



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE ODONTOLOGÍA

**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD
FUNGICIDA Y FUNGISTÁTICA DEL EXTRACTO
METANÓLICO DE LA *Minthostachys mollis* (MUÑA)
SOBRE CEPA DE *Candida albicans* ATCC®1023**

TESIS

Para optar el título profesional de: Cirujano Dentista

AUTOR

Neyra Espinoza, Luis Carlos Javier (0000-0001-5010-5706)

Armas Gálvez, Nelson Mauricio (0000-0002-6547-0965)

ASESOR

Dra. Juana Mercedes del Valle Mendoza (0000-0002-6011-5040)

Mg. Miguel Angel Aguilar Luis (0000-0001-7023-3190)

Lima 20 de Noviembre de 2018

DEDICATORIA

*Para todas las personas que hicieron posible este trabajo. Por su tiempo sus consejos y
buenos deseos.*

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue apoyada por el Centro de Investigación e Innovación de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas, Lima-Perú

RESUMEN

Objetivo: Evaluar in vitro la actividad fungistática y fungicida del extracto metanólico de *Minthostachys Mollis* (Muña) sobre cepas de *Candida albicans*.

Materiales y Métodos: Se realizaron extractos metanólicos de las hojas, tallos y raíces de *Minthostachys mollis*. La actividad fungistática de los extractos frente a cepas de *Candida albicans* fue evaluado por medio de la técnica de difusión en agar. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto se determinó por el método de microdilución y la citotoxicidad usando la línea celular MDCK.

Resultados: El extracto de hojas y tallo de *Minthostachys mollis* mostró mayor actividad fungistático frente a *Candida albicans*, observandose halos de inhibición de 47.72 ± 6.67 mm y 46.58 ± 6.42 mm respectivamente, no encontrando diferencia estadísticamente significativa entre ambos extractos. La CMI fue de 46.87mg/ml, 93.75mg/ml y 1500mg/ml para hojas, tallos y raíces respectivamente.

Conclusiones: Se demostró que el extracto metanólico de *Minthostachys mollis* tienen actividad fungistática y fungicida contra cepas de *Candida albicans*. Ninguno de los extractos resultó ser tóxico sobre líneas celulares.

Palabras Claves: Agentes Antifungicos, *Minthostachys mollis*, Plantas Medicinales, Citotoxicidad, Fitoterapia

ABSTRACT

Objective: to evaluate in vitro the fungistatic and fungicidal activity of the methanolic extract of *Minthostachys Mollis* (Muña) on strains of *Candida albicans*.

Methods: Three in vitro methanolic extracts of the leaves, stems and roots of *Minthostachys mollis* were made. The fungistatic activity of the extracts against *Candida albicans* strains was evaluated by means of the agar diffusion technique. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the microdilution method and cytotoxicity using the MDCK cell line.

Results: The extracts that obtained the greatest fungistatic activity at 24 hours were those of leaves and stems against *Candida albicans*, halos of $47.72 \pm 6.67\text{mm}$ and $46.58 \pm 6.42\text{mm}$ respectively were obtained, finding no statistically significant difference. The MIC for leaves was 46.87mg / ml , for stems was 93.75mg / ml and 1500mg / ml for roots.

Conclusions: It was demonstrated that the methanolic extracts of *Minthostachys mollis* have fungistatic and fungicidal activity against strains of *Candida albicans*. None of the extracts turned out to be toxic on cell lines at low concentrations.

Keywords: Antifungal Agents, *Minthostachys mollis*, Medicinal plants, Cytotoxicity, Phytotherapy

Índice de contenidos

CAPITULO 1. INTRODUCCION	9
CAPITULO 2. OBJETIVO	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos	11
CAPITULO 3. HIPÓTESIS	12
CAPITULO 4. MATERIALES Y METODO	13
Estimación del tamaño de muestra	13
Preparación de extractos.....	13
Cultivo bacteriano	13
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	15
Prueba de Citotoxicidad (CC50).....	16
CAPÍTULO 5. RESULTADOS	17
CAPITULO 6. DISCUSIÓN	21
CAPITULO 7. CONCLUSIONES	24
CAPITULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

Índice de tablas

TABLA N° 1 Evaluacion de la actividad fungicida y fungistática del extracto metanólico de hojas, tallos y raíces de la <i>Minthostachys mollis</i> (Muña) sobre <i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231).....	18
TABLA N° 2 Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto metanólico de hojas, tallo y raíz de la <i>Minthostachys mollis</i> (Muña) sobre <i>Candida albicans</i> (ATCC® 10231).....	19

Índice de gráficos

GRÁFICO N° 1 Evaluación del efecto citotóxico de los extractos metanólicos de hojas, tallo y raíz de la <i>Minthostachys mollis</i> (Muña) sobre cultivos celulares MDCK.	20
---	-----------

CAPITULO 1. INTRODUCCION

La candidiasis es una de las infecciones micóticas más observadas en el ámbito odontológico. Es una enfermedad oportunista y una de las micosis más importantes y de mayor frecuencia en la cavidad bucal; afecta a ambos sexos y a cualquier edad, aunque son más frecuentes en los extremos de la vida afectando a niños y adultos mayores [1]. Los hongos del género *Candida* son microorganismos habitantes habituales en boca, sistema gastrointestinal, piel y vagina, y solo producen infección de la mucosa en presencia o predisposición manifestada de maneras locales, generales o ambas [2,3].

Actualmente existen fármacos antimicóticos como la Nistatina®, Fluconidazol®, Itraconazol®, Ketoconazol®, sin embargo ocurren fracasos en el tratamiento debido a la elevada resistencia farmacológica que estos generan [2,3]. Por este motivo se buscan nuevas alternativas para tratar las infecciones micóticas. Una de ellas, poco convencional, es el uso de la fitoterapia buscando así el manejo eficaz de las infecciones micóticas, que permitan un mayor avance en la disminución y el control prolongado de las infecciones causadas por *Candida* [2,3]. En la última década la fitoterapia ha sido reconocida de manera aceptable en el campo médico debido a la efectividad que ha demostrado para el control y tratamiento de diversas enfermedades e infecciones [4].

La *Minthostachys mollis*, comúnmente llamada Muña, es una planta que crece en los andes peruanos, presenta propiedades terapéuticas para el dolor de estómago, tratamiento de las vías respiratorias, mal de altura, dolores menstruales entre otros [5]. Los medios en los que se administra esta planta son tópicos y orales [5]. Debido a los efectos que produce, se han llevado a cabo diferentes investigaciones en los cuales se trata de explicar cómo actúa sobre diferentes microorganismos entre los más estudiados se encuentran

Helicobacter pylori, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomonas aeruginosa* [4,6]. Sin embargo, hasta la actualidad siguen siendo pocas las referencias para el uso de esta planta en el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral, para promover el desarrollo de una cultura fitoterapéutica en el área odontológica y otras áreas de ciencias de la salud que a su vez despertará el interés por conocer y estudiar otras plantas oriundas de nuestro país.

Por lo tanto, el propósito del presente estudio es evaluar in vitro la actividad fungistática y fungicida del extracto metanólico de *Minthostachys mollis* (Muña) sobre cepas de *Candida albicans*.

CAPITULO 2. OBJETIVO

Objetivo general

Evaluar in vitro la actividad fungistática y fungicida y fungistática del extracto metanólico de Hojas, tallo y raíz de la *Minthostachys mollis* (Muña) sobre cepas de *Candida albicans* ATCC®1023

Objetivos específicos

1. Determinar la actividad fungistática del extracto metanólico de hojas, tallo y raíz de la *Minthostachys mollis* (Muña) sobre cepas de *Candida albicans*..
2. Determinar la actividad fungicida del extracto metanólico de hojas, tallo y raíz de la *Minthostachys mollis* (Muña) sobre cepas de *Candida albicans*
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto metanólico de hojas, tallo y raíz de la *Minthostachys mollis* (Muña) sobre cepas de *Candida albicans*.
4. Evaluar el efecto citotóxico del extracto metanólico de hojas, tallo y raíz de la *Minthostachys mollis* (Muña) sobre la línea celular MDCK

CAPITULO 3. HIPÓTESIS

El extracto metanólico de *Mintostachys mollis* (Muña) tiene actividad fungistática y/o fungicida sobre cepas de *Candida albicans* debido la presencia de principios activos.

CAPITULO 4. MATERIALES Y METODOS

Estimación del tamaño de muestra

El tamaño muestral se determinó a partir de la fórmula de comparación de medias utilizando el programa estadístico® versión 12.0. Se consideró un nivel de confianza del 95% y un poder del 80%. Asimismo, los parámetros de media y desviación estándar por grupo fueron obtenidos a partir de una prueba piloto previamente realizada. Finalmente, se estableció un número de muestra de 25 pocillos por grupo.

Preparación de extractos

Las plantas de *Minthostachys mollis* (Muña) fueron adquiridas en el vivero Golf los Incas (La Molina, Lima, Perú). Se procedió a limpiar, lavar con agua estéril y separar las hojas, tallos y raíces de la planta de Muña. Posteriormente estas fueron secadas con ayuda de una estufa a 37°C durante 7 días. Transcurrido este tiempo se pulverizaron por separado las hojas, los tallos y las raíces, 100 gr de cada muestra fue inmersa en una botella de vidrio estéril y se adiciono 200 ml de Metanol (1P: 2V). Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente, cubiertas de la luz, durante 10 días. Posteriormente las muestras fueron filtradas con ayuda de papel Whatman n° 4 y el sobrenadante fue evaporado a 55°C durante 72 horas aprox. El precipitado fue resuspendido en solución buffer fosfato (PBS 1X) y almacenado a 4°C hasta su uso.

Cultivo bacteriano

La *Candida albicans* (ATCC 10231) fue adquirida por el laboratorio GENLAB del Perú representante del laboratorio MicroBiologics (USA) y cultivado en agar *Sabouraud dextrose* en condiciones de anaerobiosis controlada, a 37°C durante 72 horas.

Transcurrido el tiempo de cultivo se procedió a aislar de 3 a 4 colonias, las cuales fueron inoculadas en un tubo de 15 ml estéril que contenía 3ml de caldo de cultivo BHI (brain heart infusión) (se prepararon 6 tubos para la ejecución del ensayo), las muestras fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis controlada, a 37°C durante 72 horas.

Determinación de la actividad fungistática.

El efecto fungistático tiene la capacidad de evaluar la actividad de un agente o una solución para inhibir el crecimiento del hongo. Para evaluar el efecto fungistático del extracto metanólico de *Minthostachys mollis* se utilizó la técnica de difusión en pozo (perforación en AGAR), para lo cual 44 gr de *Agar Sabouraud dextrose* fue mezclado con 1000 ml de agua destilada, la mezcla fue autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, el medio se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura aproximada de 55°C y posteriormente se inoculó la suspensión fúngica anteriormente preparada. La mezcla fue vertida en placas petri estériles de 10 cm de diámetro y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 3 horas. Todo el procedimiento fue realizado bajo una campana de bioseguridad tipo II para evitar contaminaciones. Transcurridas las 3 horas, con un sacabocados estéril se realizó 4 perforaciones de 9 mm de diámetro en cada una de las placas, luego se añadió 150 µl. de cada uno de los extractos metanólicos preparados previamente. Como control positivo se utilizó Clotrimazol (150 mg/ml) y como control negativo se utilizó solución salina buffer fosfato (PBS 1X). Las placas fueron incubadas en anaerobiosis controlada a 37°C durante 48 horas; transcurrido este tiempo se evaluaron los halos de inhibición. Los halos de inhibición se midieron en mm con ayuda de un Vernier.

Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF).

La Concentración mínima fungicida (CMF) se refiere al agente o solución que disminuye en 99.9% el crecimiento del hongo a partir de un inóculo de subcultivo puro. Para la CMF se realizó diluciones seriadas [1500 mg/ml – 2.74 mg/ml] de los extractos metanólicos evaluados (las diluciones seriadas se realizaron en PBS 1X). Posteriormente se inoculó 5 µl de la suspensión de *Candida albicans* en cada uno de los pocillo y la muestra fue incubada en condiciones de anaerobiosis controlada a 37°C durante 48 horas. Como control positivo se utiliza 5 µl de *Candida albicans* en presencia de BHI. Posteriormente de cada tubo se obtuvo una muestra de 10 µL y se inoculo de manera independiente en tubos que contienen caldo de agar sabouroud. Las muestras se incuban por 72 horas tiempo máximo en que se observa crecimiento del cultivo control y se realiza observación visual de los caldos.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Para evaluar la CMI del extracto metanólico de *Minthostachys mollis* se utilizó una placa de microtiter de 96 pocillos en las cuales se colocaron las diferentes diluciones de los extractos metanólicos evaluados, las diluciones seriadas [1500 mg/ml – 2.74 mg/ml] se realizaron en PBS 1X. Posteriormente se inoculó 5 µl de la suspensión de *Candida albicans* en cada uno de los pocillo y la microplaca fue incubada en condiciones de anaerobiosis controlada a 37°C durante 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, el volumen total de cada pocillo fue sembrado en placas de agar *Sabouraud dextrose* e incubadas a 37°C durante 48 horas. Finalmente se evaluó el crecimiento de *Candida albicans* para cada caso, siendo considerada la concentración mínima inhibitoria, la dilución más baja capaz de impedir el crecimiento del microorganismo.

Prueba de citotoxicidad: determinación de CC₅₀

Se utilizó una placa de cultivo de 96 pocillos, en la cual se adicionó 1×10^3 cel/ml del cultivo celular MDK, las células fueron estabilizadas durante 24 horas en condiciones de aerobiosis controlada con CO₂ a 37 °C. Luego se adicionaron los extractos metanólicos de hojas, tallos y raíces de *Minthostachys mollis* (Muña) a diferentes concentraciones, para lo cual se utilizó una dilución 1 en 2 hasta la un decima dilución. Las muestras fueron incubadas durante 5 días. Posteriormente, para evaluar la viabilidad celular, se agregó 20µl de solución de MTT (3mg/ml resuspendida en PBS 1X) a cada pocillo y se dejó incubar durante 2 horas, los cristales de formazan fueron resuspendidos en DMSO. La placa que contienen las muestras fue llevada a un lector de ELISA (BIORAD) para medir el nivel de absorbancia (nm). Como control positivo se utilizó pocillos que contenían células sin extracto. Como control negativo se utilizó pocillos que contenían sólo extracto y pocillos sólo con medio de cultivo.

La citotoxicidad se determinó comparando las absorbancias resultantes con los extractos con la absorbancia media de los pocillos de control (considerada como 100 % de viabilidad celular), y se expresó como porcentaje de viabilidad celular. La concentración citotóxica del 50% (CC₅₀) se define como la cantidad de extracto que genera el 50% de la viabilidad celular, en comparación con el control. Se graficaron los valores de los porcentajes de viabilidad celular (%) se frente a las concentraciones de extracto, y se determinó CC₅₀. Los experimentos se llevaron a cabo por cuadruplicado.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

Actividad fungistática del extracto de *Minthostachys mollis* (Muña).

Los resultados muestran efecto fungistático de los extractos de hojas, tallo y raíces de *Minthostachys mollis*, observándose halos de inhibición de 47.72 ± 6.67 mm, 46.58 ± 6.42 mm y 26.18 ± 7.03 mm respectivamente. El grupo control con Clotrimazol mostró un efecto antifúngico de 52mm (Tabla 1).

Al comparar el efecto fungistático de los extractos de hojas, tallo y raíces de *Minthostachys mollis* con la prueba estadística ANOVA, se observó diferencia significativa ($p < 0.001$). Sin embargo, al realizar la prueba post-hoc de Tukey, se observó que no existe diferencia significativa entre los extractos de hojas y tallos ($p = 0.819$). Sin embargo, al realizar la comparación del extracto de hojas y tallos contra el extracto de raíces resultó que si existe diferencia significativa ($p < 0.001$) para ambos casos (TABLA N° 1).

Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de *Minthostachys Mollis*

Al evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos y grupo control se encontró que la CMI para hojas fue de 46.87mg/ml, para tallos fue de 93.75mg/ml y para raíces fue de 1500mg/ml (TABLA N° 2).

Prueba de citotoxicidad: determinación de CC_{50} de los extractos

Al evaluar los resultados del ensayo citotoxicidad de *Minthostachys mollis* se observó que la concentración citotóxica del 50% (CC_{50}) es menor para el caso de raíces (300 μ g/ml), seguido de tallos (200 μ g/ml) y hojas (150 μ g/ml) (GRÁFICO N° 1).

TABLA N° 1

Evaluación de la actividad fungistática del extracto metanólico de hojas, tallos y raíces de la *Minthostachys mollis* (Muña) sobre *Candida albicans* (ATCC® 10231)

Grupo	Media (mm)	Mediana	Rango	D.E	<i>p</i>*	<i>p</i>**
Extracto de hojas	47.72	52	17	6.67		
Extracto de tallos	46.58	48	17	6.42		0.819
Extracto de hojas	47.72	52	17	6.67		
Extracto de raíces	26.18	26	19.5	7.03	<0.001	<0.001
Extracto de tallos	46.58	48	17	6.42		
Extracto de raíces	26.18	26	19.5	7.03		<0.001
Clotrimazol (control)	52	52	0	0		

*Prueba de ANOVA

**Prueba de post-hoc Tukey

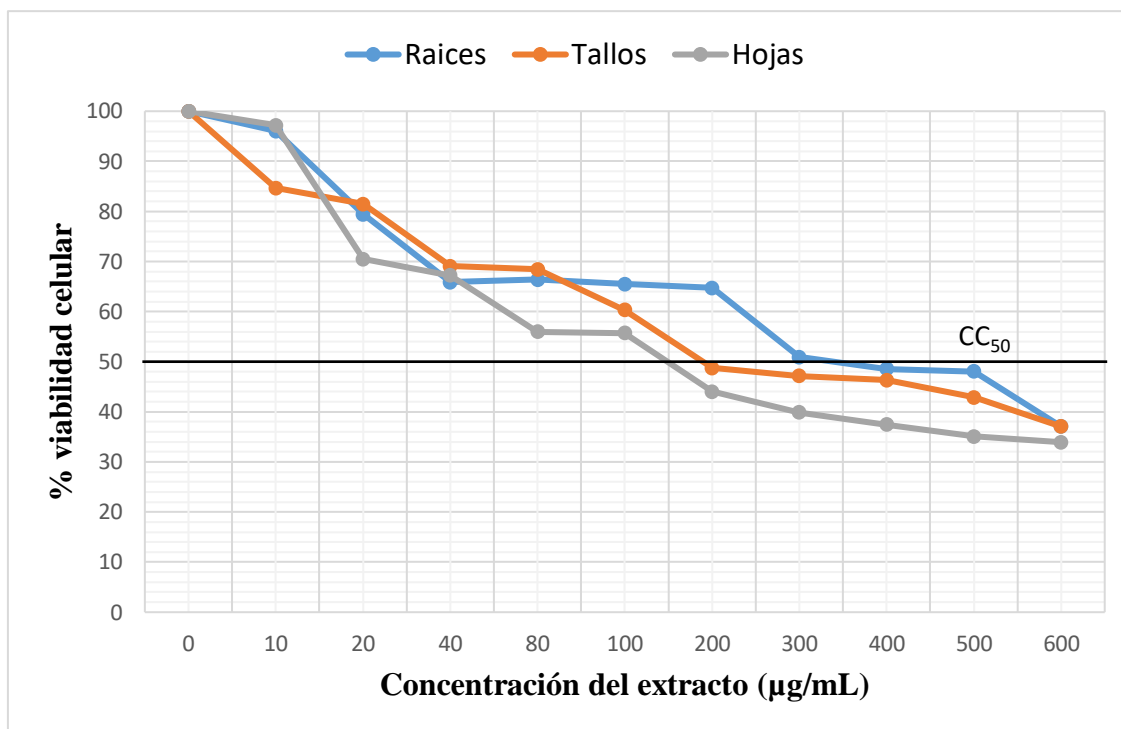
Nivel de significancia estadística, ($p < 0.05$)

TABLA N° 2

Determinar la concentración mínima fungicida (CMF) y concentración mínima inhibitoria CMI) del extracto metanólico de hojas, tallo y raíz de la *Minthostachys mollis* (Muña) sobre *Candida albicans* (ATCC® 10231)

Concentración (mg/mL)	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231			
	Extracto metanólico de <i>Minthostachys mollis</i>			Clotrimazol (control) (150mg/mL)
	Hojas	Tallos	Raíces	
1500.00	-	-	CMI CMF	-
750.00	-	-	-	-
187.50	-	-	-	-
93.75	-	CMI CMF	-	-
46.87	CMI CMF	-	-	-
27.47	-	-	-	-
2.74	-	-	-	CMI CMF

Evaluación del efecto citotóxico de los extractos metanólicos de hojas, tallo y raíz de la *Minthostachys mollis* (Muña) sobre cultivos celulares MDCK.



* Valores de CC_{50} : raíces: 300 $\mu\text{g/mL}$, tallos = 200 $\mu\text{g/mL}$, hojas = 500 $\mu\text{g/mL}$

CAPITULO 6. DISCUSIÓN

El uso de plantas medicinales ha sido empleado dentro de las culturas alrededor del mundo para el tratamiento alternativo de diversas afecciones [7]. En el Perú, debido a la gran riqueza botánica, las costumbres etnobotánicas, la ubicación geográfica y la situación económica es común el uso de este tipo de plantas [8]. Sin embargo, son pocas las que han demostrado científicamente efectos biológicos positivos [7].

Una de las plantas que está siendo investigada en el campo de la fitoterapia es la *Minthostachys mollis*, también conocida como “Muña” de la cual se reportan propiedades terapéuticas en el tratamiento de las vías respiratorias, del aparato digestivo y además ha demostrado tener efecto antimicótico en casos de infecciones por *Candida albicans* [9.10].

Una de las infecciones micóticas orales más comunes es producida por la *Candida albicans* [7]. Este patógeno oportunista afecta especialmente a pacientes inmunosuprimidos, algunos pacientes con prótesis y está demostrando resistencia hacia los fármacos convencionales [7]. En recientes estudios alrededor del mundo han demostrado que en los últimos años han incrementado los casos de pacientes con Candidiasis [7]. Además, se asocia este incremento a la falta de diagnóstico temprano y a la resistencia que presenta este microorganismo a los fármacos tradicionales (Nistatina®, Fluconidazol®, Itraconazol®, Ketoconazol®) [11].

Es por esto que el objetivo principal de estudio fue evaluar in vitro la actividad fungistática y fungicida del extracto metanólico de hojas, tallo y raíz de la *Minthostachys mollis* (Muña) sobre cepas de *Candida albicans*, encontrando que si existe un efecto

antifúngico de este extracto. A diferencia del estudio realizado por Cano en el 2008, en donde se obtuvieron halos de inhibición de 30mm, en el cual se utilizó un medio diferente debido a que utilizaron aceites esenciales y no extractos etanólicos como en el presente estudio [12]. El efecto antifúngico encontrado en el presente estudio puede deberse a la mayor concentración de principios activos dentro de los extractos en comparación al aceite esencial usado porque el contenido de compuestos oxigenados es alto lo que hace más soluble este tipo de sustancias en alcoholes. Mientras que el efecto fungicida puede deberse a la presencia de algunos terpenos, estos son agentes liposolubles los cuales afectan directamente a la membrana celular de los microorganismos. Otros estudios mostraron una gran concentración de carvacrol proveniente de la Muña, el cual tiene la propiedad de ingresar al citoplasma alterándolo, lo cual produce un mal funcionamiento celular lo que desencadena la muerte del hongo [13].

La concentración mínima inhibitoria (CMI) evaluada dentro del estudio, concluyó que a bajas concentraciones, los extractos no muestran efecto fungistático y fungicida. Observándose que la concentración más baja en la que los extractos de hojas, tallo y raíz de Muña poseen efecto antifúngico es mayor a la CMI del fármaco usado como control, probablemente esto se debe a que el Cotrimazol es un compuesto químico puro. Estos resultados no difieren con los evaluados en otros estudios en los cuales los extractos de plantas necesitaron mayor concentración para mostrar efecto [14, 15]. Al conocer los efectos antifúngicos y la cantidad mínima inhibitoria de este tipo de terapias por si solas aún no llega a ser tan efectiva como el tratamiento convencional con fármacos.

No obstante, se demostró que ninguno de los extractos utilizados en el presente estudio tiene efectos citotóxicos, todos ellos poseían un CC_{50} ($CC_{50} < 30 \mu\text{g/ml}$) mayor al establecido para extractos de plantas según los parámetros del Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, estos datos son similares a los encontrados en el estudio de V.

Tangarife et al., 2012 [16] donde se evaluó la actividad citotóxica de diferentes plantas entre ellas *Minthostachys mollis* sobre línea celular Vero ATCC CCL-81. Con esto se concluye que podría ser viable la utilización de esta planta sin tener efectos nocivos.

Minthostachys mollis (Muña) es la que se asemeja más a la acción fungicida de los fármacos convencionales. Otros estudios han demostrado tener efecto fungicida como es el caso de *Ecballium elaterium* y *Salvia rhytidea benth*; sin embargo el efecto fungicida fue menor al observado en nuestro estudio [17]. Esto demuestra que la fitoterapia puede ser una herramienta utilizada como coadyudante a la terapia convencional ya que no logra un efecto igual o mayor al de los fármacos.

Este estudio al ser in vitro, tiene como limitantes el no poder replicar situaciones clínicas en las que se presenta la *Candida albicans* debido a que en el ambiente oral puede competir o complementar su acción con otro tipo de microorganismos.

CAPITULO 7. CONCLUSIONES

El extracto metanólico de hojas y tallos de *Minthostachys mollis* presenta efecto fungistático y fungicida, además han demostrado que no existe riesgo de citotoxicidad celular en las concentraciones mínimas inhibitorias. A pesar de que los resultados manifiestan el efecto fungistático y fungicida de *Minthostachys mollis*, el fármaco de primera elección, como el Clotrimazol, sigue teniendo mayor eficacia para la acción antifúngica. Se recomienda continuar con la investigación de plantas medicinales hasta encontrar la concentración o combinaciones con distintos tipos de extractos de plantas o el principio activo que tiene el efecto inhibitor a fin de potenciar o igualar el efecto fungicida de una terapia convencional o ser utilizados como terapia complementaria.

CAPITULO 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arellano J, Moreno M, Sarti E. Infecciones por hongos y neutropenia en un hospital pediátrico de tercer nivel. *Salud pública México*. 2008; 50(3): 197-8
2. Pardi G, Cardozo E. Algunas consideraciones sobre *Cándida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta odontol. Venez* 2002; 40(1): 9-17.
3. Pernan J, Canton E, Espinel-Ingroff A. Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert Rev Anti Infect Ther.*2009; 7(4):453-60
4. Carhuapoma M, Lopez S, Roque M, Velaptiño B, Bell C, Whu D. Aceite esencial de «Muña» -*Minthostachys mollis* Grises- y su efecto antibacteriano frente a cuatro cepas de bacterias Gram negativa. *Rev Acad Peru Salud*. 2009; 16(2)
5. Gonzales M, Baldeón S, Beltrán H, Jullian V, Bourdy G. Hot and cold: Medicinal plant uses Quechua speaking communities in the high Andes (Callejón de Huaylas, Anchas, Perú). *J Ethnopharmacol*. 2014; 155; 1093-1117.
6. Pellegrini M, Alonso-Salce R, Umpierrez M, Rossini C, Fuselli S. Chemical composition, antimicrobial activity and mode of action of essential oils against *Paenibacillus larvae*, etiological agent of American Foulbrood on *Apis mellifera*. *Chem Biodivers*. 2017. Apr; 14(4).
7. Fernandez A. and cols. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. *BMC Complement Altern Med* 2016 Jul 11(16): 203
8. Monigatti M, Bussmann R, Weckerle C. Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolivar province, Peru. *J Ethnopharmacol*. 2013 30; 145(2): 450-64.

9. Fuertes C, Murguía Y. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb “Muña” de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Ciencia e Investigación* 2001; 4(1): 23-39.
10. Cañigüeral S, Vila R. La fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? *Revista Fitoterapeutica*. 2002; 2(2): 101-21.
11. Rodriguez L, Bustamante B, Huaroto L, Agurto C, Illescas R, Ramirez R, Diaz A, et al. A multi-centric study of candida bloodstream infection in Lima-Callao, Perú: Species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. *PLoS One*. 2017 12(4):175
12. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de *Mynthostachys Mollis* (MUÑA). *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2008; 25(3): 298-301
13. Torrenegra M, Granados C, Durán M, León G, Yáñez X, Martínez C, Pájaro N. Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. *Orinoquia* 2016 Jun 20(1).
14. Adwan G, Salameh Y, Adwan K. Effect of ethanolic extract of *Ecballium elaterium* against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011 1(6): 456-60.
15. Soliman S, Semreen M, El-Keblawy, Abdullah A, Uppuluri P, Ibrahim A. Assessment of herbal drugs for promising anti-*Candida* activity. *BMC Complement Altern Med* 2017 8; 17(1):257.
16. Tangarife V, Roa V, Betancur L, Duran D, Stashenko E, Mesa A. Antifungal activity of *Verbenaceae* and *Labiatae* families essential oils. *PhOL* 2012 1: 42-55.
17. Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, Momen J, Shamshiri A. The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*, an in vitro study. *J Mycol Med*. 2014 24(4):163.