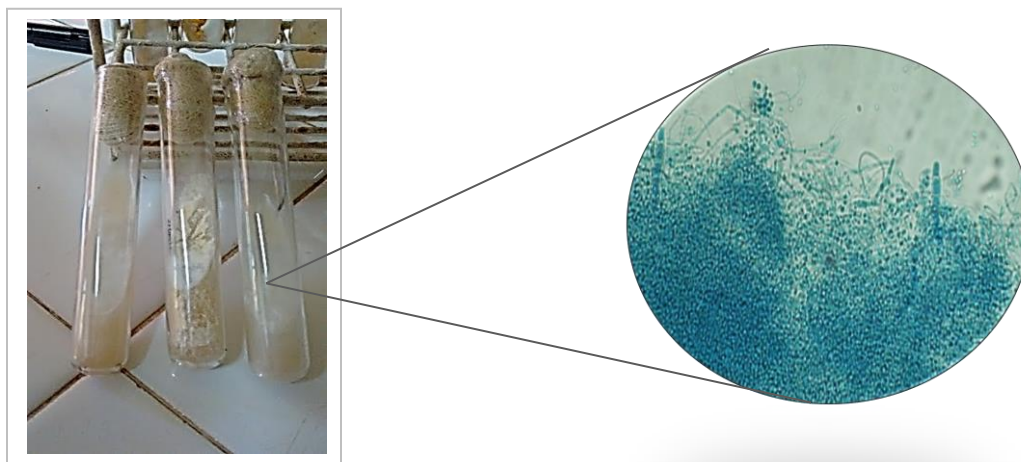


Figura N° 4. Cepa de *T. mentagrophytes* repicada en AHA a partir del cual se logró abundante esporulación.

Las cepas de hongos levaduriformes utilizados como controles, se sembraron en cultivo de 24 h, en ASD a 35 ± 2 °C. La manipulación de los microorganismos se realizó en cabina de seguridad biológica.

Una vez completado el período de incubación, la colonia fúngica se cubrió con 1-2 ml de solución fisiológica (SF) estéril (NaCl 0,85 %) y se raspó la superficie. De esta forma se obtuvo una suspensión turbia, formada por esporas y trozos de hifas, que se transfirió a otro tubo estéril. Se esperó 5 minutos para que las partículas más densas sedimentaran.

La parte superior de la suspensión homogénea de conidios se transfirió a otro tubo, se agitó en vortex durante 15 seg y se ajustó el inóculo.

En el caso de hongos dermatofitos, se ajustó el inoculo de $0,4-5 \times 10^4$ UFC/ml (indicado para hongos miceliales no dermatofitos en documento 51-A (CLSI) por recuento de conidios en Cámara de Neubauer (Figura N° 5).

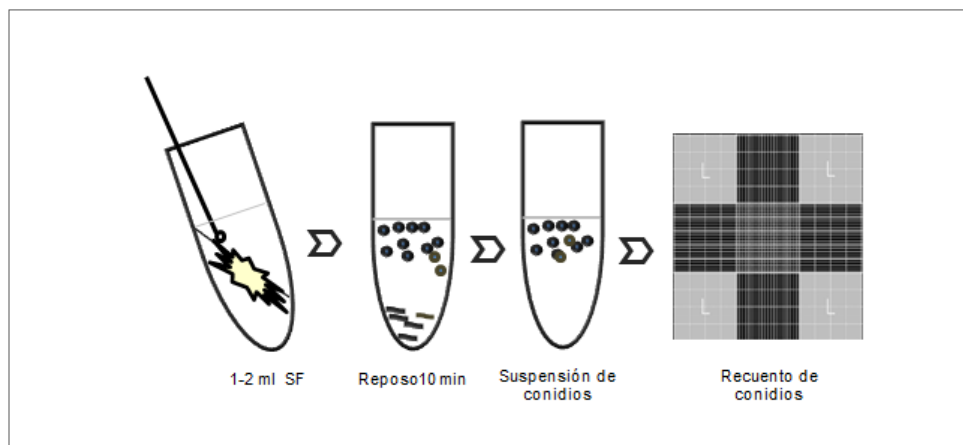


Figura N° 5. Procedimiento para la preparación del inóculo de hongos dermatofitos

De esta manera se obtuvo un tamaño de inóculo entre $0,5-4 \times 10^6$ UFC/ml. Esta suspensión se diluyó 1:100 para obtener un inóculo final de aproximadamente $0,4-5 \times 10^4$ UFC/ml, recomendado.

Se realizó control del inóculo, sembrando uniformemente sobre placas de agar SDA, se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, con observación diaria y tan pronto se pudieron contar las colonias se comprobó el tamaño real del inóculo.

Con las cepas controles de levaduras, se trabajó tal como lo indica el documento del CLSI M44, 3rd ed. Del cultivo de 24 h en SDA, se tocaron cinco colonias y se suspendieron en 5 ml de SF estéril. La suspensión se homogeneizó durante 15 seg, y su turbidez se ajustó a 0,5 de la escala McFarland (equivalente a $1-5 \times 10^6$ UFC/ml).

6.1.5. Siembra de las placas en las pruebas de sensibilidad en medio sólido

Una vez preparados los inóculos, se respetó que el tiempo entre la preparación y la siembra no fuera mayor a 15 min para mantener la viabilidad de las células. Se homogenizó el inóculo, se extrajo 1 ml del mismo, y se volcó en la placa de Petri. Se distribuyó homogéneamente sobre la superficie del medio. El exceso de líquido se retiró con una pipeta Pasteur estéril. Se dejó secar la superficie durante 15 min a temperatura ambiente.

6.1.6. Aplicación de los discos en la placa en las pruebas de sensibilidad en medio sólido

Se dispensaron los discos con la ayuda de aplicador o con pinza de punta estéril. Cada disco debe ser presionado sobre la superficie del agar para asegurar su ubicación.

Una vez depositados los discos sobre el agar, se tuvo el cuidado necesario para que no se movieran ya que la difusión del ATF se produce en forma inmediata. La distancia entre cada disco (de centro a centro) no fue menor a 32 mm y no menor a 55 mm cuando se evaluaron TERBI, CTRIM e ITRAC. Se colocaron 2-3 discos por placa de Petri de 90 mm, según que ATF se estuviera probando.

6.1.7. Incubación de placas en las pruebas de sensibilidad en medio sólido

Las placas inoculadas se incubaron invertidas a 28 °C, con controles diarios. Para los dermatofitos, al ser hongos de crecimiento lento, las placas se incubaron hasta los 5-7 días o hasta que pudo observarse un crecimiento adecuado para la lectura e interpretación de los resultados.

Los hongos levaduriformes controles, se incubaron durante 48 h a 37 °C.

6.1.8. Lectura e interpretación en las pruebas de sensibilidad en medio sólido

El halo de inhibición se midió en la zona donde se observó una reducción prominente del crecimiento ($\geq 80\%$). Para la interpretación de la sensibilidad o resistencia

de los hongos levaduriformes utilizados como cepas controles, se utilizó como guía los valores de corte epidemiológicos (ECV) establecidos por el fabricante de las tabletas Neo-Sensitabs (Rosco Diagnóstica).

Sin embargo, al no existir puntos de corte establecidos para los hongos dermatofitos, se midió el diámetro (mm) de los halos de inhibición, en la zona donde se observó una prominente reducción del crecimiento, sin expresar los resultados como “Sensibles” o “Resistentes”.

6.2 Prueba de sensibilidad en medio líquido (Método cuantitativo)

(Cantón Lacasa y cols., 2007; Guelfand G y cols., 2015; Córdoba y cols., 2016; Documento CLSI M38, 3rd ed., 2017).

6.2.1. Medio de cultivo para la prueba de sensibilidad en medio líquido

El medio de cultivo utilizado fue el medio sintético RPMI1640 con 0,3 g/l de L-glutamina y 0,165 M de tampón ácido 3-(N-morfolino) propano sulfónico (MOPS) (34,54 g/l) sin bicarbonato sódico (Sigma-Aldrich, Argentina). El pH se ajustó entre $7 \pm 0,1$, se esterilizó por filtración y se conservó refrigerado (4-8 °C) hasta su uso. El medio de cultivo se preparó a una concentración 2X.

6.2.2. Placas de cultivo utilizadas en la prueba de sensibilidad en medio líquido.

Se utilizaron placas de microdilución estériles, de 96 pocillos con fondo en forma de U, con tapa (Marca FALCON ART 353077; Global Lab S. A, Argentina). Las mismas fueron descartadas luego del uso.

6.2.3. Drogas antifúngicas utilizadas en la prueba de sensibilidad en medio líquido

Debido al alto costo de las drogas puras, no fue posible adquirir para la aplicación de este método cuantitativo, todos los antifúngicos probados por el método cualitativo de difusión en agar. En consecuencia y teniendo en cuenta que se han descrito los tratamientos con itraconazol y terbinafina como los más efectivos para las dermatofitosis y el fluconazol como de tercera línea (Carrillo-Muñoz y cols., 2010; Eisman y cols., 2014) se decidió utilizar para las pruebas de sensibilidad en medio líquido los siguientes ATF: ITRAC, TERBI y FLUCZ. Las drogas puras (polvo base) fueron adquiridas de Sigma-Aldrich, Argentina.

6.2.4. Disolventes de los antifúngicos

En la tabla N° 4 se muestran los disolventes adecuados según el ATF. En todos los casos, una vez realizada la disolución, los ATF se diluyeron en el medio de cultivo apropiado.

Tabla N° 4. Disolventes para los antifúngicos utilizados

Antifúngico	Solvente	Diluyente
Itraconazol	Dimetilsulfóxido	Medio de cultivo
Terbinafina	Dimetilsulfóxido	Medio de cultivo
Fluconazol	Agua	Medio de cultivo

6.2.5. Preparación de solución madre de los antifúngicos

La solución madre o solución stock de los ATF es aquella de la cual se parte para hacer las diluciones de uso; se prepararon a concentraciones de al menos 1280 µg/ml o 10 veces la concentración mayor ensayada.

Los ATF insolubles en agua (ITRAC, TERBI) se prepararon con dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Argentina), el FLUCZ se disolvió en agua. Las soluciones concentradas de las drogas insolubles se prepararon con una concentración 100

veces mayor a la concentración más alta de antifúngico a ensayar. En el caso de FLUCZ, que es soluble en agua, 10 veces superior a la mayor concentración a ensayar.

6.2.6. Diluciones de los antifúngicos solubles en agua

El intervalo de concentraciones de antifúngicos a ensayar para el FLUCZ fue de 0,12-64 µg/ml.

1. A partir de la solución madre se preparó la serie de diluciones a una concentración 10 veces superior a la concentración final deseada, se utilizó como diluyente RPMI 1640.

2. Seguidamente se realizó una dilución 1/5 añadiendo a todos los tubos 4 ml de RPMI, con lo que la concentración del ATF en los tubos es 2 veces mayor que la concentración final deseada (de 128 µg/ml a 0,25 µg/ml) (Tabla Nº 5. Figuras Nº 6 y 7). Los volúmenes indicados fueron suficientes para preparar 5 placas de antifúngico.

Tabla Nº 5. Diluciones del ATF soluble en agua

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
Nº 1	1280 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	640 µg/ml	Nº 2
Nº 2	640 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	320 µg/ml	Nº 3
Nº 2	640 µg/ml	0,5 ml	1,5 ml de RPMI	160 µg/ml	Nº 4
Nº 4	160 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	80 µg/ml	Nº 5
Nº 4	160 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	40 µg/ml	Nº 6
Nº 4	160 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	20 µg/ml	Nº 7
Nº 7	20 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de RPMI	10 µg/ml	Nº 8
Nº 7	20 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de RPMI	5 µg/ml	Nº 9
Nº 7	20 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de RPMI	2,5 µg/ml	Nº 10
Nº 10	2,5 µg/ml	1 ml	1 ml de RPMI	1,25 µg/ml	Nº 11

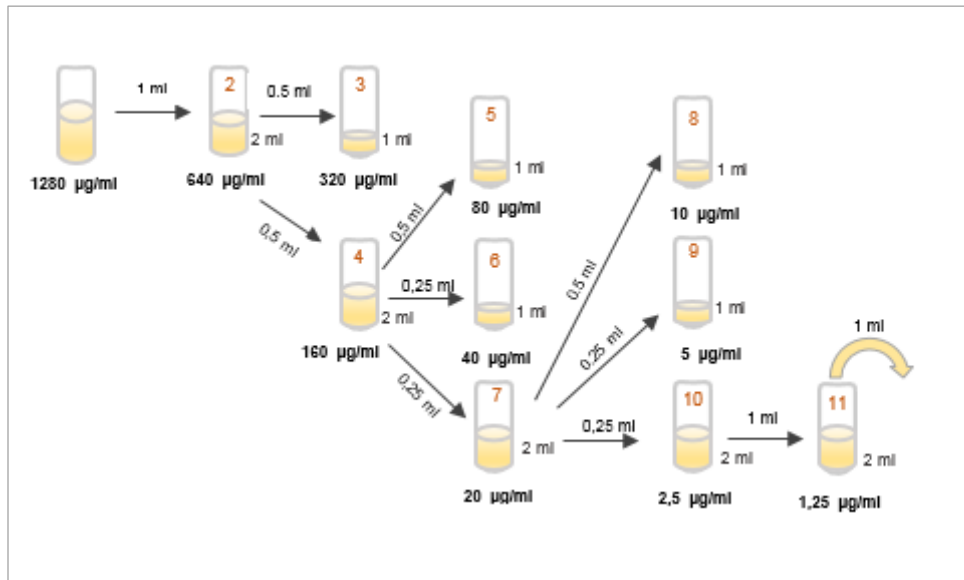


Figura N° 6. Esquema para las diluciones del ATF soluble en agua. Diluyente H₂O.

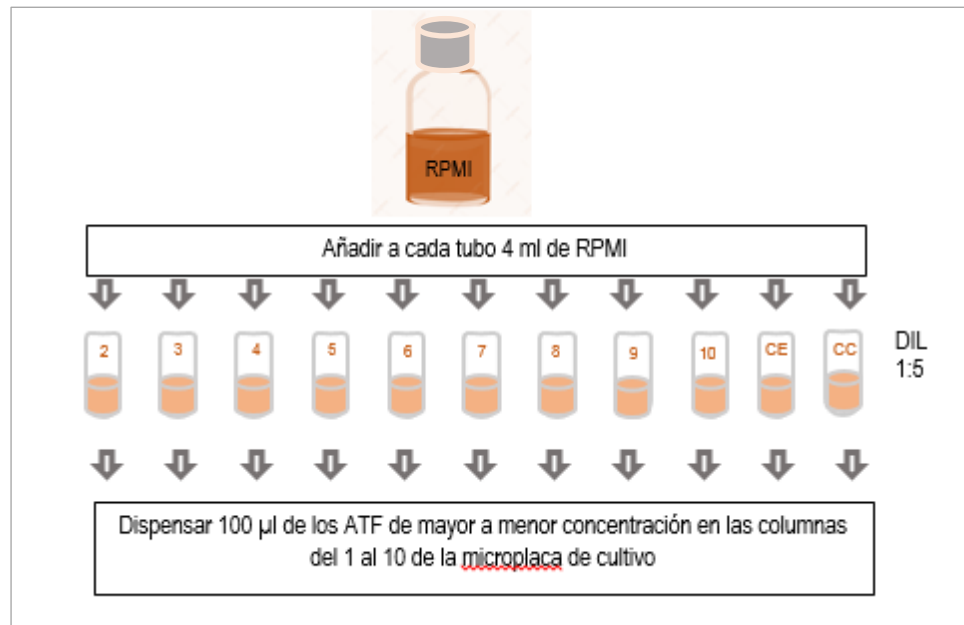


Figura N° 7. Segundo paso de las diluciones de los ATF solubles en agua

6.2.7. Diluciones de los antifúngicos insolubles en agua

El intervalo de concentraciones ensayadas para ITRAC y TERBI fueron las comprendidas entre 16 y 0,03 µg/ml.

6.2.7.1. A partir de la solución madre se preparó la serie de diluciones a una concentración 100 veces superior a la concentración final deseada, se utilizó como diluyente DMSO.

6.2.7.2. Luego se realizó una dilución 1/50 tomando 100 µl de cada tubo y se transfirieron a otro tubo que contenía 4,9 ml de RPMI, con lo que la concentración de antifúngico fue dos veces mayor que la concentración final deseada (32 µg/ml - 0,06 µg/ml) (Tabla Nº 6, figuras Nº 8 y 9).

Tabla Nº 6. Diluciones de los ATF insolubles en agua.

Tubo	Concentración	Transferir	A un tubo con	Concentración resultante	Tubo
Nº 2	1600 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	800 µg/ml	Nº 3
Nº 2	1600 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	400 µg/ml	Nº 4
Nº 2	1600µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	200 µg/ml	Nº 5
Nº 5	200 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	100 µg/ml	Nº 6
Nº 5	200 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	50 µg/ml	Nº 7
Nº 5	200 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	25 µg/ml	Nº 8
Nº 8	25 µg/ml	0,5 ml	0,5 ml de DMSO	12,5 µg/ml	Nº 9
Nº 8	25 µg/ml	0,25 ml	0,75 ml de DMSO	6,25 µg/ml	Nº 10
Nº 8	25 µg/ml	0,25 ml	1,75 ml de DMSO	3,12 µg/ml	Nº 11

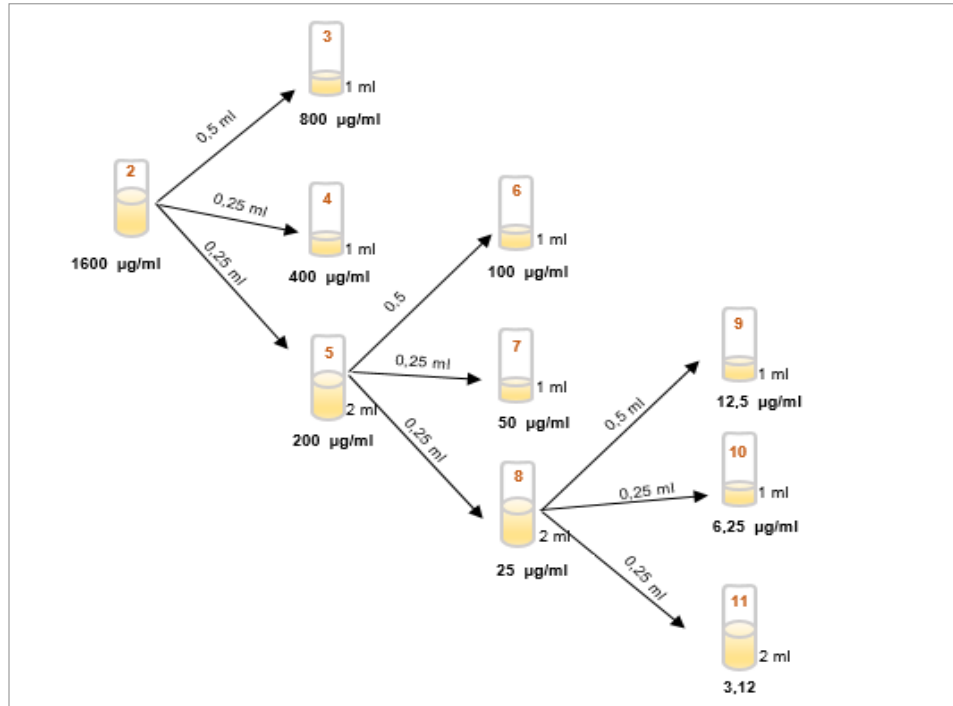


Figura N° 8. Esquema para las diluciones de los ATF insolubles en agua. Diluyente DMSO



Figura N° 9. Segundo paso de las diluciones de los ATF insolubles en agua. Diluyente RPMI1640

6.2.8. Cargado de las microplacas

Se dispensaron 100 μ l de los antifúngicos a una concentración 2X en las columnas de la 1 a la 10 con una pipeta multicanal. La columna 1 contenía la concentración más alta del ATF (64 o 16 mg/l) y la fila 10 la más baja (0,12 o 0,03 mg/l). La columna 11 y 12 contenían RPMI, para control de crecimiento (CC) y de esterilidad (CE) respectivamente (Figura N° 10).

Las placas se guardaron en bolsas de plástico selladas y se almacenaron congeladas a -70 °C hasta un máximo de 6 meses sin que el antifúngico pierda ninguna actividad.

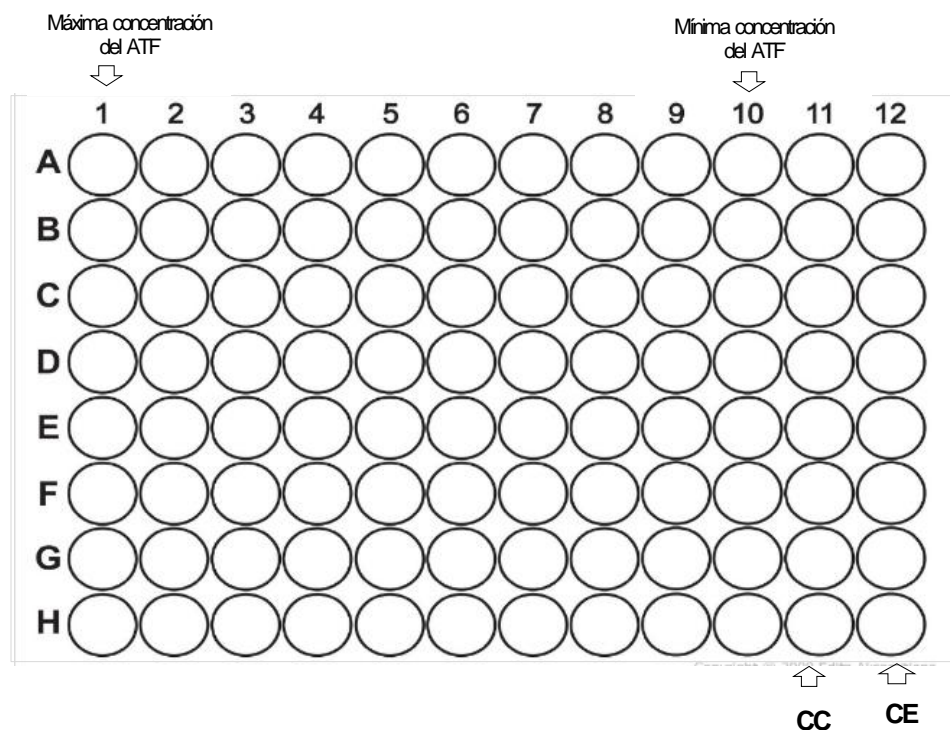


Figura N° 10. Cargado de los ATF en la microplaca de cultivo

6.2.9. Control de calidad

Como control de calidad, de los antifúngicos, se utilizaron cepas de *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 y *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305.

6.2.10. Preparación del inóculo de hongos

Las especies de dermatofitos se sembraron en agar harina de avena (AHA) para favorecer la esporulación y se incubaron a 30 °C durante 5-7 días hasta la formación de conidios.

Cuando se obtuvieron desarrollo y esporulación adecuada se procedió a cubrir la colonia del hongo con 2-3 ml de solución salina estéril y se raspó la superficie con un ansa estéril descartable.

La suspensión se pasó a tubos cónicos y se dejó reposar 10 min para que sedimenten las hifas y queden los conidios en el sobrenadante.

Los sobrenadantes se pasaron a tubos estériles, se agitaron en vortex durante 15 seg y se realizaron conteo de conidios en cámara de Neubauer. La suspensión de conidios tuvo el doble de concentración que la concentración final para la prueba ($1-3 \times 10^3$ UFC/ml).

Los hongos filamentosos no dermatofitos se cultivaron durante 3-5 días a 30 °C en tubos con agar Sabouraud dextrosa. La colonia del hongo micelial se cubrió con 2-3 ml de solución salina estéril y se raspó la superficie con un ansa estéril descartable. Los conidios de *Aspergillus* spp. son hidrófobos y quedan fijos a las paredes del tubo, por ese motivo, se agregó 100µl de Tween20 que facilita la preparación de la suspensión del inóculo. De esta forma se obtuvo una suspensión turbia formada por

conidios y trozos de hifas, que se transfirieron a otro tubo estéril. Se esperaron 5 minutos para que las partículas más densas sedimenten.

La parte superior de la suspensión homogénea se transfirió a un tubo cónico. Se agitó en un vortex durante 15 seg y se ajustó mediante espectrofotómetro (longitud de onda= 530 nm) a las DO que se muestran en la tabla N° 7. Para *Aspergillus* la DO debe estar entre 0,09-0,13.

Tabla N° 7. DO para las especies de hongos miceliales

Especie	Densidad óptica
<i>Aspergillus</i> spp., <i>Paecilomyces lilacinus</i> , <i>P. variotti</i> , <i>Exophiala dermatitidis</i> , <i>Sporothrix schenckii</i>	0,09-0,13
<i>Fusarium</i> spp., <i>S. apiospermum</i> , <i>Ochroconis gallipava</i> , <i>Cladophialophora bantiana</i> , <i>R. oryzae</i> y otros zigomycetes	0,15-0,17
<i>Bipolaris</i> spp. y <i>Alternaria</i> spp.	0,25-0,30

Se obtuvo un tamaño de inóculo entre $0,5-4 \times 10^6$ UFC/ml y el inóculo final fue de $0,4-5 \times 10^4$ UFC/ml. Por ello, esta suspensión se diluyó 1:50 en SF estéril. Para verificar el número de UFC/ml del inóculo, a partir del tubo original, es decir, aquel que contenía $\approx 10^6$ UFC/ml, se realizó una dilución 1:10 con solución fisiológica (SF) estéril. De este último tubo se inocularon 10 μ l ($\approx 10^2$ UFC/ml) en ASD y se extendieron de forma uniforme por toda la superficie de la placa. Se incubó a 28-30 °C. Se observó a diario y tan pronto se pudieron contar las colonias se comprobó el tamaño real del inóculo.

Para los hongos levaduriformes, según lo recomendado en el documento CLSI M27, 4th ed., se preparó tocando con el ansa unas 5 colonias de 24 h de crecimiento en placa de ASD que se resuspendieron en un tubo de SF. Se agitó bien y, con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajustó a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina.

Esta solución tenía una concentración aproximada de $1-5 \times 10^6$ UFC/ml.

Posteriormente se realizó una dilución 1:1000 con medio RPMI (concentración de $1-5 \times 10^3$ UFC/ml). Esta última dilución es la que se utilizó para inocular las placas de antifúngico.

6.2.11. Inoculación de las microplacas

Se inocularon 100 μ L por pocillo de la placa de microdilución excepto en la columna N° 12 que sirvió como control de esterilidad. El inóculo tenía una concentración 2X. El antifúngico y el RPMI1640 también. Por tanto, los 100 μ l que se añadieron con los 100 μ l existentes en el pocillo, se alcanzó la concentración final 1X. Fig. N°11.

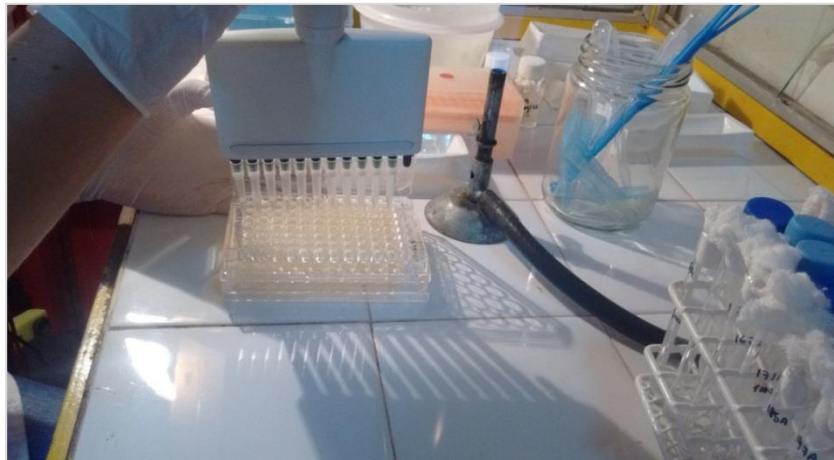


Figura. N° 11. Proceso de inoculación de la microplaca

La inoculación de las placas se realizó por duplicado para comparar resultados.

6.2.12. Incubación

Las placas inoculadas se incubaron a 35 °C, sin agitación, dentro de una caja de plástico con papel de filtro humedecido para prevenir la evaporación del medio, pero sin impedir la entrada de aire. La temperatura y tiempo de incubación, varió acorde al microorganismo en estudio (Tabla N° 7).

Tabla N° 7. Tiempo y temperatura de incubación para hongos ensayados

Especie	Temperatura	Tiempo
<i>Candida</i> spp.	35 °C	24 a 48 h
<i>Aspergillus</i> spp.	35 °C	46 a 50 h
Dermatofitos	35 °C	96 h

6.2.13. Lectura de la CIM

La lectura se realizó a las 24, 48, 72 y 96 h de forma visual con la ayuda de un espejo para lectura de placas de microdilución (Fig. N° 12).



Figura N° 12. Espejo lector de placas de microdilución

El tiempo de la lectura varió según la especie en estudio. El crecimiento en cada pocillo fue comparado visualmente con el desarrollo en el pocillo control de crecimiento.

6.2.14. Determinación de la CIM

Para establecer la concentración más baja de antifúngico que inhibió el crecimiento se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

Para FLUCZ: correspondió a una reducción $\pm 50\%$ en el crecimiento con respecto al pocillo control de crecimiento (miceliales no dermatofitos), o bien $\pm 80\%$ (dermatofitos). Con este ATF puede existir cierto crecimiento residual (efecto de arrastre, *trailing*) lo que puede producir mayor variabilidad de los resultados entre laboratorios. Además, cuando esta turbidez residual persiste, el crecimiento suele ser igual para algunas o todas las concentraciones por encima de la CIM. Eso produce falsos resultados de resistencia.

Para ITRAC: el punto de lectura se definió como la menor concentración que inhibe cualquier crecimiento discernible (100 % de inhibición). No es común observar efecto de arrastre con este fármaco.

Para TERBI: para este ATF se consideró $\pm 80\%$ de inhibición comparado con el control de crecimiento.

6.2.15. Interpretación de resultados

Por el momento, para las levaduras existen puntos de corte solo para algunas especies del género *Candida* y para algunos ATF y se muestran en la Tabla N° 8.

Tabla N° 8. Puntos de corte ($\mu\text{g/ml}$) de *Candida spp.* frente al fluconazol.

Intervalo de CIM ($\mu\text{g/ml}$)				
Antifúngico	Especie	S	SDD	R
Fluconazol	<i>C. albicans</i>	≤ 2	4	≥ 8
	<i>C. parapsilosis</i>	≤ 2	4	≥ 8
	<i>C. tropicalis</i>	≤ 2	4	≥ 8
	<i>C. glabrata</i>	-	≤ 32	≥ 64
	<i>C. krusei</i>	-	-	-

Para las cepas levaduriformes controles fueron: *C. parapsilosis* ATCC 22019 y *C. krusei* ATCC 6258, los rangos de CIM aceptables de los antifúngicos probados se pueden observar en la Tabla N° 9.

Tabla N° 9. Rangos de CIM aceptables para los ATF ($\mu\text{g/ml}$) para los controles de calidad

Antifúngico	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>Candida krusei</i> ATCC6258
Fluconazol	1-4	16-128
Itraconazol	0,12-0,5	0,25-1

Para los hongos filamentosos no se han establecido puntos de corte clínicos; sin embargo, se han determinado rangos de CIM aceptables para cepas de referencia y puntos de corte epidemiológicos (PCE). El PCE divide a los aislados como población salvaje (wild-type) (WT) y no-WT. Población WT: es la subpoblación de aislados/CIM en una combinación de especie/droga, sin mecanismos adquiridos de resistencia detectables. Se calcula teniendo en cuenta la distribución normal de la CIM para cada antifúngico y la variabilidad inherente a la técnica y se define como el mayor valor de la CIM que, al menos, incluye al 95 % de la población sensible. Así un aislamiento pertenece a la población salvaje (WT) cuando su CIM es menor o igual al PCE (Cantón Lacasa y cols., 2007; Espinel-Ingroff y cols., 2010; Fernández, 2015, Castro Méndez C y cols. 2019).

Con respecto a la combinación ITRAC/*Aspergillus fumigatus* ATCC 204305, cepa utilizada como control en este trabajo, se ha informado un rango de CIM de 0,12 -1 $\mu\text{g/ml}$ (Cantón Lacasa y cols., 2007) y no se han encontrado datos de referencias más actualizadas. En el documento M61, 1st ed., 2017; en la combinación Itraconazol/*A. fumigatus* ATCC MYA-3626, se informó un rango de CIM de 0,25-2 $\mu\text{g/ml}$. En el documento M59, 2nd ed., 2018; se publicó para *A. fumigatus* un PCE = 1 $\mu\text{g/ml}$. En cuanto a la combinación TERBI/*Aspergillus* spp. y FLUCZ/*Aspergillus* spp., no hay datos de referencia de los rangos de CIM y tampoco se han establecido los puntos de corte para estos ATF frente a la cepa utilizada como control de calidad.

6.3 Pruebas de evaluación de actividad antifúngica de extractos acuosos de frutos de *I. paraguariensis* (Yerba mate)

Para el estudio de la actividad antifúngica (AATF) del extracto acuoso de frutos de yerba mate (EAFYM), se aplicó, en una primera etapa, el método cualitativo de difusión en agar que permitieron obtener resultados preliminares para la realización posterior de pruebas cuantitativas por el método de microdilución en caldo y el método de dilución en agar, mediante los cuales se pudieron establecer la CIM de dicho EAFYM.

6.3.1. Frutos de *I. paraguariensis* utilizados

Se utilizaron frutos de yerba mate (YM) recolectados, entre fines de diciembre y fines de abril, en yerbales de Apóstoles y Oberá (zona Sur y Centro de la provincia de Misiones). Figura N° 13.



Figura N° 13. Zonas de recolección de los frutos de *I. paraguariensis* para la obtención de EAFYM.

Se obtuvieron frutos carnosos, de unos 5-6 mm de diámetro, de color verde al principio y rojo vináceo cuando están maduros, como pueden observarse en las figuras N° 14 y 15.



Figura N° 14. Fotografía de frutos verdes de YM recolectados



Figura N° 15. Fotografía de frutos maduros de YM recolectados.

Una vez recolectados, para su mejor conservación y evitar pardeamiento (Figura N° 16) los frutos fueron sometidos a una técnica de escaldado.

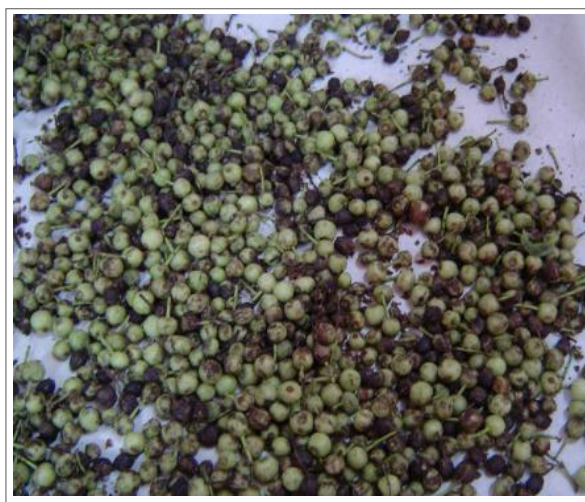


Figura N° 16. Pardeamiento de frutos de YM.

La técnica de escaldado, aplicada para la limpieza e inactivación de enzimas que con el tiempo pueden provocar alteraciones en los productos vegetales, consistió en

colocar los frutos de YM en agua hirviendo por 2 min (aprox. 100 g/l), revolviendo con espátula durante ese tiempo para que fuera homogéneo el tratamiento térmico y luego pasados por agua fría para cortar el tratamiento. Luego se secaron y conservaron en el freezer hasta la elaboración del extracto acuoso (Figura N° 17).



Figura N° 17. Fotografías de frutos de YM escaldados y envasados para su conservación

6.3.2. Obtención de extractos de frutos de YM

El extracto acuoso se preparó con frutos verdes y rojos mezclados, utilizando el método de decocción (Farmacopea Nacional Argentina VIª Edición) con la siguiente modificación: aumentar 4 veces el peso del material vegetal para obtener mayor rendimiento del extracto deshidratado.

- Se colocaron 200 g de frutos de yerba mate en 1.000 ml de agua
- Se hirvió durante 20 min
- Se filtró con gasa o papel Whatman N° 10
- Se llevó a desecación por liofilización.
- Se conserva en frascos cerrados en desecador

Los extractos secos de frutos de YM obtenidos, de Apóstoles (EAFYM₁) y los de Oberá (EAFYM₂), se conservaron por separado de acuerdo con su origen.

6.3.3. Prueba de sensibilidad cualitativa. Método de difusión en medio sólido

6.3.3.1 Preparación de discos de papel con EAFYM: con sacabocados se prepararon discos de papel de filtro Whatman N° 10 (Ø9 mm). Los mismos fueron esterilizados y conservados en lugar seco hasta el momento de utilización.

El polvo obtenido del EAFYM se disolvió en agua destilada estéril. Se prepararon concentraciones de 5, 10, 20 y 40 mg/ml.

Los discos de los extractos en prueba, fueron preparados cargando 20 µl de los EAFYM a diferentes concentraciones (5-40 mg/ml).

Los discos cargados se secaron dentro de placas de Petri estéril en estufa a 37 °C antes de su uso.

6.3.3.2. Cepas utilizadas: esta determinación se realizó sobre el 25 % de las cepas utilizadas en las pruebas de sensibilidad a los ATF comerciales, por el método de difusión en agar. Para ello, se seleccionaron 5 cepas de *T. mentagrophytes* y 5 de *M. canis*.

6.3.3.3. Medio de cultivo: como se indicó en pto. 6.1.1

6.3.3.4. Inóculo fúngico: como se indicó en pto. 6.1.4

6.3.3.5. Extractos utilizados: se probó la actividad antifúngica (AATF) de los extractos de frutos de YM de yerbales de Apóstoles (EAFYM₁) y de Oberá (EAFYM₂).

6.3.3.6. Inoculación de placas de cultivo: como se indicó en pto. 6.1.5

6.3.3.7. Aplicación de discos de EAFYM: como se indicó en pto. 6.1.6

6.3.3.8. Incubación y control de cultivos: como se indicó en pto.6.1.7

6.3.3.9. Medición de halos de inhibición de crecimiento fúngico: como se indicó en pto. 6.1.8

6.3.4. Estudio de la actividad del EAFYM por métodos cuantitativos

Para el estudio cuantitativo, se preparó una solución madre de un pool de frutos de yerba mate a una concentración mucho mayor a la que pudo observarse presentaba cierta actividad antifúngica mediante el estudio cualitativo de difusión en agar.

6.3.4.1 Método de microdilución en medio líquido (MML) (con modificaciones respecto al documento CLSI M38, 3rd ed.)

6.3.4.1.1 Preparación de la Solución madre del EAFYM: se preparó a una concentración de 500 mg/ml, se utilizó como disolvente agua destilada estéril. Como dato adicional de interés, se determinaron los polifenoles totales de dicha solución, que arrojaron un valor de 0,54 g EAG/100 ml, por el método de Folin-Ciocalteu.

6.3.4.1.2. Diluciones del EAFYM: se realizaron diluciones 1:2 de la Solución (Sn) madre del EAFYM en medio RPMI, de manera tal que la concentración más alta fue de 250 mg/ml y la más baja de 0,49 mg/ml.

6.3.4.1.3. Preparación del Inóculo fúngico: se utilizó suspensión de conidios de dermatofitos con concentración final de $1-3 \times 10^3$ UFC/ml, ajustado según se indicó en el pto.6.2.10.

6.3.4.1.4. Carga de las microplacas de cultivo: se dispensaron 100 μ l de las diluciones en RPMI del EAFYM en las columnas de la 1 a la 10 de las microplacas, con una pipeta multicanal. La columna 1 contenía la concentración más alta del extracto (250 mg/ml) y la columna 10 la más baja (0,49 mg/ml). La columna 11 y 12 contenían RPMI, para control de crecimiento y de esterilidad respectivamente.

6.3.4.1.5. Inoculación: se inocularon 100 μ l por pocillo de la placa de microdilución excepto en la columna N° 12 y se produjo una dilución 1:2 de todos los componentes.

6.3.4.1.6. **Incubación:** Las placas inoculadas se incubaron como se indicó para dermatofitos en pto.6.2.12.

6.3.4.1.7. **Lectura de la CIM:** se definió como punto de lectura de CIM la menor concentración que inhibió crecimiento discernible (100 % de inhibición).

Las pruebas de sensibilidad por el método de microdilución se realizaron por duplicado.

6.3.4.2 Método de dilución en medio sólido (MDS) (Derita M. y col, 2007)

6.3.4.2.1. **Medio de cultivo:** se utilizó como medio de cultivo AMH.

6.3.4.2.2. **Solución madre del EAFYM:** como se indicó en pto. 6.3.4.1.1

6.3.4.2.3. **Inóculo fúngico:** como se indicó en pto. 6.3.4.1.3

6.3.4.2.4. **Tubos controles:** se largaron controles de crecimiento y de ATF

- Control de crecimiento: tubo con medio AMH, para evaluar la viabilidad del hongo.

- Control de ATF: se utilizó TERBI como ATF comercial de referencia, a una concentración de 16 mg/l.

6.3.4.2.5. Preparación de batería de tubos de siembra

- El medio de cultivo fue fundido y fraccionado en alícuotas de 500 µl en tubos de Khan estériles.

- Se prepararon series de tubos del medio de cultivo fundido conteniendo diluciones al medio del EAFYM, con una concentración máxima de 125 mg/ml del EAFYM en el primer tubo.

- Se dejó solidificar el medio con el tubo en plano inclinado.

6.3.4.2.6. **Siembra e incubación**

- Se aplicó el inóculo fúngico, con ansa calibrada estéril, sobre la superficie del agar.

- Se incubó a 30 °C durante 96 h con controles diarios.

6.3.4.2.7. **Lectura e interpretación de los resultados**

- Transcurridas 96 h de incubación, se realizó la lectura de los resultados de la AATF del EAFYM evaluado para cada uno de los hongos estudiados.

▪ La lectura consistió en observar a simple vista el desarrollo o no de los hongos inoculados.

- Cuando no hubo coincidencia de la CIM en los tubos duplicados, se procedió a repetir la determinación.

RESULTADOS

1. Determinación de la sensibilidad de hongos dermatofitos a los antifúngicos comerciales por el método de difusión en agar

La prueba se aplicó sobre un total de 40 cepas de hongos dermatofitos. Se trabajó con 8 cepas de la especie *T. rubrum*, 10 cepas del complejo *T. mentagrophytes*, 15 de *M. canis* y 7 de *N. gypsea*.

Las placas de cultivo inoculadas se controlaron mediante observación diaria hasta la obtención de desarrollo fúngico adecuado para la medición de los halos de inhibición (Figura N° 18).

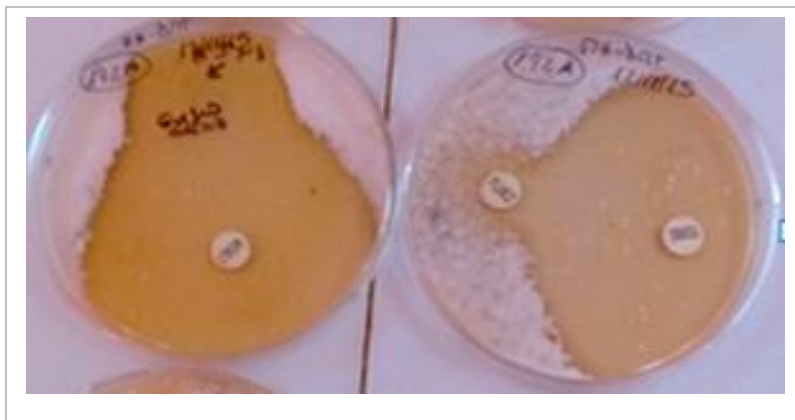


Figura N° 18. Fotografía de cepa de *T. rubrum* con halos de Inhibición nítidos frente a los ATF probados.

Con los antifúngicos comerciales probados, pudo observarse que frente las cepas de *T. mentagrophytes*, los halos de inhibición de mayor diámetro fueron con TERBI, seguido por CTRIM, ITRAC y GRISE. Con el FLUCZ los halos fueron más pequeños (Tabla N° 10).

Tabla Nº 10. Halos de inhibición (mm) de *T. mentagrophytes* frente a los ATF comerciales

Género y especie	Halos de inhibición (mm) frente a los antifúngicos				
	Terbinafina	Fluconazol	Griseofulvina	Itraconazol	Clotrimazol
<i>T. mentagrophytes</i>					
Cepa 1	75	10	33	22	50
Cepa 2	63	9	21	23	44
Cepa 3	74	10	20	30	55
Cepa 4	70	11	21	30	48
Cepa 5	65	10	38	33	50
Cepa 6	70	13	25	34	50
Cepa 7	75	10	21	31	52
Cepa 8	70	11	30	25	48
Cepa 9	66	16	33	35	52
Cepa 10	74	13	25	25	44

Tabla Nº 11. ANOVA. Halos de *T. mentagrophytes* para los diferentes ATF probados.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	20870,1	4	5217,53	265,15	0,0000
Intra grupos	885,5	45	19,6778		
Total (Corr.)	21755,6	49			

Hay diferencias significativas entre los halos de inhibición de las cepas de *T. mentagrophytes* frente a los ATF comerciales evaluados.

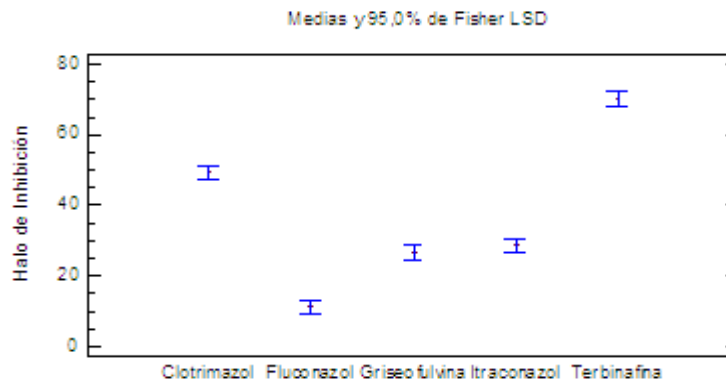


Gráfico Nº 1. Comparación de medias de halos de inhibición de *T. mentagrophytes* para los ATF evaluados. Los límites de confianza se encuentran en distintos niveles.

Con *T. rubrum*, se observaron halos de inhibición de mayor diámetro para TERBI, seguidos de CTRIM, ITRAC y GRISE. El FLUCZ presentó los halos más pequeños, como puede observarse en la tabla N° 12.

Tabla N° 12. Halos de inhibición (mm) de *T. rubrum* frente a los ATF comerciales probados.

Género y especie	Halo de inhibición (mm) frente a los antifúngicos				
<i>T. rubrum</i>	Terbinafina	Fluconazol	Griseofulvina	Itraconazol	Clotrimazol
Cepa 1	60	16	36	40	52
Cepa 2	58	11	38	40	49
Cepa 3	74	24	23	36	50
Cepa 4	70	17	39	27	54
Cepa 5	65	10	25	43	49
Cepa 6	72	11	27	35	51
Cepa 7	65	16	30	30	49
Cepa 8	70	10	28	33	50

Tabla N° 13. ANOVA. Halos de Inhibición de *T. rubrum* para los diferentes ATF probados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	12698,9	4	3174,73	125,29	0,0000
Intra grupos	886,875	35	25,3393		
Total (Corr.)	13585,8	39			

Hay diferencias significativas entre los halos de inhibición de las cepas de *T. rubrum* frente a los ATF comerciales evaluados.

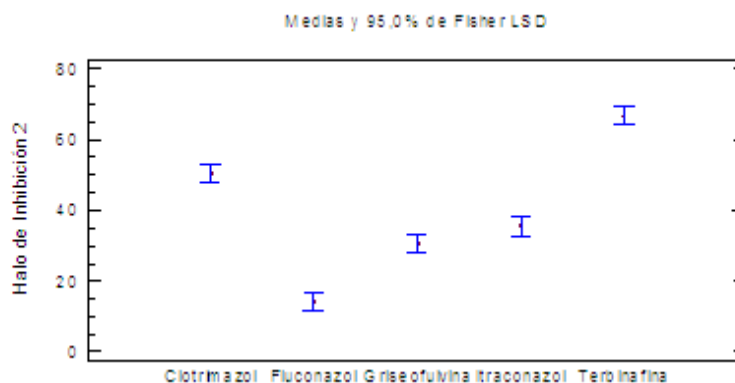


Gráfico N° 2. Comparación de medias de halos de inhibición de *T. rubrum* para los ATF evaluados. Los límites de confianza se encuentran en distintos niveles.

Resultados similares se observaron frente a las cepas de *M. canis* estudiadas; mayor actividad inhibitoria de la TERBI, GRISE, ITRAC y CTRIM, mientras que frente al FLUCZ presentaron halos de inhibición de menor diámetro (Tabla N° 14).

Tabla N° 14. Halos de inhibición (mm) de *M. canis* frente a los ATF comerciales probados.

Género y especie	Halo de inhibición frente a los antifúngicos (mm)				
	Terbinafina	Fluconazol	Griseofulvina	Itraconazol	Clotrimazol
<i>M. canis</i>					
Cepa 1	61	18	35	31	50
Cepa 2	60	10	34	33	57
Cepa 3	61	11	39	30	48
Cepa 4	56	10	36	30	57
Cepa 5	52	16	35	25	49
Cepa 6	53	18	44	28	55
Cepa7	52	10	43	33	50
Cepa 8	55	10	42	24	52
Cepa 9	52	18	44	30	57
Cepa 10	60	17	40	25	56
Cepa 11	55	11	34	33	49
Cepa 12	59	10	42	32	50
Cepa 13	61	15	44	30	53
Cepa 14	60	11	35	31	51
Cepa 15	55	12	36	25	50

Tabla N° 15. ANOVA. Halos de Inhibición de *M. canis* para los diferentes ATF probados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	18767,4	4	4691,85	380,95	0,0000
Intra grupos	862,133	70	12,3162		
Total (Corr.)	19629,5	74			

Hay diferencias significativas entre los halos de inhibición de las cepas de *M. canis* frente a los ATF comerciales evaluados.

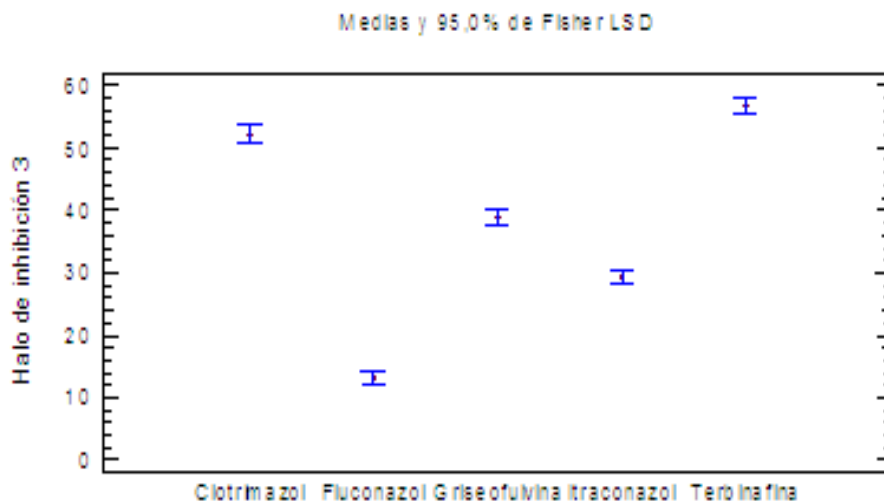


Gráfico N° 3. Comparación de medias de halos de inhibición de *M. canis* para los ATF evaluados. Los límites de confianza se encuentran en distintos niveles.

Frente a las cepas de *N. gypsea*, al igual que con las otras especies de dermatofitos estudiados, presentaron una mejor actividad la TERBI, CTRIM, ITRAC y GRISE, mientras que FLUCZ presentó halos de inhibición de mucho menor diámetro (Tabla N° 16).

Tabla N° 16. Halos de inhibición (mm) de *N. gypsea* frente a los ATF comerciales probados.

Género y especie	Halo de inhibición (mm) frente a los antifúngicos				
	Terbinafina	Fluconazol	Griseofulvina	Itraconazol	Clotrimazol
<i>N. gypsea</i>					
Cepa 1	41	9	19	20	38
Cepa 2	48	18	22	30	55
Cepa 3	56	25	28	31	54
Cepa 4	57	24	32	34	44
Cepa 5	52	10	15	35	50
Cepa 6	48	9	16	37	53
Cepa 7	55	16	18	31	50

Tabla N° 17. ANOVA. Halos de Inhibición de *N. gypsea* para los diferentes ATF probados.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	7092,86	4	1773,21	47,06	0,0000
Intra grupos	1130,29	30	37,6762		
Total (Corr.)	8223,14	34			

Hay diferencias significativas entre los halos de inhibición de las cepas de *N. gypsea* frente a los ATF comerciales evaluados.

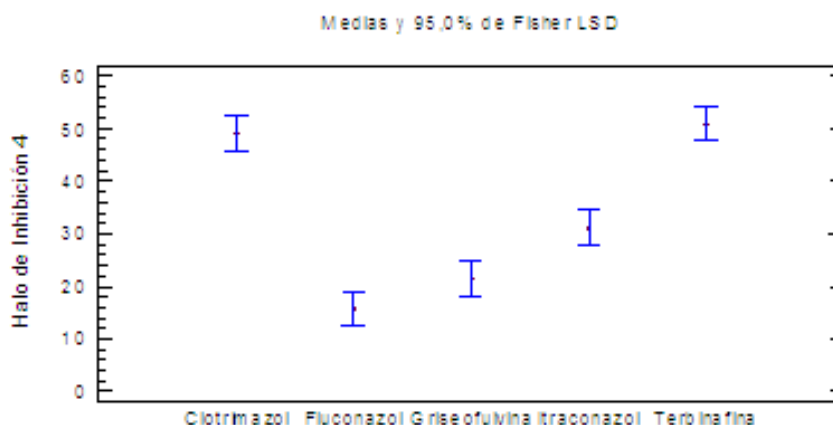


Gráfico N° 4. Comparación de medias de halos de inhibición de *N. gypsea* para los ATF evaluados. Los límites de confianza se encuentran en distintos niveles.

Frente a todas las cepas de las diferentes especies de DMT estudiadas, pudo observarse que TERBI mostró mayor actividad inhibitoria y diferencias significativas con los demás ATF y que FLUCZ mostró menor actividad inhibitoria y diferencias significativas con los demás ATF evaluados.

En la Tabla N° 18, pueden observarse los rangos de halos de inhibición (mm) de crecimiento de los DMT, frente a los ATF comerciales probados.

Tabla N°18. Rango de diámetro de halos de inhibición (mm) de crecimiento de dermatofitos frente a los ATF comerciales probados.

Especie	TERBI	FLUCZ	GRISE	ITRAC	CTRIM
<i>T. mentagrophytes</i> (n: 10) Rango (mm)	63-75	9-16	21-33	22-35	44-52
<i>T. rubrum</i> (n: 8) Rango (mm)	58-74	10-24	23-39	27-43	49-54
<i>M. canis</i> (n: 15) Rango (mm)	52-61	10-18	34-44	24-33	49-57
<i>N. gypsea</i> (n: 7) Rango (mm)	41-57	9-25	15-32	20-37	38-55

2. Determinación de la sensibilidad de hongos dermatofitos al extracto acuoso de frutos de yerba mate (EAFYM) por el método de difusión en agar

Esta prueba se realizó sobre el 25 % de las cepas utilizadas para las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos comerciales, por el método de difusión en agar. Para ello, se seleccionaron 5 cepas del complejo *T. mentagrophytes* y 5 cepas de *M. canis*.

Se probó la actividad antifúngica del extracto acuoso de frutos de YM de yerbales de Apóstoles (EAFYM₁) y Oberá (EAFYM₂).

Pasados los 5-7 días de incubación, los halos de inhibición pudieron ser medidos. En la figura N° 19 puede observarse los halos de inhibición de crecimiento de *T. mentagrophytes* frente al EAFYM₂ e itraconazol utilizado como ATF de referencia.



Figura N° 19. En la fotografía se observan halos de inhibición de *T. mentagrophytes* frente a extractos de frutos de YM (40 mg/ml)

Con los EAFYM utilizados a concentraciones de 5, 10, y 20 mg/ml no se observó AATF alguna frente a las cepas estudiadas.

Con los EAFYM de 40 mg/ml, sin embargo, pudo observarse una actividad inhibitoria frente a las cepas estudiadas como puede apreciarse en la figura N° 19. No se observan halos de inhibición total como en el caso de los ATF de referencia, sino más bien de una acción fungistática.

Los halos de inhibición de crecimiento de las cepas de *T. mentagrophytes* frente a los discos que contenía el EAFYM (40 mg/ml), estuvieron entre 10 y 25 mm, como se observa en la tabla N° 19.

Tabla N° 19. Halos de inhibición (mm) de *T. mentagrophytes* frente a EAFYM a diferentes concentraciones. EAFYM₁: Extracto de frutos YM de Apóstoles/EAFYM₂: Extracto de frutos YM de Oberá.

<i>T. mentagrophytes</i>	EAFYM ₁	EAFYM ₂	EAFYM ₁	EAFYM ₂	EAFYM ₁	EAFYM ₂	EAFYM ₁	EAFYM ₂
	5	5	10	10	20	20	40	40
	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/ml	mg/m	mg/ml	mg/ml	mg/ml
Cepa 1	9	9	9	9	9	9	13	10
Cepa 2	9	9	9	9	9	9	15	15
Cepa 3	9	9	9	9	9	9	20	18
Cepa 4	9	9	9	9	9	9	25	21
Cepa 5	9	9	9	9	9	9	18	18

Tabla N° 20. ANOVA. Halos de Inhibición de *T. mentagrophytes* para los EAFYM probados.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	8,1	1	8,1	0,42	0,5373
Intra grupos	156,0	8	19,5		
Total (Corr.)	164,1	9			

No hay diferencias significativas entre los halos de inhibición de las cepas de *T. mentagrophytes* frente a EAFYM₁ y EAFYM₂.

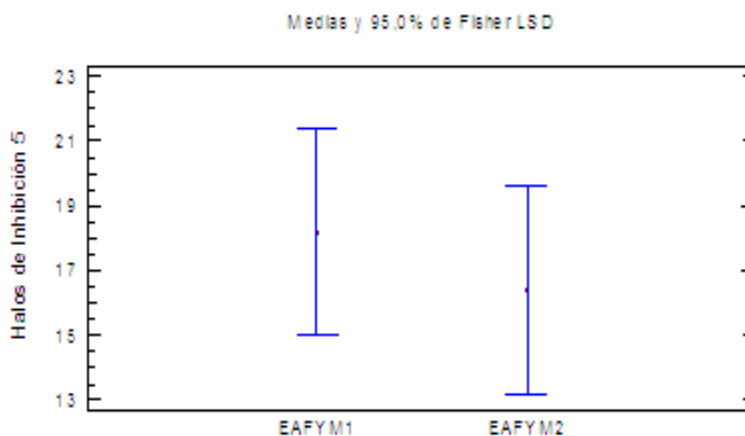


Gráfico N° 5. Comparación de medias de halos de inhibición de *T. mentagrophytes* frente a los EAFYM₁ EAFYM₂. Los límites de confianza se encuentran superpuestos.

Frente a las cepas de *M. canis*, los halos de inhibición de crecimiento, frente a los discos que contenía el EAFYM (40 mg/ml) estuvieron entre 9 y 22 mm, como puede apreciarse en la Tabla N° 21.

Tabla N° 21. Halos de inhibición (mm) de *M.canis* frente a EAFYM a diferentes concentraciones. EAFYM₁: Extracto de frutos YM de Apóstoles. EAFYM₂: Extracto de frutos YM de Oberá.

<i>M. canis</i>	EAFYM ₁	EAFYM ₂	EAFYM ₁	EAFYM ₂	EAFYM ₁	EAFYM ₂	EAFYM ₁	EAFYM ₂
	5 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	20 mg/ml	40 mg/ml	40 mg/ml
Cepa 1	9	9	9	9	9	9	9	10
Cepa 2	9	9	9	9	9	9	13	15
Cepa 3	9	9	9	9	9	9	18	22
Cepa 4	9	9	9	9	9	9	20	15
Cepa 5	9	9	9	9	9	9	15	18

Tabla N° 22. ANOVA. Halos de Inhibición de *M. canis* para los EAFYM probados.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,5	1	2,5	0,13	0,7262
Intra grupos	152,0	8	19,0		
Total (Corr.)	154,5	9			

No hay diferencias significativas entre los halos de inhibición de las cepas de *M. canis* frente a EAFYM₁ y EAFYM₂.

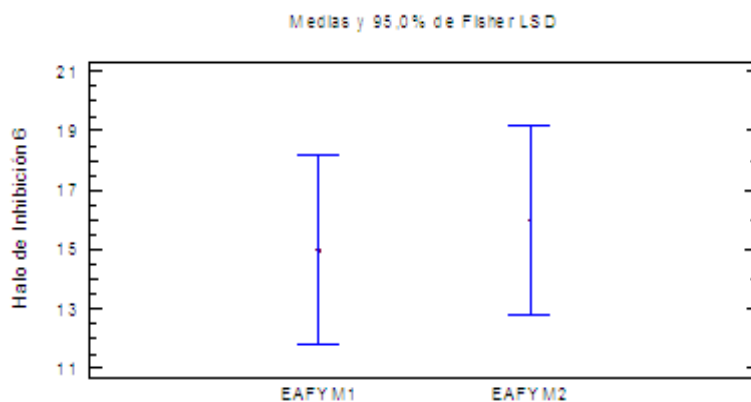


Gráfico N° 6. Comparación de medias de halos de inhibición de *M.canis* para los EAFYM₁ EAFYM₂. Los límites de confianza se encuentran superpuestos.

Los resultados obtenidos con la aplicación de las pruebas de sensibilidad en medio sólido de las cepas de dermatofitos estudiadas, frente al EAFYM, a las diferentes concentraciones probadas, permitieron las siguientes observaciones:

1. No hubo diferencia significativa en los halos producidos frente al EAFYM provenientes de la zona de Apóstoles con los provenientes de Oberá.
2. El EAFYM mostró AATF a una concentración de 40 mg/ml.
3. No se observaron halos de inhibición total como en el caso de los ATF de referencia, sino más bien de una acción fungistática.

Teniendo en cuenta estos resultados, se consideró conveniente para optimizar tiempo, materiales e insumos, trabajar con un pool de EAFYM₁ y EAFYM₂, para la ejecución de las pruebas de sensibilidad en medio líquido. Asimismo, pudo observarse la necesidad de preparar una solución madre de concentración mucho mayor a 40 mg/ml del EAFYM, que permitiera determinar la concentración inhibitoria mínima del extracto vegetal frente a los hongos dermatofitos.

3. Determinación de la sensibilidad de hongos dermatofitos a los antifúngicos comerciales por el método de microdilución en medio líquido

En la aplicación de la técnica de sensibilidad por microdilución, se trabajó con 50 cepas puras de dermatofitos aislados de muestras clínicas. De los cuales, 12 cepas fueron del complejo *T. mentagrophytes*, 13 cepas de *T. rubrum*, 16 cepas de *M. canis*, 6 cepas de *N. gypsea* y 3 cepas de *T. tonsurans*.

Las microplacas inoculadas e incubadas fueron controladas diariamente hasta 96 h.

Lectura a las 24 h

Se pudo observar desarrollo y leer la CIM de los hongos levaduriformes frente a los antifúngicos ensayados. Se pudo observar desarrollo incipiente de los hongos filamentosos no dermatofitos. Los hongos dermatofitos no presentaron desarrollo alguno.

Lectura a las 48 h

Se volvió a leer para confirmar la CIM de hongos levaduriformes, los que no variaron respecto a la lectura de las 24 h de incubación. Se pudo leer la CIM de hongos filamentosos no dermatofitos. No se observó desarrollo de hongos dermatofitos.

Lectura a las 72 h

Se volvió a leer para confirmar CIM de hongos filamentosos no dermatofitos. Se pudo observar desarrollo de hongos dermatofitos que permitió leer las CIM.

Lectura a las 96 h

Transcurrido este tiempo, se leyeron y establecieron las CIM de los antifúngicos ensayados frente a los hongos dermatofitos estudiados (Figura N° 20).

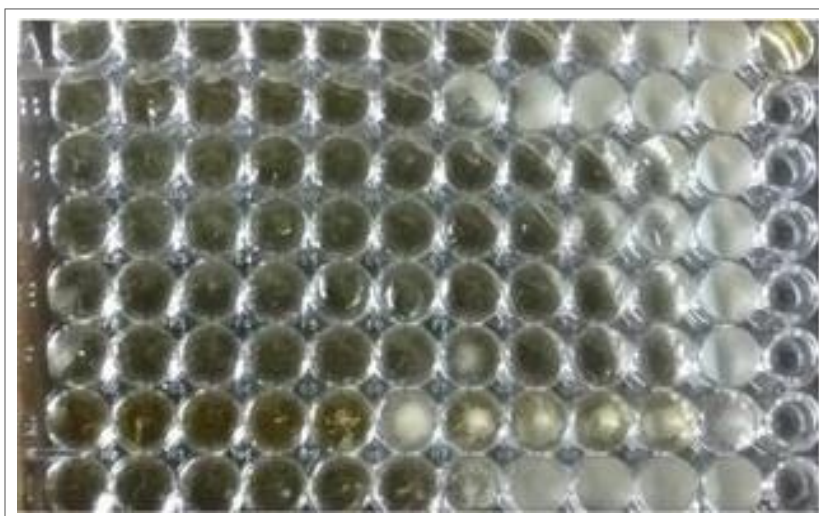


Figura N° 20. Placas de microcultivo con 96 h de incubación. Filas A-F: hongos DMT. Filas G y H: cepas controles del género *Candida* y *Aspergillus*

Los valores de CIM de los ATF comerciales probados, frente a las cepas controles, dieron dentro de los resultados esperables según los documentos de referencia del CLSI.

Las cepas del complejo *T. mentagrophytes* presentaron valores de CIM para TERBI entre 0,03 µg/ml y 0,50 µg/ml, valores comprendidos entre los esperados según las consideraciones realizadas por el CLSI. El ITRAC, presentó valores de CIM entre 0,12 µg/ml y 0,50 µg/ml. El FLUCZ, presentó lecturas de CIM que oscilaron entre 16 a > 64 µg/ml. Los resultados de CIM de los ATF probados pueden verse en la Tabla N° 23.

Tabla N° 23. CIM de los ATF probados frente a las cepas del complejo *T. mentagrophytes*

Género y Especie	CIM (µg/ml) frente a los ATF probados		
	Terbinafina	Itraconazol	Fluconazol
<i>T. mentagrophytes complex</i>			
Cepa 1	0,5	0,12	>64
Cepa 2	0,25	0,5	>64
Cepa 3	0,03	0,5	32
Cepa 4	0,03	0,5	32
Cepa 5	0,5	0,5	16
Cepa 6	0,5	0,5	16
Cepa 7	0,03	0,5	32
Cepa 8	0,03	0,5	32
Cepa 9	0,12	0,25	64
Cepa 10	0,25	0,25	32
Cepa 11	0,03	0,5	32
Cepa 12	0,03	0,25	32

En el caso de las cepas de *T. rubrum* estudiadas frente a la TERBI, los resultados arrojaron valores de CIM entre 0,03 µg/ml y 0,50 µg/ml; frente al ITRAC, valores de CIM entre 0,25 µg/ml a 0,50 µg/ml y para el FLUCZ valores entre 8 µg/ml a

> 64 µg/ml. Los resultados de CIM de los ATF probados pueden verse en la Tabla N° 24.

Tabla N° 24. CIM de los ATF probados frente a las cepas de *T. rubrum*

Género y Especie	Valor de CIM (µg/ml) frente a los ATF probados		
	Terbinafina	Itraconazol	Fluconazol
<i>T. rubrum</i>			
Cepa 1	0,03	0,5	8
Cepa 2	0,5	0,5	>64
Cepa 3	0,06	0,25	>64
Cepa 4	0,5	0,5	>64
Cepa 5	0,03	0,5	16
Cepa 6	0,03	0,5	8
Cepa 7	0,03	0,5	16
Cepa 8	0,06	0,5	16
Cepa 9	0,03	0,5	64
Cepa 10	0,06	0,25	16
Cepa 11	0,5	0,5	32
Cepa 12	0,03	0,25	16
Cepa 13	0,06	0,25	32

En el caso de las cepas de *M. canis*, TERBI presentó valores de CIM entre 0,06-0,12 µg/ml, el ITRAC valores entre 0,50-4 µg/ml, y FLUCZ CIM de 16 a > 64 µg/ml.

Tabla N° 25.

Tabla N° 25. CIM de los ATF probados frente a las cepas de *M. canis*

Género y Especie	Valor de CIM (µg/ml) frente a los ATF probados		
	Terbinafina	Itraconazol	Fluconazol
<i>M. canis</i>			
Cepa 1	0,06	2	16
Cepa 2	0,12	0,5	>64
Cepa 3	0,12	0,5	>64
Cepa 4	0,06	1	16
Cepa 5	0,06	4	16

Cepa 6	0,06	2	32
Cepa 7	0,06	2	16
Cepa 8	0,12	1	64
Cepa 9	0,06	2	32
Cepa 10	0,06	0,5	16
Cepa 11	0,06	2	>64
Cepa 12	0,12	2	32
Cepa 13	0,06	2	>64
Cepa 14	0,12	0,5	>64
Cepa 15	0,25	2	32
Cepa 16	0,06	0,5	16

Con las cepas de *N. gypsea*, TERBI, ITRAC y FLUCZ presentaron CIM entre 0,06-0,25 µg/ml; 1-2 µg/ml; 32 a > 64 µg/ml respectivamente, como se pueden observar en la Tabla N° 26.

Tabla N° 26. CIM de los ATF probados frente a las cepas de *N. gypsea*

Género y Especie	Valor de CIM (µg/ml) frente a los ATF probados		
	Terbinafina	Itraconazol	Fluconazol
<i>N. gypsea</i>			
Cepa 1	0,06	1	32
Cepa 2	0,25	2	>64
Cepa 3	0,06	2	>64
Cepa 4	0,25	2	32
Cepa 5	0,06	1	>64
Cepa 6	0,5	2	32

Frente a las cepas de *T. tonsurans*, TERBI, ITRAC y FLUCZ presentaron valores de CIM entre 0,03-0,06 µg/ml; 0,50-4 µg/ml y > 64 µg/ml respectivamente. Las lecturas están expuestas en la Tabla N° 27.

Tabla N° 27. CIM de los ATF probados frente a las cepas de *T. tonsurans*

Género y Especie	Valor de CIM (µg/ml) frente a los ATF probados		
	Terbinafina	Itraconazol	Fluconazol
<i>T. tonsurans</i>			
Cepa 1	0,06	1	>64
Cepa 2	0,06	0,5	>64
Cepa 3	0,03	4	>64

Los rangos de la CIM de los ATF evaluados, necesarias para inhibir el desarrollo de las distintas especies de dermatofitos estudiadas se muestran en la Tabla N° 28. Puede observarse, en todos los casos, que las concentraciones más bajas correspondieron a TERBI y las más altas a FLUCZ.

Tabla N° 28. Rangos de CIM de los ATF probados frente a distintas especies de DMT

Género y especie	CIM (µg/ml)		
	Terbinafina	Itraconazol	Fluconazol
<i>T. mentagrophytes</i> (n= 12)	0,03 - 0,5	0,12 - 0,5	16 a > 64
<i>T. rubrum</i> (n= 13)	0,03 - 0,5	0,25 - 0,5	8 a > 64
<i>M. canis</i> (n= 16)	0,06 - 0,12	0,5 - 4	16 a > 64
<i>N. gypsea</i> (n= 6)	0,06 - 0,25	1 - 2	32 a > 64
<i>T. tonsurans</i> (n= 3)	0,06 - 0,12	0,5 - 4	> 64

4. Determinación de la sensibilidad de dermatofitos al extracto acuoso de frutos de yerba mate por el método de microdilución en medio líquido (MML)

Determinar la CIM del EAFYM frente a DMT en medio líquido, no fue tarea fácil. Debido a que el EAFYM posee una coloración ámbar oscuro, fue difícil la visualización del crecimiento fúngico a las concentraciones más elevadas del extracto (Figura N° 21).

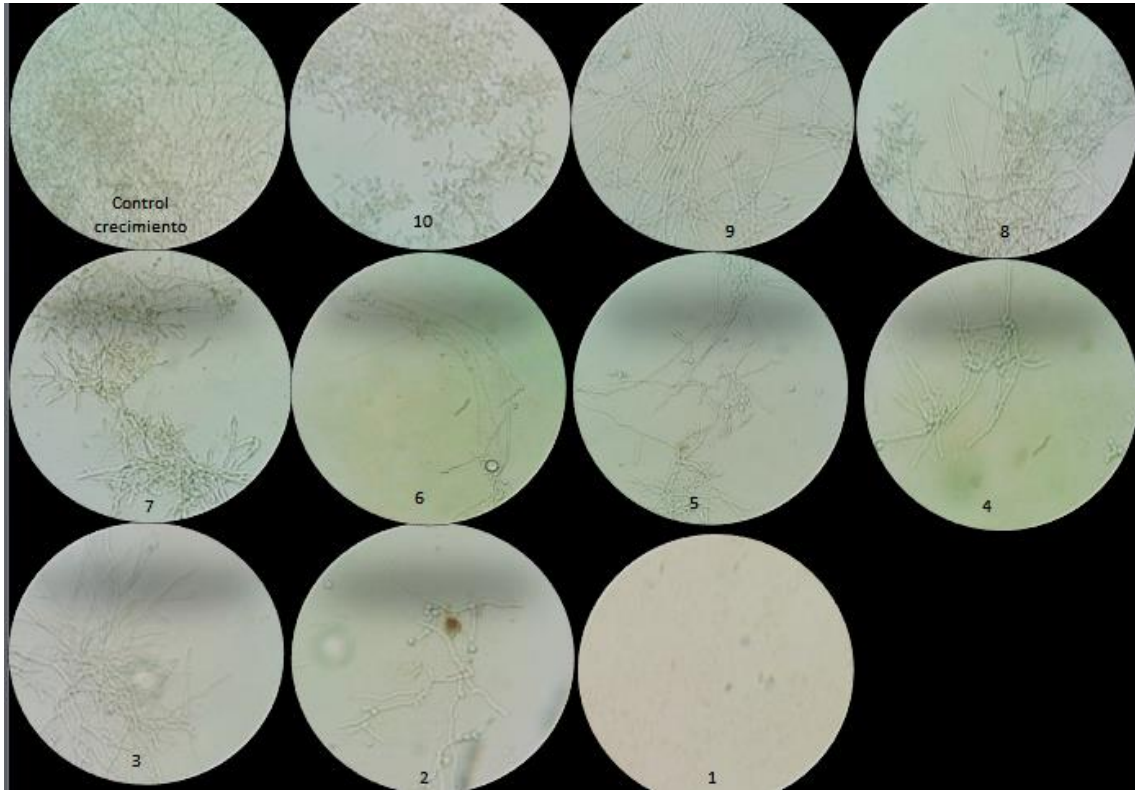
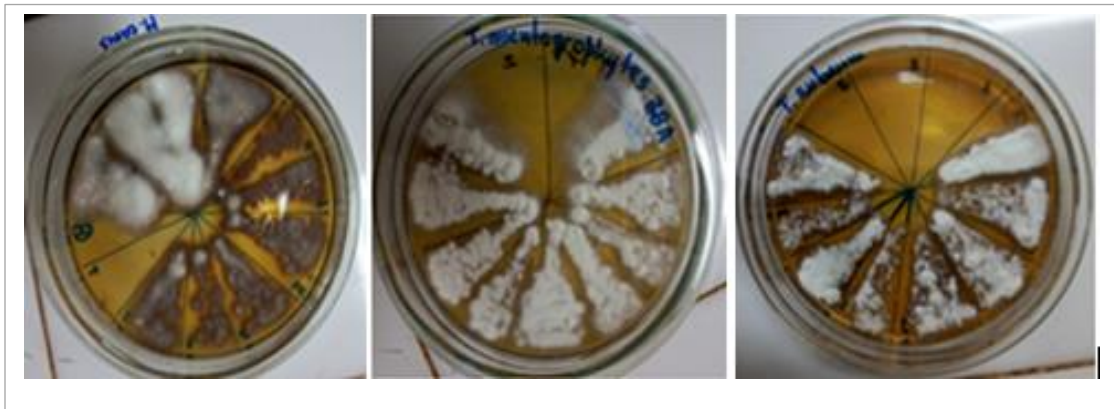


Figura N° 22. Observación microscópica. *T. mentagrophytes*. Puede apreciarse la disminución del desarrollo fúngico a mayor concentración del EAFYM.
Pocillo columna 1: EAFYM 125 mg/ml / Pocillo columna 10: EAFYM 0,25 mg/ml



Figuras N° 23, 24 y 25. Repiques para confirmación de CIM del EAFYM frente a DMT

La concentración mínima del EAFYM que inhibió el desarrollo de las cepas del complejo *T. mentagrophytes* estudiadas presentó valores entre 62,5-125 mg/ml, como se observan en la tabla N° 29.

Tabla N° 29. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *T. mentagrophytes*. MML.

Género y Especie	EAFYM
<i>T. mentagrophytes complex</i>	CIM (mg/ml)
Cepa 1	125
Cepa 2	62,5
Cepa 3	62,5
Cepa 4	125
Cepa 5	125
Cepa 6	125
Cepa 7	62,5
Cepa 8	125
Cepa 9	125
Cepa 10	62,5
Cepa 11	125
Cepa 12	62,5

Frente a *T. rubrum*, el EAFYM presentó valores de CIM que oscilaron entre 31,25 y 125 mg/ml. Tabla N° 30.

Tabla N° 30. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *T. rubrum* estudiadas. MML.

<i>T. rubrum</i>	CIM (mg/ml)
Cepa 1	125
Cepa 2	62,5
Cepa 3	31,25
Cepa 4	62,5
Cepa 5	31,25
Cepa 6	62,5
Cepa 7	125

Cepa 8	125
Cepa 9	125
Cepa 10	125
Cepa 11	31,25
Cepa 12	62,5
Cepa 13	62,5

Frente a *M. canis*, el EAFYM presentó valores de CIM que oscilaron entre 62,5 y 125 mg/ml. Tabla N° 31.

Tabla N° 31. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *M. canis* estudiadas. MML.

Género y Especie	EAFYM
<i>M. canis</i>	CIM (mg/ml)
Cepa 1	125
Cepa 2	125
Cepa 3	125
Cepa 4	125
Cepa 5	125
Cepa 6	125
Cepa 7	62,5
Cepa 8	125
Cepa 9	125
Cepa 10	125
Cepa 11	125
Cepa 12	125
Cepa 13	125
Cepa 14	125
Cepa 15	125
Cepa 16	125

Frente a las cepas de *N. gypsea* estudiadas, el EAFYM presentó una CIM de 125 mg/ml. Tabla N° 32.

Tabla N° 32. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *N. gypsea* estudiadas. MML.

Género y Especie <i>N. gypsea</i>	EAFYM CIM (mg/ml)
Cepa 1	125
Cepa 2	125
Cepa 3	125
Cepa 4	125
Cepa 5	125
Cepa 6	125

Con las cepas de *T. tonsurans*, el EAFYM presentó CIM de 125 mg/ml. Tabla N° 33.

Tabla N° 33. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *T. tonsurans* estudiadas. MML.

Género y Especie <i>T. tonsurans</i>	EAFYM CIM (mg/ml)
Cepa 1	125
Cepa 2	125
Cepa 3	125

5. Determinación de la sensibilidad de dermatofitos al extracto acuoso de frutos de yerba mate por el método de dilución en medio sólido (MDS)

El método de dilución en agar permitió fácilmente la lectura e interpretación de los resultados de CIM. Transcurrida 96 h de incubación, se observó a simple vista el desarrollo o no de los hongos inoculados (Figura N° 26).

En los casos en que la CIM no coincidió con su duplicado, se procedió a repetir la prueba.

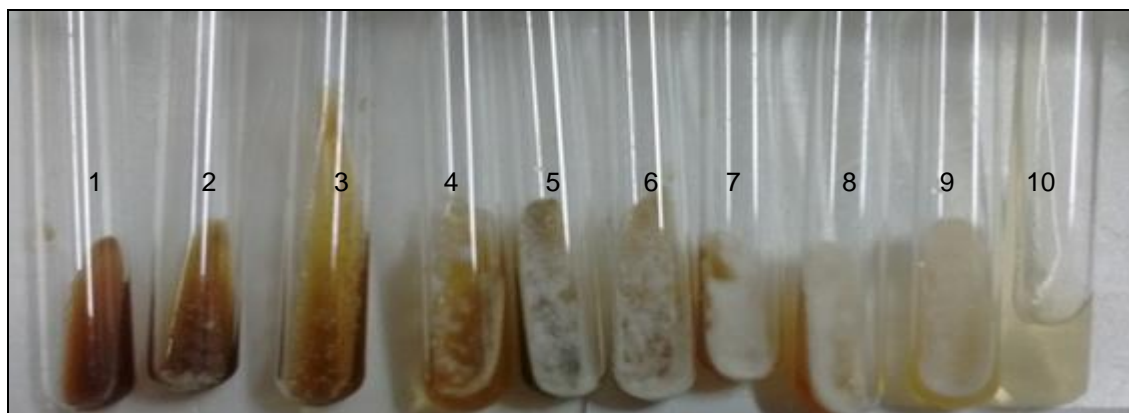


Figura N° 26. CIM= 125mg/ml del EAFYM frente a *T. mentagrophytes* (Cepa 1). MDS.
Tubos del 1 al 8: diluciones del EAFYM de 125 a 0,975 mg/ml
Tubo 9: control de crecimiento fúngico.
Tubo 10: control de ATF de referencia (Terbinafina)

La concentración mínima del EAFYM que inhibió el desarrollo de las cepas del complejo *T. mentagrophytes* por el método de dilución en medio sólido (MDS), presentó valores entre 62,5-125 mg/ml, como se observan en la tabla N° 34.

Tabla N° 34. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *T. mentagrophytes*. MDS.

Género y Especie <i>T. mentagrophytes complex</i>	EAFYM CIM (mg/ml)
Cepa 1	125
Cepa 2	62,5
Cepa 3	62,5
Cepa 4	125
Cepa 5	125
Cepa 6	62,5
Cepa 7	125
Cepa 8	125
Cepa 9	125
Cepa 10	62,5
Cepa 11	125
Cepa 12	62,5

Frente a *T. rubrum*, el EAFYM presentó valores de CIM que oscilaron entre 31,25 y 125 mg/ml. Tabla N° 35.

Tabla N° 35. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *T. rubrum* estudiadas. MDS.

Género y Especie <i>T. rubrum</i>	EAFYM CIM (mg/ml)
Cepa 1	125
Cepa 2	62,5
Cepa 3	31,25
Cepa 4	62,5
Cepa 5	62,5
Cepa 6	62,5

Cepa 7	125
Cepa 8	125
Cepa 9	125
Cepa 10	125
Cepa 11	31,25
Cepa 12	62,5
Cepa 13	62,5

Frente a *M. canis*, el EAFYM presentó valores de CIM que oscilaron entre 62,5 y 125 mg/ml. Tabla N° 36.

Tabla N° 36. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *M. canis* estudiadas. MDS.

Género y Especie <i>M. canis</i>	EAFYM CIM (mg/ml)
Cepa 1	125
Cepa 2	62,5
Cepa 3	125
Cepa 4	125
Cepa 5	125
Cepa 6	125
Cepa 7	62,5
Cepa 8	125
Cepa 9	125
Cepa 10	62,5
Cepa 11	125
Cepa 12	125
Cepa 13	125
Cepa 14	125
Cepa 15	125
Cepa 16	125

Frente a las cepas de *N. gypsea* estudiadas, el EAFYM presentó una CIM de 125 mg/ml. Tabla N° 37.

Tabla N° 37. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *N. gypsea* estudiadas. MDS.

Género y Especie <i>N. gypsea</i>	EAFYM CIM (mg/ml)
Cepa 1	125
Cepa 2	125
Cepa 3	125
Cepa 4	125
Cepa 5	125
Cepa 6	125

Con las cepas de *T. tonsurans*, el EAFYM presentó una CIM de 62,5 a 125 mg/ml.

Tablas N° 38.

Tabla N° 38. CIM del EAFYM probado frente a las cepas de *T. tonsurans* estudiadas. MDS.

Género y Especie <i>T. tonsurans</i>	EAFYM CIM (mg/ml)
Cepa 1	62,5
Cepa 2	125
Cepa 3	125

DISCUSIÓN

Las micosis cutáneas constituyen un importante problema en la población mundial de todas las edades. Las más frecuentes son las ocasionadas por los hongos queratinofílicos dermatofitos, que según su localización se manifiestan por afección pilar, engrosamiento ungueal o por placas con eritema y descamación en piel; la invasión profunda es excepcional (Rubio Calvo y cols., 2007; Medvedeff y cols., 2003; Nardin y cols., 2006; Cuétara, 2007; Mereles Rodríguez. y cols., 2013; Arenas, 2014).

El tratamiento de las micosis en general es largo y tedioso. Los azoles y las alilaminas, son considerados efectivos en la terapia antifúngica de las micosis de piel lampiña, pero la onicomycosis continúa siendo un problema. El tratamiento de las micosis ungueales es complejo y muchas veces insatisfactorio; requiere de tratamientos prolongados, costosos y con numerosos efectos colaterales (Llambrich y cols., 2002; Negroni, 2008).

En la búsqueda de nuevos compuestos de acción antifúngica y menor toxicidad que las actuales, han encontrado muy buena acogida los productos de origen natural, inmensa fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica (Thomson y cols., 2011).

I. paraguariensis, es una planta que crece fundamentalmente en Argentina, y otros países de Sudamérica cuyas hojas y tallos se procesan para obtener la yerba mate, la que es consumida como una infusión muy popular en estas regiones. Numerosas publicaciones dan cuenta acerca de las propiedades biomédicas y farmacológicas de *I. paraguariensis*, pero pocas acerca de la posibilidad de su utilización como un antimicrobiano natural; es un concepto que aún no ha sido estudiado y analizado en profundidad (Schapovaloff, 2009; Burris, 2011). Sobre sus frutos, que constituyen un residuo en la industria yerbatera, existen muy pocos estudios científicos realizados en

cuanto a sus propiedades fitoquímicas y/o farmacológicas (Cogoi, 2016); y prácticamente nulos sobre la capacidad antimicrobiana de los mismos.

A pesar de la comunicación de casos con mala respuesta terapéutica en la dermatofitosis, existen insuficientes publicaciones sobre estudios de sensibilidad/resistencia de los dermatofitos frente a los antifúngicos de uso habitual en la práctica médica (Serrano-Martino, 2003; Méndez-Tovar y cols., 2007; Manzano Gayosso y cols., 2008; Santos y cols., 2010; Pérez Cárdenas y cols., 2013; Díaz Jarabrán y cols., 2015).

En la Provincia de Misiones (Argentina), antes del presente trabajo, no se han publicado estudios sobre la sensibilidad frente a los ATF de hongos dermatofitos aislados de muestras clínicas. La realización de las mismas permitirá el conocimiento del perfil de sensibilidad/resistencia de las especies fúngicas circulantes en la región.

Con la ejecución de las pruebas de sensibilidad por el método cualitativo (difusión en agar) pudo observarse que frente las cepas del complejo *T. mentagrophytes*, los halos de inhibición de mayor diámetro (mm) fueron con TERBI (63-75), seguido por CTRIM (44-52), ITRAC (22-35) y GRISE (21-33). Con el FLUCZ los halos fueron más pequeños (9-16). Resultados comparables, a los publicados por otros autores (Manzano Gayosso y cols., 2008; Santos y cols., 2010; Pérez Cárdenas y cols., 2013).

Con *T. rubrum*, se observaron halos de inhibición de mayor diámetro (mm) para TERBI (58-74), seguidos de CTRIM (49-54), ITRAC (27-43) y GRISE (23-39). El FLUCZ presentó halos más pequeños (10-24). Los resultados fueron similares a los obtenidos con la aplicación de otras técnicas, por autores como Manzano Gayosso y cols. y Gross Martinez y cols.

Resultados similares se observaron frente a las cepas de *M. canis* estudiadas, con mayor diámetro (mm) de halo de inhibición de crecimiento con la TERBI (56-61), CTRIM (49-57), GRISE (34-44) e ITRAC (24-33); mientras que frente al FLUCZ presentaron halos de inhibición de menor diámetro (10-18). Estos resultados son similares a los obtenidos por Santos y cols. Colella M.T y cols., informaron para TERBI y FLUCZ resultados similares a los nuestros, sin embargo, para GRISE reportaron baja sensibilidad y ninguno de sus aislamientos fue sensible al ITRAC.

Frente a las cepas de *N. gypsea*, al igual que con las otras especies de DMT estudiados, presentaron una mejor actividad la TERBI con halos de inhibición de 41 a 57 mm, CTRIM de 38 a 55 mm, ITRAC de 20 a 37 mm y GRISE de 15 a 32 mm, mientras que FLUCZ presentó halos de inhibición de mucho menor diámetro (9 a 25 mm), al igual que las otras especies de DMT estudiadas. Estos resultados son comparables a los publicados por Trejos López y Manzano Gayosso.

Si bien frente a los hongos DMT, no existen puntos de corte de los ATF probados por el método de difusión en agar; además, la aplicación de esta técnica en hongos de crecimiento lento que dificultan el estudio; se pudo interpretar que TERBI es la droga que presentó mayor actividad antifúngica, mientras que FLUCZ es el ATF que presentó menor actividad, ante las cepas de dermatofitos estudiadas.

Mediante las pruebas de sensibilidad cuantitativas por el método de microdilución pudo establecerse que las cepas del complejo *T. mentagrophytes* presentaron valores de CIM para TERBI entre 0,03 µg/ml y 0,50 µg/ml, valores coincidentes con los informados por otros autores tales como Serrano-Martino (2003), Santos y cols. (2010), Perez-Cardenas y cols. (2013), Díaz Jarabrán y cols. (2015), Manzano Gayosso y cols. (2015). Sin embargo, son más altos que los comprendidos dentro del rango establecido para *T. mentagrophytes* ATCC MYA-4439, en el documento del CLSI M61, 1st ed., en el cual se

informa un rango de 0,002-0,008 µg/ml. El ITRAC, presentó un rango de CIM entre 0,12 µg/ml y 0,50 µg/ml, valores similares a los comunicados por autores como Díaz Jarabrán y Perez-Cardenas y cols. Manzano Gayosso publicó valores de 0,03-2 µg/ml y Santos valores entre 0,125 µg/ml y 4 µg/ml. Asimismo, los valores de CIM obtenidos están comprendidos dentro del rango establecido para la combinación *T. mentagrophytes* ATCC MYA-4439/ITRAC en el documento del CLSI M61, 1st ed., donde se informa valores entre 0,03 µg/ml y 0,25 µg/ml. El FLUCZ, presentó lecturas de CIM que oscilaron entre 16 a > 64 µg/ml, valores comparables a los de Perez-Cardenas, que informa una CIM de 32-64 µg/ml; muy inferiores a los publicados por Santos que van de 64-128 µg/ml y muy discordantes con los informados por Díaz Jarabrán que van de 0,25-1µg/ml.

En el caso de las cepas de *T. rubrum* frente a la TERBI, los resultados arrojaron valores de CIM entre 0,03 µg/ml y 0,50 µg/ml; frente al ITRAC, valores de CIM entre 0,25 µg/ml a 0,50 µg/ml y para el FLUCZ valores entre 8 µg/ml a > 64 µg/ml. Estos resultados son similares a los publicados para TERBI e ITRAC por Díaz Jarabrán, Perez-Cardenas, Manzano Gayosso y Santos. En el caso del FLUCZ, los valores hallados son coincidentes con los de Perez-Cardenas; inferiores a los publicados por Santos y cols. y se observó mucha discrepancia con lo publicado por Díaz Jarabrán, Gross Martínez y cols. (2014) y Manzano Gayosso que comunicaron CIM muy inferiores a nuestros resultados. En el documento del CLSI M61, 1st ed., para la combinación *T. rubrum* ATCC MYA-4438/FLUCZ se informa un rango entre 0,5 µg/ml y 4 µg/ml.

En el caso de las cepas de *M. canis*, TERBI presentó valores de CIM entre 0,06-0,12 µg/ml, el ITRAC valores entre 0,50 y 4 µg/ml, y FLUCZ CIM de 16 a > 64 µg/ml. Serrano-Martino y cols. (2003) y Santos y cols. publicaron valores comparables a los encontrados en el presente estudio. Manzano Gayosso, informó resultados

similares para TERBI e ITRAC, sin embargo para FLUCZ, informó un rango de 2-8 µg/ml.

Con las cepas de *N. gypsea*, TERBI, ITRAC y FLUCZ presentaron CIM entre 0,06-0,25 µg/ml; 1-2 µg/ml; 32 a > 64 µg/ml. Los resultados obtenidos para TERBI e ITRAC son similares a los de Manzano Gayosso y Serrano Martino. Este último autor, informa CIM muy similares en el caso de FLUCZ frente a esta especie fúngica.

Frente a las cepas de *T. tonsurans*, TERBI, ITRAC y FLUCZ presentaron valores de CIM de 0,03-0,06 µg/ml; 0,50-4 µg/ml y > 64 µg/ml respectivamente. Manzano Gayosso, así como Santos y cols., informaron frente a este dermatofito valores de CIM comparables aunque inferiores a los encontrados en el presente estudio para los dos primeros ATF. Para FLUCZ los valores de CIM son comparables a los de Santos y cols., mientras que Manzano Gayosso y cols. presentaron valores muy inferiores de CIM.

En general, se puede decir que frente a las cepas de DMT estudiadas, TERBI fue el antifúngico más activo (CIM entre 0,03 y 0,50 µg/ml), seguida por ITRAC (CIM entre 0,12 y 4 µg/ml). El FLUCZ fue el agente que mostró menor AATF (CIM entre 8 y > 64 µg/ml).

Estos resultados aportan la primera base de datos sobre estudios de sensibilidad *in vitro* por el método de microdilución en caldo para determinar la sensibilidad de los DMT frente algunos de los ATF usados frecuentemente en la clínica médica.

La evaluación de extractos vegetales sobre la inhibición de microorganismos a nivel *in vitro* es la primera fase que indica el potencial prometedor de una planta para ser usada como antimicrobiano natural. El estudio de la actividad antifúngica de los EAFYM por el método de difusión, frente a cepas de *T. mentagrophytes* y de *M. canis*, se observó que tanto el EAFYM₁ como el EAFYM₂, preparados a una concentración de 40 mg/ml, presentaron actividad inhibitoria frente a las cepas estudiadas, aunque que no se

observaron halos de inhibición total como en el caso de los ATF comerciales de referencia, sino más bien, de una acción fungistática. Teniendo en cuenta estos resultados, se consideró conveniente para optimizar tiempo, materiales e insumos, trabajar con un pool de EAFYM₁ y EAFYM₂, para la ejecución de las pruebas de sensibilidad cuantitativas. Asimismo pudo observarse la necesidad de preparar una solución madre del EAFYM de concentración mucho mayor a 40 mg/ml, que permitiera determinar la CIM del extracto vegetal frente a los hongos dermatofitos.

Al no existir técnica estandarizada para el estudio de extractos vegetales por el método de dilución en caldo, se implementaron modificaciones a lo propuesto en el documento del CLSI M38, 3rd ed. Se partió de una solución madre del EAFYM con una concentración de 500 mg/ml y se realizaron diluciones de manera tal que la concentración más alta evaluada fue de 250 mg/ml y la más baja de 0,49 mg/ml y se definió como punto de lectura de CIM la menor concentración que inhibió crecimiento fúngico discernible. Sin embargo, por este método, resultó difícil la visualización del crecimiento fúngico a las concentraciones más elevadas del extracto, debido a coloración ámbar oscuro del EAFYM. Liu y cols. (2007) y Ruiz Quiróz (2013), en estudios de determinación de la actividad antifúngica de extractos de plantas, trabajaron con modificaciones del método de microdilución en caldo propuesto por el CLSI, e incluyeron como indicador colorimétrico la resazurina, con muy buenos resultados. En este trabajo, para zanjar la dificultad presentada en la lectura de la CIM del EAFYM frente a los DMT, se realizaron observaciones microscópicas y repiques de los cultivos en las diferentes concentraciones del EAFYM para establecer certeramente la CIM.

La aplicación de la técnica cuantitativa de dilución en agar, propuesta por Derita y cols. (2007), no presentó inconveniente alguno en la interpretación y determinación de la CIM del EAFYM frente a los DMT estudiados.

La CIM del EAFYM que inhibió el desarrollo fúngico de las cepas del complejo *T. mentagrophytes* estudiadas presentó valores entre 62,5 y 125 mg/ml. Frente a *T. rubrum*, el EAFYM presentó valores de CIM que oscilaron entre 31,25 y 125 mg/ml. Con *M. canis*, y *T. tonsurans* el EAFYM presentó valores de CIM que oscilaron entre 62,5 y 125 mg/ml. Frente a las cepas de *N. gypsea* estudiadas, el EFYM presentó una CIM de 125 mg/ml.

Otros estudios lograron demostrar la acción antifúngica de extractos acuosos de hojas de *I. paraguariensis*. Filip y cols. (2010) encontraron actividad inhibitoria sobre *Malassezia furfur* a una concentración de 1000 mg/ml; Medvedeff y cols. (2013) observaron 80 % de inhibición de crecimiento de la especie fúngica *Fusarium oxysporum*, a una concentración de 60 mg/ml del extracto vegetal. Concentraciones inhibitorias comparables a los encontrados en el presente estudio. Sin embargo, Burris, (2011) publicó muy buena actividad antimicrobiana de *I. paraguariensis* sobre *E. coli* y *S. aureus* y determinó que las concentraciones bactericidas mínimas eran aproximadamente de 150 a 800 µg/ml y de 25 a 50 µg/ml respectivamente.

Ruiz Quiroz (2013) demostró que los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de las hojas de *Ilex guayusa* poseen actividad inhibitoria frente a cepas de *Candida* y *M. canis* a concentraciones que oscilaban entre 62,5 a 250 µg/ml.

No se encontraron publicaciones sobre la actividad antifúngica de los frutos de *I. paraguariensis* en la bibliografía consultada.

Los resultados de esta investigación constituyen la primera base de datos sobre estudios de sensibilidad a los antifúngicos de hongos dermatofitos aislados de muestras clínicas en la provincia de Misiones.

Se pudo demostrar la AATF *in vitro* del extracto acuoso de los frutos de *I. paraguariensis*. Se observó que se necesitaron EAFYM de concentraciones que oscilaron

entre 31,25 y 125 mg/ml para inhibir el desarrollo de las cepas de dermatofitos estudiadas.

Varios autores han estudiado la relación entre el contenido de polifenoles y la actividad antimicrobiana, y encontraron asociación entre ellos en diferentes tipos de extractos de hojas de *Ilex paraguariensis*; extractos de hojas y frutos de otras especies de *Ilex* y otras plantas (Rinsdah, 2006; Sotelo Casas, 2010; Burris, 2011; Prado y cols., 2013). Haraguchi y cols. (1999) atribuyó la acción antimicrobiana del género *Ilex* a los triterpenos, en especial al ácido rotúndico.

Teniendo en cuenta esta asociación, y que en el presente estudio, la concentración de los fenoles totales medidos en los extractos acuosos de frutos de *I. paraguariensis*, fue inferior al informado por otros autores en extractos vegetales con buena actividad antimicrobiana, se considera conveniente utilizar, en futuros estudios, otros métodos extractivos, así como la identificación y separación de los componentes activos de los frutos de la yerba mate, para mejorar la capacidad antifúngica encontrada en este trabajo.

La actividad antifúngica de los frutos de *I. paraguariensis*, demostrada en el presente trabajo de tesis; sumada a los resultados obtenidos por otros autores en ensayos que demostraron ausencia de efectos tóxicos agudos en animales de experimentación (Cogoi, 2016); permiten considerar a estos frutos, con posibilidad de ser usados en la elaboración de medicamentos naturales aptos para el tratamiento de micosis frecuentes en la población.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

1. El método de difusión en agar para el estudio de la sensibilidad de los hongos dermatofitos a los antifúngicos comerciales, permite la observación de halos de inhibición de crecimiento fácilmente medibles; sin embargo, es menester realizar el método cuantitativo por microdilución.
2. El método de difusión en agar para el estudio de la sensibilidad de los hongos dermatofitos al EAFYM, permite la observación de actividad fungistática; sin embargo, no resulta óptimo para el establecimiento cabal de la actividad antifúngica del extracto vegetal.
3. El método cuantitativo de microdilución (Documento CLSI M38, 3rd ed.), aunque laborioso, es óptimo para el estudio de la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos, de hongos dermatofitos.
4. La terbinafina es el antifúngico más activo, seguida por itraconazol, frente a las cepas de dermatofitos estudiadas.
5. El fluconazol es la droga con menor actividad antifúngica frente a los dermatofitos estudiados.
6. El método de microdilución en caldo, aunque engorroso, permite discernir adecuadamente la CIM del EAFYM de los hongos dermatofitos.
7. El método de dilución en agar, permite establecer fácilmente la CIM del EAFYM de los hongos dermatofitos.
8. La CIM del EAFYM frente a las cepas de *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis*, *N. gypsea* y *T. tonsurans*, oscilan entre 31,25 y 125 mg/ml.
9. El EAFYM posee actividad antifúngica *in vitro* frente a los hongos dermatofitos, en concentraciones mucho mayores a los ATF comerciales tomados como referencia.

10. Ninguna de las cepas de dermatofitos estudiadas presentan resistencia frente al EAFYM a 125 mg/ml.

REFLEXIÓN FINAL

Los resultados obtenidos aportan, la primera base de datos sobre estudios de sensibilidad a los antifúngicos de hongos dermatofitos aislados de muestras clínicas en la provincia de Misiones. Sin lugar a dudas, es necesario continuar el estudio con un mayor número de cepas aisladas de muestras clínicas, para el conocimiento cabal del perfil de sensibilidad a los antifúngicos de los hongos dermatofitos autóctonos. Este tipo de estudios contribuirán en la obtención de información útil en la elección del tratamiento empírico, en el tratamiento directo y en la implementación de medidas de prevención de las dermatofitosis.

Los resultados logrados, constituyen un importante aporte en el conocimiento científico de la actividad antimicrobiana de los frutos de *I. paraguariensis*, objetivo principal de este trabajo de tesis.

Se pudo demostrar que los frutos de *I. paraguariensis* poseen actividad antifúngica sobre las cepas de dermatofitos estudiadas. La ejecución del proyecto permitió la adquisición de experiencia e información importante para continuar con el estudio de la actividad antifúngica de los frutos de yerba mate.

Es posible y necesario el desarrollo de trabajos de investigación con la aplicación de otros métodos extractivos, así como la identificación y separación de los componentes activos de los frutos de la *I. paraguariensis* con capacidad antifúngica sobre los hongos dermatofitos, otros hongos filamentosos y levaduriformes involucrados en diferentes tipos de micosis.

Profundizar en el estudio de las propiedades farmacológicas de los extractos de frutos de yerba mate permitirá, sin lugar a dudas, posicionarlos entre los productos naturales con capacidad de ser utilizados para el mejoramiento del arsenal de fármacos

antimicóticos; y con la realización de los estudios *in vivo* correspondientes, se podrá contar con un antifúngico de menor costo y efectos colaterales que los disponibles en la actualidad, al tiempo que se preservará un recurso vegetal autóctono medicinal.

Asimismo, la factibilidad desde el punto de vista científico de la producción de un agente fungicida a partir de los frutos de *I. paraguariensis*, que en la actualidad son considerados desechos de la industria yerbatera, podrá impactar positivamente en la economía regional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allevato, M., Negroni, R. & Galimberti, R. (2007). Antifúngicos Ayer, hoy y mañana. *Actualizaciones Terapéuticas Dermatológicas*, 30(8), 8-17. Recuperado de http://www.atdermae.com/pdfs/atd_30_01_02.pdf.
- Arenas, R. (2014). *Micología Médica Ilustrada*. Madrid, España: Ed. Mc Graw Hill. 5ª ed.
- Ausina Ruiz, V. & Moreno Guillén S. (2006) *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Buenos Aires; Madrid: Ed. Médica Panamericana.
- Ballesté, R., Mousqués N. & Gezuele E. (2003). Onicomycosis. Revisión del tema. *Revista Médica del Uruguay*, 19, 93-106.
- Bonifaz, A. (2012). *Micología Médica Básica*. Madrid, España: Ed. Mac Graw Hill. 4ª ed. p. 119-120.
- Bottinelli, M. (2007). La producción de conocimiento y las publicaciones científicas en la práctica profesional. En: Cuadernos de trabajo del Centro de Investigaciones en Teorías y Prácticas Científicas. Nº 6: p. 83-85. Epistemología y Metodología. UNLa.
- Burris, K. (2011). Antimicrobial activity of aqueous Yerba Mate extracts. PhD diss., University of Tennessee. Recuperado de http://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/954
- Caballero Martínez, F., Moreno, J. & López Rocha, A. (2005) *Guía de Buena Práctica Clínica en Infecciones fúngicas*. Madrid, España: Editorial International Marketing & Communication.

- Cabañes Saenz, F. (2007) Identificación de hongos dermatofitos. Revista Iberoamericana de Micología. Asociación española de Micología. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Ed. Revista Iberoamericana de Micología. Cap 12.
- Cantón Lacasa, E., Martín Mazuelos, E. & Espinel-Ingroff A. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Ed. Revista Iberoamericana de Micología. Cap 15.
- Carrillo-Muñoz, A.J., Tur-Tur, C., Hernández-Molina, J. M., Santos, P., Cárdenes, D. & Giusiano, G. (2010). Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. *Revista iberoamericana de Micología*, 27(2), 49-56.
- Carrillo-Muñoz, A. J., Tur-Tur, C., Cárdenes, D., Rojas, F., & Giusiano, G. (2013). Influencia del grupo ecológico sobre la sensibilidad *in vitro* de los hongos dermatofitos a los antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(2), 130-133.
- Castro Méndez, C., García Sánchez, E. & Martín-Mazuelos, E. (2019). Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37(Supl 1), 32-39.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2010). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Nondermatophyte Filamentous Fungi; Approved Guideline. CLSI document M51-A. Wayne, PA, USA.

- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. Fourth International supplement. CLSI document M27, 4th ed. Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*. CLSI document M38, 3rd ed. Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2017). *Performance Standards for Antifungal susceptibility Testing of Filamentous Fungi*. CLSI document M61, 1st ed. Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts*. CLSI document M44, 3rd ed. Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Epidemiological cutoff values for antifungal susceptibility testing*. CLSI document M59, 2nd ed. Wayne, PA, USA.
- Cogoi, L. (2016) Potencial biofarmacéutico de los frutos de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire (Aquifoliaceae): fitoquímica y actividades biológicas relacionadas. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Departamento de Farmacología. Cátedra de Farmacognosia. Recuperado de http://repositorioubi.sisbi.uba.ar/gsd/collect/posgrauba/index/assoc/HWA_1421.dir/1421.PDF
- Cogoi, L., Giacomino, M., Pellegrino, N., Anesini, C. & Filip, R. (2013). Nutritional and Phytochemical Study of *Ilex paraguariensis* Fruits. *Journal of Chemistry*. Volume 2013, Article ID 750623, 6 pages. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1155/2013/750623>

- Colella, M., Castro, M., Montiel, M., Vásquez, E., Mata-Essayag, S., Magaldi, S., Hartung de Capriles, C., Pérez, C., Olaizola, C. & Arántza, R. (2006). Susceptibilidad antifúngica en dermatofitos. *Kasmera*, 34(2), 85-92. Recuperado de www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0075-52222006000200002
- Conti Diaz, I. (2006). Micosis superficiales. *Biomedicina*, 1(2). ISSN: 1510-9747. Recuperado de <http://www.um.edu.uy/docs/revistabiomedicina/2-1/micosis.pdf>.
- Córdoba, S., Davel, G. & Isla, M. (2016). Determinación de la resistencia a los antifúngicos en el laboratorio. Manual de curso - taller. Departamento Micología INEI. "Dr. C. G. Malbrán". Buenos Aires, Argentina.
- Cuétara, M. (2007). Procesamiento de las muestras superficiales. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Ed. Revista Iberoamericana de Micología. Cap 4.
- de Hoog, S., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., Kupsch, C., Stielow, B., Freeke, J., Go"ker, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Mirhendi, H. & Gra"ser, Y. (2017). Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, 182, 5-31. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0073-9>
- Derita, M., Castelli, M. & Sortino, M. (2007). Método de dilución en agar. Manual de Técnicas *in vitro* para la detección de compuestos antifúngicos. Farmacognosia. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina. p. 75-83.
- Diaz Jarabran, M., Diaz Gonzalez, P., Espinoza Rodriguez J. & Carrillo Muñoz A. (2015). Evaluación del perfil de sensibilidad *in vitro* de aislamientos clínicos de

Trichopython mentagrophytes y *Trichophyton rubrum*. Santiago de Chile. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(2), 83-87.

- Eisman, S. & Sinclair, R. (2014). Fungal nail infection: diagnosis and management. Clinical Review. *BMJ*, 348, g1800 Recuperado de <https://doi.org/10.1136/bmj.g1800>
- Elewski Boni, E. (1998). Onychomycosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 415-429.
- Espinel-Ingroff, A., Diekema, D.J., Fothergill, A., Johnson, E., Pelaez, T., Pfaller M.A. & cols. (2010). Wild-Type MIC Distributions and Epidemiological Cutoff Values for the Triazoles and Six *Aspergillus* spp. for the CLSI Broth Microdilution Method (M38-A2 Document). *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3251–7.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2017). *Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts*. Definitive Document E.Def 7.3.1 <http://www.eucast.org>
- Farmacopea Nacional Argentina (1978). VIa ed.
- Farmacopea Nacional Argentina (2003). VIIa ed.
- Fernández Torres, B. (2005). *Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos*. Tesis Doctoral. Unidad de Microbiología. Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut Universitat Rovira i Virgili. Reus, España. Recuperado de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8718/TesisdoctoralporBelkysFernandez-Torres.pdf?sequence=1>

- Fernández, M. S. (2015). *Evaluación de dos métodos para la determinación de la sensibilidad in vitro del complejo Aspergillus terreus frente a antifúngicos*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina, Corrientes. Recuperado de <http://repositorio.unne.edu.ar/handle/123456789/481>
- Filip, R., Lopez, P., Giberti, G. C., Coussio, J. & Ferraro, G. (2001). Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*, 72, 774-778.
- Filip, R., Davicino, R. & Anesin, C. (2010). Antifungal activity of the aqueous extract of *Ilex paraguariensis* against *Malassezia furfur*. *Phytotherapy Research*, 24(5), 715-719.
- Giberti, G. C., 1992. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*). En: Hernandez Bermejo, J. E. & León, J. Cultivos marginados otra perspectiva de 1492. Colección FAO: Producción y protección vegetal N° 26. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Publicado en colaboración con el Jardín Botánico de Córdoba (España) en desarrollo del Programa Etnobotánica 92 (Andalucía 92), pp. 245-252.
- Gross-Martínez, N., Ureña-Sánchez, M. & Chaves-Madrigal, O. (2014) Sensibilidad al fluconazol de aislamientos de *Trichophyton rubrum*. *Acta Médica Costarricense*, 56, 23-26.
- Guelfand, L., Cataldi, S., Arechavala, A. & Perrone, M. (2015) Manual Práctico de Micología Médica. Pruebas de sensibilidad Antifúngica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*; Supl.1: 65-81.
- Haraguchi, H., Kataoka, S., Okamoto, S., Hanafi, M. & Shibata, K. (1999). Antimicrobial Triterpenes from *Ilex integra* and the Mechanism of Antifungal Action. *Phytotherapy Research*, 13, 151–156. Recuperado de

[https://www.academia.edu/11765059/Antimicrobial triterpenes from Ilex integra and the mechanism of antifungal action](https://www.academia.edu/11765059/Antimicrobial_triterpenes_from_Ilex_integra_and_the_mechanism_of_antifungal_action)

- Hay, R. (2018). Therapy of Skin, Hair and Nail Fungal Infections. *Journal of Fungi*, 4, 99. Recuperado de <https://doi.org/10.3390/jof4030099>
- Llambrich, A. & Lecha, M. (2002). Tratamiento actual de las onicomicosis. *Revista Iberoamericanas de Micología*, 19, 127-129.
- Liu, M., Seidel, V., Katerere, D. & Gray, A. (2007). Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*. 42(4), 325-329. doi:10.1016/j.ymeth.2007.02.013
- López Martínez, R. (2008). Importancia actual de la micología médica en México. *Gaceta Médica de México*, 144(2), 121-122.
- Maldonado.I., García Ramírez, D., Striebeck, P., Lafage, P. & Fernández Canigia, L. (2017). Espectrometría de masas MALDI-TOF: evaluación de la etapa preanalítica para la identificación de hongos miceliales. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 7-14.
- Manzano-Gayosso, P. (2005). Dermatofitosis. Unidad de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/dermatofitosis.html>
- Manzano-Gayosso, P., Méndez-Tovar, L., Hernández-Hernández, F. & López-Martínez R. (2008). La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gaceta Médica de México*, 144(1), 23-26. Recuperado de https://www.anmm.org.mx/GMM/2008/n1/23_vol_144_n1.pdf

- Manzano-Gayosso, P., Zabicky-López, J., Hernández-Hernández, F., Méndez-Tovar, L., Bazán-Mora, E., Córdova-Martínez, E., & López-Martínez, R. (2015). Reactivación morfológica de algunas especies de dermatofitos y su sensibilidad a antifúngicos. *Revista Mexicana de Micología*, 41, 47-53. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802015000100006&lng=es&tlng=es.
- Maoz, M. & Neeman, I. (1998). Antimicrobial effects of aqueous plant extracts on the fungi *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum* and on three bacterial species. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 61-63. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1046/j.1472-765X.1998.00277.x>
- Medvedeff, M., Mereles Rodriguez, B., Vedoya, M. & Chade, M. (2003). Micosis superficiales y cutáneas. Posadas. Misiones. Argentina. Ed. Universitaria de Misiones.
- Medvedeff, M., Mereles Rodriguez, B., Vedoya, M. & Chade, M. (2005). Guía de Trabajos Prácticos. Cátedra de Micología. Colección Cuadernos de Cátedra. Posadas. Misiones. Argentina. Ed. Universitaria de Misiones.
- Medvedeff, M., Vedoya, M., Kramer, F., Seňuk, I., Benitez, L. & Lorenzón, P. (2013). Ensayos preliminares *in vitro* de la actividad antifúngica de *Ilex paraguayensis* St. Hilarie. Recuperado de <http://www.inym.org.ar/wp-content/uploads/2017/06/Segunda-Jornada-Yerba-Mate-y-Salud.pdf>
- Medvedeff, M., Vedoya, M., Lloret, M., Espinola, M., Miño, S. & Herszage L. (2005). Una alternativa terapéutica para micosis superficiales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36(3), 4-21.

- Medvedeff, M., Vedoya, M., Kramer, F., Seňuk, I., Benitez, L. & Lorenzon, P. (agosto 2013). Ensayos preliminares *in vitro* de la actividad antifúngica de *Ilex paraguayensis* St. Hilarie. Jornada de Divulgación Científica sobre Yerba Mate y Salud. Presentación de Resultados de Investigaciones Financiadas por el INYM. Posadas. Misiones. Argentina.
- Méndez-Tovar, L., Manzano-Gayosso, P., Velásquez-Hernández, V., Millan-Chiu, B., Hernández-Hernández, F., Mondragón-González R. & López-Martínez R. (2007). Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos de *Trichophyton spp.* *Revista Iberoamericana de Micología*, 24, 320-322.
- Mereles Rodríguez, B., Chade, M., Vedoya, M., Bruquetas, A., Velazquez, E. & Medvedeff M. (2013). El laboratorio de micología en el diagnóstico diferencial de las enfermedades infecciosas. Libro de las Jornadas Científico Tecnológicas de la Universidad Nacional de Misiones. Ed. Universitaria de Misiones. ISBN 978-950-579-270-2.
- Mesa, V.; Marín, P.; Ocampo, O.; Calle, J. & Monsalve, Z. (2019) Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. INTA. Recuperado de <http://ria.inta.gob.ar/contenido/fungicidas-partir-de-extractos-vegetales-una-alternativa-en-el-manejo-integrado-de-0>
- Meza Arango, A., Bueno Sánchez, J. & Betancur Galvis L. (2004). Productos naturales con actividad antimicótica. *Revista Española de Quimioterapia*, 17(4), 325-331.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. (Agosto 2010) Informe N° 27 sobre Yerba mate. Recuperado de

http://64.76.123.202/SAGPYA/economias_regionales/infusiones/informes/ym/ym_27_08_10.pdf

- Mohammadi, R., Abastabar, M., Mirhendi, H., Badali, H., Shadzi S, & cols. (2015). Use of Restriction Fragment Length Polymorphism to Rapidly Identify Dermatophyte Species Related to Dermatophytosis. Jundishapur. *Journal of Microbiology*, 8(6); e17296. DOI : 10.5812/jjm.8(5)2015.17296.
- Molina de Diego, A. (2011). Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/ccs-2009-micologia.pdf>.
- Nardin, M., Pelegri, D., Manias, V. & Mendez, E. (2006). Agentes etiológicos de micosis superficiales aislados en un Hospital de Santa Fe: Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(1), 25-27.
- Negroni, R. (2008). Tratamiento de las onicomicosis. Revisión. *Revista de Patología Tropical*, 37(2), 89 -109. Recuperado de <file:///C:/Users/Invitado/Downloads/4997-Article%20Text-19206-1-10-20081030.pdf>
- Negroni, R., Arechavala, A. & Bohnvel, P. (2008). Hongos miceliales no dermatofitos en onicodistrofias. Experiencia de un centro médico privado en Buenos Aires. *Revista de Dermatología de Argentina*, 14 (2), 118-123.
- Negroni, R., Guelfand, L. & Perrone, M. (2011). Manual de medios y reactivos del laboratorio de Micología. Red de Micología GCBA.
- Oliveira Pentead, J., Martins Volcao, L., Fernandes Ramos, D., Da Silva-Junior, F. & Muccillo-Baisch, A. (2016). Atividade antimicrobiana de extratos de *Ilex*

paraguariensis. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção, Santa Cruz do Sul*, p. 136-146. Recuperado de <https://doi.org/10.17058/reci.v1i1.8335>.

- Pérez-Cárdenas, J., Hoyos Zuluaga, A. & Cárdenas Henao, C. (2013). Sensibilidad Antimicótica de diferentes especies de hongos aislados de pacientes con micosis ungueal en la ciudad de Manizales (Caldas, Colombia). *Biosalud*, 11, 26- 39.
- Prado Martin, J., Porto, E., Severino, M., Corrêa, C. & Ribeiro Cabral I. (2013) Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(2), 93-98.
- Prats, G. (2007). *Microbiología Clínica*. Buenos Aires; Madrid. Ed. Médica Panamericana, 7, 83-107.
- Rangel, D., García, I., Velasco, J., Buitrago, D. & Velazco, E. (2001). Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 42, 43-46. Recuperado de www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/23788/1/articulo42-10.pdf.
- Rinsdah, A. & Manca, M. (2006). Antimicrobial effect of polyphenols from Apple skins on human bacterial pathogens. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3): 1-5.
- Robles Soto, M. (1987). Estudio clínico con tioconazol en solución al 28% en el tratamiento de la onicomicosis. *Revista Médica de Costa Rica*, 54(500), 109 -110.
- Rosco Diagnóstica. Instrucciones para uso de NEO-SENSITABS. (2016) www.rosco.dk
- Rubio Calvo, M., Gil Tomás, J., Ruesca, R., Ramírez de Ocáriz Landaberea, I. & Navarro Lucía, M. (2007). Micosis más frecuentes en nuestro medio. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Ed. Revista Iberoamericana de Micología. Cap 2.

- Rubio. M., Rezusta, A., Gil Tomás, J. & Ruesca, R. (1999). Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología*, 16, 16-22.
- Ruiz Quiroz, J. R. (2013). *Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales*. Tesis de Maestría. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de San Marcos. Lima. Perú. Recuperado de <https://hdl.handle.net/20.500.12672/2590>
- Sánchez Carazo, J., Obón Losada, L. & Pont San J. (1999) Tratamiento actual de las micosis superficiales. *Revista Iberoamericana de Micología*, 16, 26-30.
- Sánchez-Saldaña, L., Matos-Sánchez, R. & Kumakawa Sena, H. (2009) Infecciones Micóticas Superficiales. *Revista Dermatología Peruana*, 19(3), 226-266. Recuperado de http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v19_n3/pdf/a09v19n3.pdf
- Sandoval N., Arenas R., Giusiano G., García D., Chávez L. & Zúniga P. (2012). Diagnóstico y tratamiento de dermatofitosis y pitiriasis versicolor. *Revista Médica Hondureña*, 80(2), 66-73.
- Santos, P., Córdoba, S., Rodero, L., Carrillo-Muñoz, A. & Lopardo, H. (2010). Tinea capitis. Experiencia de 2 años en un hospital de pediatría de Buenos Aires, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27,104-106.
- Schapovaloff, M., Seňuk, I., Bich, G., Kramer, F. & Medvedeff, M. (2009). Actividad antibacteriana de extracto de *Ilex paraguariensis* (yerba mate). Trabajo presentado en III Jornadas de Microbiología clínica, industrial y ambiental de la provincia de Buenos Aires.

- Serrano-Martino, M., Chávez Caballero, M., Valverde Conde, A., Claro, R., Pemán, J. & Martín-Mazuelos, E. (2003). Actividad *in vitro* de voriconazol y otros tres antifúngicos frente a dermatofitos. *Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(9), 484-487. Recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-actividad-in-vitro-voriconazol-otros-13052331>
- Sotelo Casas, N. & Camelo, M. (2010). Borojó fuente de polifenoles con actividad antimicrobiana. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia*, 7(3), 329-336.
- STATGRAPHICS (2009). Centurión XV. Statpoint Technologies, Inc. Warrenton VA, U.S.A.
- Tartabini, M., Bonino, G., Racca, L. & Luque, A. (2013). Estudio taxonómico de aislamientos clínicos de *Trichophyton* en Rosario, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 45(4), 248-253.
- Thomson, P., Anticevic, S., Rodríguez, H. & Silva, V. (2011). Actividad antifúngica y perfil de seguridad del producto natural derivado del aceite de maravilla ozonizado (AMO3) en dermatofitos. *Revista Chilena de Infectología*, 28(6), 512-519.
- Trejos Lopez, E. (2009) *Evaluación de parámetros para pruebas de susceptibilidad antifúngica en hongos filamentosos mediante la técnica de difusión en agar. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias*. Tesis de grado. Recuperado de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8403/tesis368.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Velasco Pastor, M., García- Melgares Linares, M., Gimeno Carpio, E., Roche Gamón, E., Vilata, J. (2006). Dermatofitosis. En Vilata Corell J. *Micosis Cutáneas*. p 49-72. España. Ed Panamericana.

ANEXOS

1. REACTIVOS UTILIZADOS PARA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DIRECTA DE MUESTRAS CLÍNICAS

1.1 Hidróxido de potasio (KOH) al 20 % (Medvedeff y cols., 2003; Negroni y cols., 2011)

Principio: el KOH disuelve la queratina y aclara la preparación sin afectar la morfología de los elementos fúngicos, permitiendo una mejor visualización de los mismos.

Preparación del reactivo:

Hidróxido de potasio (lentejas)	20 g
Agua destilada	100 ml

Conservar a temperatura ambiente. Para la obtención de preparaciones más duraderas, agregar glicerina al 10% que reduce la evaporación.

Control de Calidad: colocar una gota del reactivo entre porta y cubre, observar con 400x, chequear ausencia de esporas de hongos y bacterias.

Descripción de la técnica: colocar una gota de KOH 20% en el centro de un portaobjetos limpio, ubicar la muestra en el KOH y cubrir con cubreobjetos. Dejar digerir 10 min. El efecto aclarante se acelera calentando la preparación suavemente a la llama hasta el desprendimiento de las primeras burbujas.

Resultado: los dermatofitos se observan como hifas hialinas, tabicadas y ramificadas de 4 a 6 μm de diámetro. Las levaduras se visualizan como elementos esféricos u ovalados (blastosporos) que pueden presentar brote y/o

seudohifas. Los hongos miceliales se ven como hifas hialinas o pigmentadas, tabicadas o no, de diámetro irregular según el hongo al que corresponde.

2. LIQUIDOS PARA MONTAJE DE CULTIVOS

2.1 Azul de lactofenol (Negróni y cols., 2011)

Principio: esta solución es muy útil para examinar el material fúngico tomado de los cultivos. El fenol mata el hongo, el ácido láctico es un agente aclarante que preserva la estructura del hongo, la glicerina previene la desecación y el azul de algodón o cotton blue colorea la quitina y celulosa del hongo.

Preparación del reactivo:

Solución A

Fenol en cristales	20 g
Ácido láctico	20 ml
Glicerina	40 ml

Mezclar bien

Solución B

Azul cotton de Poirrier	0,05 g
Agua destilada c.s.p.	20 ml

Mezclar bien Solución A y Solución B, conservar a temperatura ambiente por más de 6 meses.

Control de Calidad: colocar una gota del reactivo entre porta y cubre, observar al microscopio con objetivo 40x, chequear ausencia de esporas de hongos y bacterias.

3. MEDIOS DE CULTIVO:

Consideraciones generales

Los medios de aislamiento primario deben tener un pH: entre 6,5 y 7,2. Las condiciones ácidas que se utilizan en algunos medios de cultivo, son para inhibir el crecimiento bacteriano, pero también disminuye el desarrollo de algunos hongos. Por lo tanto, es preferible agregar agentes antibacterianos (100 µg/ml de cloranfenicol/estreptomicina) al medio de cultivo, para reducir la contaminación bacteriana.

3.1 Agar selectivo para hongos patógenos (Negróni y cols., 2011)

Es un medio selectivo utilizado para el aislamiento de hongos patógenos a partir de muestras muy contaminadas con hongos saprofitos y bacterias. Se utiliza fundamentalmente en el aislamiento de dermatofitos y hongos dimorfos. Inhibe algunas especies de hongos de interés médico (no *Candida albicans*, *Aspergillus*, *Mucorales*, *Cryptococcus neoformans*, etc).

Se utilizan preparados comerciales, se preparan de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Control de Calidad: agar firme, amarillento y transparente.

Trichophyton mentagrophytes: crece.

Aspergillus flavus: inhibición parcial o total.

Staphylococcus epidermidis: inhibición parcial o total.

3.2 Agar glucosado de Sabouraud (ASD) al 4 %

Principio: medio poco utilizado ya que normalmente se usa la modificación de Emmons. Están disponibles comercialmente.

Peptona	10 g
Glucosa	40 g
Agar	15 g
Agua deionizada	1.000 ml

Mezclar los ingredientes y hacerlos hervir hasta disolución completa. Esterilizar a 121°C durante 15 min., distribuir en tubos solidificar en plano inclinado.

Control de calidad: aspecto: medio sólido, ámbar, transparente

pH final a 25 °C: 5,6± 0, 2

Trichophyton mentagrophytes: crece

3.3 Medio hongos y levaduras (AHyL)

Uso: medio selectivo utilizado para el aislamiento y recuento de hongos y levaduras, a partir de una gran variedad de muestras alimenticias. Es nutritivo debido a la presencia de extracto de levadura y glucosa y selectivo por la presencia de cloranfenicol que inhibe el crecimiento bacteriano. El agar es el agente solidificante.

Está disponible comercialmente

Composición:

Extracto de levaduras	5,0 g/l
Glucosa	20,0 g/l
Cloranfenicol	0,1 g/l
Agar	15,0 g/l

pH final: 6,6 ± 0,2

Suspender 40 g de polvo en 1 litro de agua purificada. Dejar reposar 5 minutos.

Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición para disolución total.

Distribuir en recipientes adecuados. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Distribuir en placas de Petri estériles, o tubos estériles en forma de pico de flauta.

3.4. Agar papa dextrosa (APD) (Negrón y cols., 2011)

Papa pelada	20 g
Glucosa	10 g
Agar	20 g
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

Pelar y rallar la papa, disolver la glucosa en el agua y agregar los demás ingredientes. Hervir 20 minutos y filtrar por gasa y rectificar volumen a 1000 ml.

Fraccionar 7 ml por tubo y esterilizar a 121 °C durante 15 min, enfriar los tubos en posición inclinada.

Están disponibles comercialmente.

3.5 Agar harina de avena con sales (AHA) (Medio de Weitzman y Silva Hutner, "Oatmeal-salts agar") (Ausina Ruiz y col, 2006)

Uso: Esporulación y mantenimiento.

Fórmula:

MgSO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
NaNO ₃	1 g
Copos de avena	10 g

Agar 18 g

Agua destilada c.s.p. 1.000 ml.

Disolver los ingredientes calentando hasta ebullición, distribuir 7 ml por tubo de ensayo y autoclavar a 121 °C 15 minutos. Enfriar los tubos en posición inclinada.

3.6. Medio de cultivo RPMI 1640 para pruebas de sensibilidad a los antifúngicos

Componentes:

RPMI 1640 10,40 g

Tampón MOPS 34,53 g

Agua destilada 1.000 ml

Preparación:

1. Disolver en 900 ml de agua destilada las cantidades indicadas, agitando hasta su completa disolución.
2. Ajustar el pH a 6,9-7,1, utilizando NaOH 1N o 10N (medir la cantidad utilizada).
3. Añadir agua destilada hasta completar 1 litro.
4. Filtrar estérilmente.
5. Mantener refrigerado hasta su uso (4-8 °C, máximo 6 meses).

3.6 Agar Mueller Hinton (Biokar Diagnóstica)

Fórmula:

Infusión de carne 2 g/l

Peptona ácida de caseína	17,5 g/l
Almidón	1,5 g/l
Agar	17,0 g/l

pH final a 25°C: 7,3 ± 02

Suspender 38 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Dejar embeber de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuente y hervir hasta disolución total. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C y distribuir en placas de Petri estériles, en volumen apropiado para que el espesor sea de 4 mm sobre una superficie horizontal (25-30 ml en placas de 9 cm de diámetro).

4. IDENTIFICACIÓN DE DERMATOFITOS MEDIANTE TÉCNICAS ADICIONALES

4.1 Ensayo de perforación del pelo *in vitro* (Cabañes Saenz, 2001)

Es una técnica muy interesante para diferenciar *T. mentagrophytes* y *M. canis* (perforación positiva) de *T. rubrum* y *M. audouinii* (perforación negativa). Consiste en hacer crecer la cepa del dermatofito a identificar en fragmentos de pelo previamente esterilizados y, posteriormente, observar al microscopio el efecto que ha producido el hongo en dicho sustrato. Los dermatofitos se dividen en dos grupos (perforación positiva o negativa) en función de si producen un tipo característico de perforaciones o no. Este resultado varía según la técnica que se utilice.

La técnica de referencia es la descrita por Ajello y Georg. Consiste en disponer fragmentos cortos de pelo humano (unos 20-25 de 15-20 mm de longitud), previamente esterilizados, en una placa de Petri que contiene 25 ml de agua estéril con 2 o 3 gotas (0,15 ml) de extracto de levadura al 10 % previamente esterilizado.

Se inocula con fragmentos de la colonia de la cepa a ensayar y se incuba en oscuridad a 25 °C durante 3 a 4 semanas.

Se recomienda que el cabello esté desengrasado, o se utilice de prepúber ya que los ácidos grasos capilares pueden tener un efecto inhibitor en el desarrollo de la cepa. También se ha recomendado utilizar pelo de caballo previamente desengrasado y esterilizado.

Las perforaciones que producen *T. mentagrophytes* o *M. canis* son fácilmente detectables. Son transversales, de forma cónica y pueden llegar a atravesar el pelo de lado a lado. *T. rubrum* y *M. audouinii* no las suelen producir o tan sólo erosionan la superficie del pelo.

4.2 Método para la detección de ureasa

Se basan en la capacidad de algunos microorganismos en producir la enzima ureasa, la cual puede ser detectada por diferentes métodos. Los medios utilizados contienen urea, que en presencia de la enzima se desdobla en dióxido de carbono y amonio, elevando el pH y produciendo un cambio de color en el indicador rojo de fenol del amarillo al fucsia.

Urea de Christensen

Procedimiento: el medio base se prepara de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Autoclavar a 120 °C durante 15 minutos. Adicionar la solución de urea estéril al 40 % al medio base fundido y enfriar a 45 °C. Fraccionar 3 ml por tubo, enfriar los tubos en posición inclinada.

Sembrar el agar, incubar a 28 °C, 72 horas.

Control de Calidad:

T. mentagrophytes: positivo (rojo)

T. rubrum: negativo (amarillo)

5. COSENTIMIENTO INFORMADO

Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Proyecto de Extensión y Vinculación Tecnológica Universitaria "Aislamientos Fúngicos de Interés Médico" (AFIM)
Director: Esp. Mercedes Rodríguez Elizabeth
Mariano Moreno N°: 1375. Tel: 3764-435118

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Este documento tiene por objeto ofrecerle información y pedir su autorización, para la toma de muestra biológica, procesamiento y recolección de datos sobre el problema de salud que lo aqueja, por el cual el profesional médico ha solicitado un estudio micológico.

- La toma de muestras biológicas necesarias para el estudio (piel, pelo y uñas) no implica riesgo alguno para el paciente.
- Si firma este documento, nos autoriza a realizar el estudio solicitado por el profesional médico que lo deriva y poder utilizar los datos para posteriores publicaciones científicas.
- Usted recibirá un informe de los resultados del estudio micológico sobre las muestras que se le tomaron, para ser presentado al profesional médico solicitante.
- Si decide autorizar, debe recibir información personalizada del profesional bioquímico que solicita su consentimiento, leer éste documento y hacer todas las preguntas que precise para comprender los detalles sobre el mismo.
- Este documento y los datos obtenidos del estudio realizado, serán archivados en el servicio de diagnóstico AFIM y solamente los autores de la publicación científica tendrán acceso a los mismos, que se recogerán sin ningún dato de carácter personal.
- Usted puede solicitar una copia del presente consentimiento informado. Si tiene alguna duda, puede contactarse con el profesional responsable, al número de teléfono que figura en el encabezado.

Yo..... DNI.....

a/c del paciente..... DNI.....

Por la presente, autorizo la toma y procesamiento de las muestras clínicas solicitadas, como así también la utilización de los datos obtenidos a partir del estudio micológico, para futuros estudios de investigación, teniendo en cuenta que:

- Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas y han sido respondidas a mi entera satisfacción.
- Se me ha explicado claramente, que el objetivo de prestar este consentimiento es para poder realizar en el futuro estudios de investigación, cuyos resultados podrán, ser difundidos manteniendo absoluta confidencialidad de mis datos personales.
- Se me ha informado que identificarán mis muestras con un sistema de codificación de forma que los investigadores no podrán vincular dichas muestras con mis datos de identificación personal.
- Comprendo que los resultados de futuros estudios no se comunicarán ni a mí ni a mi médico. Solamente en el caso de que dichos hallazgos tengan una implicación significativa para la salud y que exista una posibilidad real de mejorar esa condición de salud, podremos recibir tanto mi médico como yo la información pertinente.

Por todo ello, **OTORGO MI CONSENTIMIENTO** voluntariamente, para que se pueda realizar, a partir de la muestra clínica que me han tomado y/o derivado, todos los estudios de investigación referentes a la patología que hoy me aqueja.

Firma y aclaración del paciente o familiar a/c.....Fecha.....

Firma y aclaración del profesional bioquímico.....Fecha.....