



**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA IN VITRO DE PRODUCTOS VEGETALES FRENTE A
HONGOS DERMATOFITOS
IN VITRO ANTIFUNGAL ACTIVITY OF VEGETABLES PRODUCTS AGAINST
DERMATOPHYTES**

Robledo-Leal, E. 1, González, G. M.2, Elizondo-Zertuche, M.2, Adame-Rodríguez, J. M.1, Morales-Adame, D. M.3.
1 Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Av. Universidad S/N Ciudad
Universitaria, 66451. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.
2 Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Microbiología, Madero y Dr. E. A.
Pequeño s/n, Colonia Mitras Centro, 64460. Monterrey, Nuevo León, México.
3GBS Global, S.A. de C.V. Brasilia 1000-1. Col. Latinoamericana. 25270. Saltillo, Coahuila, México.
San Nicolás de los Garza, Nuevo León. Junio de 2014
e-mail: efrenjo@gmail.com, d.morales@gbsglobal.mx

Resumen

En los últimos años no solo se han incrementado las infecciones micóticas como las dermatofitosis, sino que también aumentó el número de cepas resistentes a los diferentes antifúngicos actuales. Esto ha llevado a la búsqueda e investigación de nuevos componentes, resurgiendo el uso de productos naturales. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de 9 productos vegetales (extractos, aceites y/u oleorresinas) obtenidos de dos especies del Semidesierto Mexicano: orégano (*Lippia graveolens*) y gobernadora (*Larrea tridentata*), frente a cepas del género *Trichophyton* sp., *Microsporum* sp. y *Epidermophyton* sp. comparando su actividad con la terbinafina. Se determinó la actividad antifúngica por el método de difusión en disco en medio sólido. Se midieron los diámetros de inhibición del crecimiento y se analizaron estadísticamente mediante las pruebas de ANOVA y Tukey ($p < 0.05$). Se determinó la presencia de diferencia significativa entre concentraciones de los productos y con el antifúngico. De los 9 productos evaluados, cuatro mostraron tener actividad inhibitoria en las cepas estudiadas. El producto que presentó la mayor actividad fue el aceite de orégano, inhibiendo el 100% del crecimiento de las cepas en sus concentraciones 100% (v/v). Tanto el aceite de gobernadora como su oleorresina y la oleorresina de orégano mostraron no tener diferencia significativa con terbinafina (1 $\mu\text{g/mL}$) en la concentración 100% (v/v). *Epidermophyton floccosum* mostró ser más susceptible tanto a los productos vegetales como a la terbinafina que *Microsporum gypseum*. La actividad mostrada por los productos en su concentración 100% (v/v) es comparable con la actividad de la terbinafina a 1 $\mu\text{g/mL}$. Siendo el aceite de orégano (A2) un potencial antifúngico para dermatofitos.

Palabras clave: Antifúngicos, Dermatofitos, Terbinafina, Productos Vegetales.

Abstract

In the last years there has been not only an increase in mycotic infections such as dermatophytoses, but also in the amount of strains resistant to current antifungals. This has led to the search for new compounds making research turn to natural products. The objective of this work was to evaluate the antifungal activity of 9 vegetable products (extracts, oils and/or oleoresins) obtained from two species of the Mexican Semidesert oregano (*Lippia graveolens*) and gobernadora (*Larrea tridentata*) against strains of *Trichophyton* sp., *Microsporum* sp., and *Epidermophyton* sp., comparing their effect to that of terbinafine. The antifungal activity was determined using disk diffusion on solid media. The inhibition halo was measured and analyzed using ANOVA and Tukey tests ($p < 0.05$), obtaining significant differences among treatments. Of the 9 products evaluated, 4 showed activity against all strains of dermatophytes. Oregano oil showed the highest antifungal effect, completely preventing the growth of dermatophytes when applied in a 100% concentration (v/v). The oil and oleoresin of gobernadora as well as oregano's oleoresin, showed an equal activity to terbinafine, when they were used in a 100% concentration. Oregano oil (A2) showed a superior activity and represents a potential alternative as a dermatophytes antifungal compound.

Keywords: Antifungals, Dermatophytes, Terbinafine, Vegetables Products.

1. Introducción

Las dermatofitosis son las micosis superficiales más frecuentes de amplia distribución mundial y su frecuencia está relacionada con el dermatofito causal (algunas de las especies son más predominantes que otras), el nivel socioeconómico de la población y la migración de los individuos. Estas no sólo afectan a pacientes inmunocomprometidos, sino también personas sanas, incluidos los niños de países en desarrollo que reciben atención sanitaria y educación deficiente, disminuyendo su calidad de vida. La prevalencia de las diferentes especies de dermatofitos varía según la región geográfica y climática, esto se manifiesta en la frecuencia de las distintas micosis de la piel. En México afectan al 10% de la población y constituyen 70 a 80% de las infecciones causadas por hongos. Su incidencia solo se estima en forma parcial

debido a que la mayoría de los datos publicados generalmente proceden de la consulta dermatológica (López-Martínez *et al.*, 2010).

A pesar de los nuevos antifúngicos tópicos y sistémicos, algunos de éstos sufren de varios inconvenientes al ser usados clínicamente; entre ellos, toxicidad, interacciones fármaco-fármaco, la falta de eficacia fungicida, el costo y la aparición de cepas resistentes causadas por el uso frecuente de algunos de ellos. Pudiera parecer que se tiene un gran número de antifúngicos de uso clínico pero sólo están disponibles cinco clases de antifúngicos (azoles, polienos, equinocandinas, alilaminas y griseofulvina), lo cual indica que hay un número limitado de fármacos. Esto muestra claramente la necesidad y urgencia de encontrar nuevas alternativas de componentes antifúngicos de uso clínico (Weitzman y Summerbell, 1995).

El uso de plantas medicinales en el tratamiento de enfermedades de la piel, incluyendo infecciones micóticas, es una práctica muy antigua en muchas partes del mundo. Según los informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza productos naturales con fines medicinales (OMS, 2004). Las especies vegetales sintetizan metabolitos secundarios, como las fitoanticipinas y las fitoalexinas, que se utilizan para defenderse de la infección por agentes fitopatógenos, entre ellos los hongos. Por esta razón y otras ya antes mencionadas es factible el estudio in vitro de extractos de origen vegetal contra agentes micóticos causantes de infecciones en humanos. Este resurgimiento de la terapia a base de plantas constituye una vía alternativa para evitar los efectos adversos de los compuestos sintéticos tanto en el plano médico como en el económico, ya que la ventaja de la medicina natural nos proporciona una sustancia química activa que presenta un equilibrio fisiológico más asimilable por el organismo que aquellos obtenidos por quimiosíntesis.

Se ha comprobado la actividad fungicida de productos vegetales (extractos, aceites y/u oleorresinas) obtenidos de especies del Semidesierto Mexicano como el orégano (*Lippia graveolens*) y la gobernadora (*Larrea tridentata*). Para el caso del orégano se han realizado estudios de extractos sobre *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, obteniendo concentraciones inhibitorias variables (650-1270 ppm) (Aligiannis *et al.*, 2001; Arcila-Lozano *et*

al., 2004). En otro estudio de efectividad biológica, los extractos de orégano, tanto acuosos como etanólicos, mostraron inhibición de hasta 100% a concentraciones de 30 ppm, contra *Rhizoctonia solani* (Pérez, 2010) y *Phytophthora cinnamomi* (Clemente, 2010). El efecto antifúngico del orégano frente a hongos de importancia médica, también es conocido con anterioridad; Conner y Beuchat (1984) demostraron que el aceite esencial del orégano en una concentración de 100 ppm, producía un fuerte efecto inhibitorio frente a levaduras del género *Candida*. Para la gobernadora se han estudiado las resinas, las cuáles han mostrado actividad fungicida contra *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium* spp. entre otros hongos y bacterias (Dayan y Tellez, 1999; Vargas-Arispuro *et al.*, 2005; Moreno-Limón *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2013). En un estudio de efecto antifúngico de 20 extractos de platas, Verástegui *et al.* (1995) reportaron que el extracto de gobernadora aunque no presentó actividad inhibitoria frente a levaduras de importancia clínica, sí inhibió a dermatofitos de todos los géneros, junto a cepas de *Sporothrix* y el actinomiceto *Nocardia*. Más recientemente, García-Rodríguez (2005) reportó un efecto inhibitorio en extractos etanólicos de gobernadora frente a *Trichophyton mentagrophytes* y *Candida albicans*, donde formulaciones del 15% eran suficientes para inhibir al 100% el crecimiento de estos hongos. En el presente trabajo se estudió el efecto de productos naturales obtenidos de plantas en agentes causantes de micosis superficiales.

2. Materiales y métodos.

Obtención de los productos vegetales.

Los productos vegetales fueron provistos por la empresa GBS GLOBAL, S.A. de C.V., radicada en Saltillo, Coahuila. Fueron enviados en su forma concentrada a la UANL, extraídos por metodologías diversas como se muestra en la Tabla 1. Para facilitar su manejo se les asignaron claves de identificación.

Tabla 1. Productos vegetales a ser evaluados para su capacidad antifúngica frente a dermatofitos.

Productos vegetales	Clave de identificación
Extracto etanólico de partes aéreas de gobernadora	E1H1
Extracto acetónico de gobernadora	E3H1
Extracto etanólico de hojas de gobernadora	E1PA1
Extracto etanólico de raíz de gobernadora	E1R1
Oleoresina de gobernadora	O1
Extracto acuoso de orégano	E2H2
Oleoresina de orégano	O2
Aceite de orégano	A2
Aceite de gobernadora	A1

Productos vegetales.

Se les realizaron diluciones 1:2 (v/v) a partir del concentrado con dimetilsulfóxido (DMSO) al 100%, debido a que los productos sólo mostraron ser solubles en esta concentración de DMSO. Las concentraciones finales para los ensayos fueron: 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 % (v/v), respectivamente.

Obtención de las cepas

Se trabajó con un total de 13 cepas: *Trichophyton rubrum* (n=4), *Microsporum gypseum* (n=5) y *Epidermophyton floccosum* (n=4), que fueron aisladas e identificadas en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) en la Facultad de Medicina, UANL.

Preparación de inóculos

Las cepas proporcionadas en viales se reactivaron en medio Agar Papa Dextrosa (PDA), dejándose incubar a una temperatura de 30°C por 14 días. Una vez reactivadas y puras se tomaron de 2 a 4 placas crecidas para hacer una suspensión de conidias, se raspó la superficie de la colonia con un aplicador y se suspendió en agua estéril, se pasó a un tubo estéril y se dejó reposar, se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo nuevo; con ayuda de un hematocitómetro se ajustó a la concentración de 1×10^6 conidias/mL.

Evaluación de actividad inhibitoria

El método usado fue difusión en disco en agar (Nweze *et al.*, 2010) con modificaciones mínimas. El cuál consistió en humedecer un hisopo estéril en el inóculo ajustado, se estrió en cuatro direcciones la superficie de toda la placa con medio PDA (en lugar de agar Mueller-Hinton), se dejó entreabierto en condiciones estériles por 5 min para permitir que el medio absorbiera el excedente del inóculo. En cada placa se colocaron cinco discos de papel filtro de 7 mm de diámetro, a cada disco se le

agregaron 15 µL de las 5 concentraciones de cada producto, respectivamente, en orden decreciente. Se dejaron reposar y se incubaron a 30°C por 7 días. Como control positivo se utilizó terbinafina a 1 µg/mL, concentración que permite observar el efecto antifúngico sin que el diámetro de inhibición se empalme con el resto; como control negativo se utilizó DMSO al 100%. Se usó el mismo método de inoculación con hisopo utilizando el mismo inóculo usado para los productos vegetales. Las placas de los controles y de los productos se hicieron el mismo día y todo se realizó por duplicado. Se comparó la actividad antifúngica de los productos vegetales con los controles, midiendo el diámetro de inhibición y sometiendo los valores al análisis estadístico.

Análisis estadístico

Los promedios de los diámetros de inhibición obtenidos fueron sometidos a un Análisis de Varianza (ANOVA) y posteriormente evaluados mediante la prueba de Tukey para determinar si existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de los productos y la terbinafina.

3. Resultados y Discusión

Los resultados de la evaluación de actividad antifúngica cualitativa, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividad antifúngica cualitativa de productos vegetales frente a dermatofitos.

Clave de Identificación	1	2	3
Productos Vegetales			
E1H1	-	-	-
E3H1	-	-	-

E1PA1	-	-	-
E1R1	-	-	-
E2H2	-	-	-
O1	+	+	+
O2	+	+	+
A1	+	+	+
A2	+	+	+

1: *Trichophyton rubrum* 2: *Epidermophyton floccosum* 3: *Microsporum gypseum*; (+) Mostró inhibición; (-) No mostró inhibición.

Para la evaluación de la actividad antifúngica cuantitativa se seleccionaron algunos productos vegetales que mostraron halos de inhibición del crecimiento de acuerdo a los resultados cualitativos, siendo cuatro productos los seleccionados identificados como: O1, O2, A1 y A2. La comparación cuantitativa de las medias de los halos de inhibición del crecimiento se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Actividad antifúngica cuantitativa de productos vegetales seleccionados frente a dermatofitos.*

D	100%	50%	25%	12.50%	6.25%	TBN**
A1						
1	33	24.7	25	19.2 ^a	15.7 ^a	33
2	38.3	31.1 ^a	20.3 ^a	12.1 ^a	0	37.6
3	33.3	27.2	19.2 ^a	14.3 ^a	5.2 ^a	32.2
A2						
1	78.7 ^a	77.5 ^a	47.75	36.75	18.75	33.2
2	>90 ^a	>90 ^a	>90 ^a	>90 ^a	>90 ^a	37.6
3	>90 ^a	>90 ^a	>90 ^a	>90 ^a	>90 ^a	32.2
O1						
1	44.2	33.2	26.2	19.5	12.2	33.2
2	37.8	32.4	24 ^a	17.2 ^a	6.1 ^a	37.6
3	33.9	26.7	22.2 ^a	18.2 ^a	12.9 ^a	32.2
O2						

1	34.7	22	13.0 ^a	7.7 ^a	6.2 ^a	33.2
2	37.6	30.8 ^a	23.5 ^a	16.6 ^a	6.2 ^a	37.6
3	29.4	25.0 ^a	18.6 ^a	6.3 ^a	3.7 ^a	32.2

1: *Trichophyton rubrum* 2: *Epidermophyton floccosum* 3: *Microsporum gypseum*;

D: Dermatófito; *Mostrado como las medias de los halos de inhibición en mm; **Terbinafina.

Dentro de cada fila, letras diferentes expresan diferencias significativas en comparación con terbinafina ($p < 0.05$).

Actividad inhibitoria de los productos vegetales

De los 9 productos evaluados, únicamente cuatro mostraron tener efecto inhibitorio con las cepas de dermatofitos utilizadas (Tabla 2). El aceite de orégano (A2) presentó la mayor actividad inhibitoria en todas las cepas utilizadas, mientras que su oleorresina (O2) presentó inhibición en menor proporción. Tanto el aceite como la oleorresina de gobernadora (A1 y O1) mostraron también tener efecto inhibitorio.

Los productos vegetales A1, A2, O1 y O2 mostraron actividad antifúngica frente a todos los dermatofitos evaluados. Todos a excepción de A2, mostraron un efecto estadísticamente similar al de la terbinafina cuando se emplearon al 100%; A2 mostró una actividad significativamente mayor que la terbinafina, al ser empleado en su concentración más alta (Figura 1).



(a)

(b)

Figura 1. (a) Terbinafina 1µg/mL; (b) A2 en concentraciones de 100, 6.25, 12.5, 25 y 50% (iniciando por parte superior hacia la derecha).

Numerosos estudios *in vitro* de productos vegetales como lo son los extractos contra distintos patógenos humanos han mostrado tener buenos resultados, comparados con antibióticos o antifúngicos dependiendo del microorganismo a evaluar. El aceite de orégano A2 mostró tener la mejor inhibición incluso que la terbinafina, con un 100% de inhibición en el desarrollo *in vitro* de *Microsporum gypseum* y *Epidermophyton floccosum*, estos resultados son similares en cuanto a la actividad de inhibición del aceite de orégano (García-Camarillo *et al.*, 2006), el cual inhibe en un 91% el crecimiento de *Aspergillus flavus* a 100 ppm mientras que a 200 ppm la inhibición del crecimiento es total.

Algunos estudios sugieren que la actividad antimicrobiana del aceite de orégano es atribuible al carvacrol, más que al timol, aunque se ha reportado que el timol es un agente antimicótico (Rasooli y Razzaghi, 2004). Mientras que el extracto acuoso de orégano E2H2 no mostró inhibición en ninguna de las cepas estudiadas, estos resultados pueden variar debido a las condiciones del proceso de extracción empleadas para la obtención de los productos vegetales (extractos, aceites y oleorresinas), ya que dependiendo de la polaridad de los solventes se extraen compuestos diferentes y aunado a esto se pueden obtener distintos rendimientos,

concentraciones y distintos componentes activos (Dunford y Silva-Vazquez, 2005).

Los productos A1, O1 y O2 en la concentración 100% (v/v) mostraron tener una actividad similar a la terbinafina a 1µg/mL al no mostrar diferencia significativa ($p < 0.05$). Dado que los productos se probaron en su forma de prototipo, es válido suponer que la actividad biológica podría incrementarse. Para ello, se podría realizar un estudio de caracterización química para fundamentar la elaboración de un formulado que contenga los principales componentes activos de cada producto vegetal para la obtención de un producto terminado de mayor actividad antifúngica, para su uso en micosis cutáneas superficiales de humanos y animales.

Los extractos acuosos, acetónicos y etanólicos de gobernadora no mostraron tener actividad inhibitoria en nuestro estudio, sin embargo, sí se han reportado en varias investigaciones resultados positivos para la inhibición de dermatofitos y otros hongos del ambiente e inclusive en levaduras (Ahmad, *et al.*, 2005; Guerrero *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2009; Soto-Domínguez *et al.*, 2012).

El estudio de extractos sobre dermatofitos es escaso, no se cuenta con muchos antecedentes sobre ello y en paralelo con esto, aún no se establece una metodología para el estudio de extractos vegetales en dermatofitos. En 2010, el Clinical and Laboratory Standards Institute desarrolló un método alternativo de referencia para determinar la susceptibilidad de hongos filamentosos (M51-A) pero este no es

aplicable en dermatofitos. Esto no impide la búsqueda de un método que sea adecuado para estos hongos en particular. El método de difusión en disco en agar propuesto por Newze y colaboradores (Newze *et al.*, 2010), utilizado en este estudio mostró ser sencillo de realizar, reproducible en cuanto a los resultados obtenidos, ya que no mostraron variaciones entre repeticiones y de un bajo costo en comparación con otras metodologías. Sin embargo, existen varios factores que podrían afectar en los resultados como son: la composición y el método de obtención de cada extracto, ya que cada uno presenta diferentes componentes activos, esto también depende de la parte de la planta utilizada, así como la volatilidad, solubilidad y complejidad de los solventes utilizados; estos factores dificultan la estandarización de un método estándar de susceptibilidad antifúngica de productos vegetales, no solo para dermatofitos, sino para la evaluación de productos naturales en general frente a cualquier microorganismo.

Conclusión

El aceite de orégano (A2) fue el mejor producto vegetal que inhibió los dermatofitos estudiados: *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum* y *Epidermophyton floccosum* a nivel *in vitro*; seguido por el aceite de gobernadora (A1), su oleorresina (O1) y la oleorresina de orégano (O2), y fueron comparables con la actividad de la terbinafina empleada en concentración de 1µg/mL. Estos resultados sugieren un

potencial para su aplicación tópica, una vez que se realicen más estudios para probar su reproducibilidad y su inocuidad. Esta posibilidad representa una alternativa atractiva para tratamiento de micosis en piel de humanos y animales, ya que se podrían elaborar productos orgánicos naturales a partir de plantas del Semidesierto Mexicano que son ricas en fitomoléculas, las cuales tienen el potencial de actuar como antifúngicas, dándoles un valor agregado y sustituyendo los químicos sintéticos en la industria farmacéutica.

Agradecimientos.

Este estudio forma parte del proyecto titulado: “Desarrollo de nuevos productos tópicos biorgánicos para el tratamiento de micosis cutáneas superficiales de humanos por acción de fitomoléculas presentes en extractos vegetales”, apoyado por el Fondo de Innovación Tecnológica, Biotecnología, Convocatoria C0009-2011-3, Secretaría de Economía-CONACyT, con clave: 173431 y pertenece a la empresa GBS Global, S.A. de C.V. en vinculación con la UANL.

Referencias

López-Martínez R., Manzano-Gayosso R., Hernández-Hernández F., Bazán-Mora E., Méndez-Tovar L.J. (2010). “Dynamics of dermatophytosis frequency in Mexico: an analysis of 2084 cases”. *Med Mycol.* 48 (3); May 2010, pp. 476-479.

Weitzman I., Summerbell R.C. (1995). “The Dermatophytes”. *Clin Microbiol Rev.* 8(2); Apr 1995, pp. 240–259.

Organización Mundial de la Salud. (2004). Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Disponible en:

<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>

Aliyiannis N., Kalputzakis B., Mitaku S., Chinou I. B. (2001) “Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two organum species”. *J. Agric. Food Chem.* 49 (9); August 2001, pp. 4168–4170.

Arcila-Lozano C.C., Loarca-Piña G., Lecona-Urbe S., González E., (2004). *El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes.* Archivos Latinoamericanos de Nutrición 54 (1); March 2004, pp. 100–111.

Pérez, M.E., (2010). *Actividad antifúngica in vitro de extractos de plantas del sureste de Coahuila en diferentes solventes contra Rhizoctonia solani Kuhn.* Tesis de nivel Licenciatura. División de Agronomía, Departamento Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. p. 74.

Clemente, J.A., (2010). *Actividad antifúngica in vitro de extractos vegetales del Semidesierto de Coahuila obtenidos en solventes*

orgánicos contra *Phytophthora cinnamomi* Rands. Tesis de nivel Licenciatura. División de Agronomía, Departamento Parasitología. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, Mexico. p. 62.

Conner D.E., Beuchat L.R. (2006). "Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts". *J Food Sci.* 49 (2); 2006, pp. 429-424.

Dayan, F.E., Tellez, M.R. (1999) "Phytotoxicity of tarbush (*Flourensia cernua* D.C.) leaf extracts". *Allelopathy Journal.* 6; 1999, pp. 1-12.

Vargas-Arispuro I., Reyes-Báez R., Rivera-Castañeda G., Martínez-Tellez M.A., Rivero-Espejel I. (2005). "Antifungal lignans from the creosote Bush (*Larrea tridentata*)". *Ind Crop Prod.* 22: pp.101-107.

Moreno-Limón S., González-Solís L.N., Salcedo-Martínez S.M., Cárdenas-Avila M.L., Perales-Ramírez A. (2011). *Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (Larrea tridentata l.) sobre la inhibición in vitro de Aspergillus flavus y Penicillium sp.* Polibotánica. 32; August 2011, pp. 193-205.

Martins S., Amorim E.L.C., Tadeu J.S., Sobrinho P., et al. (2013). "Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves". *Ind Crop Prod.* 41; January 2013, pp. 306-311.

Verástegui M.A. (1995). *Análisis del efecto antifúngico de 20 extractos de plantas.* Tesis de nivel Maestría con especialidad en Microbiología. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. p. 43.

García-Rodríguez R. (2005). *Extracción etanólica de la gobernadora (Larrea tridentata) y su acción biológica en los dermatofitos (Trichophyton mentagrophytes y Candida albicans).* Premios de investigación 2007, Secretaría de Salud Pública, Gobierno del Estado de Sonora.

Nweze E.I., Mukherjee P.K., Ghannoum. (2010). "Agar-Based Disk Diffusion Assay for Susceptibility Testing of Dermatophytes". *J Clin Microbiol.* 48 (10); July 2010, pp. 3750-3752.

García-Camarillo, E. A., Quezada-Viay, Y., Moreno-Lara, J., Sánchez-Hernández, G., Moreno-Martínez, E. y Pérez-Reyes, M. C. J. (2006) "Actividad Antifúngica de Aceites Esenciales de Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y Orégano (*Origanum vulgare* L.) y su Efecto sobre la Producción de Aflatoxinas en Nuez Pecanera [*Carya illinoensis* (F.A. Wangenh) K. Koch]". *Revista Mexicana de Fitopatología.* 24 (1); January-June 2006, pp. 8-12,

Rasooli I., Razzaghi M. (2004). *Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by Aspergillus parasiticus.* Food Control 15 (1); September 2004, pp. 479-483.

Dunford N.T., Silva-Vazquez R. (2005). "Effect of water stress on plant growth and thymol and carvacrol concentrations in Mexican oregano grown under controlled conditions". *J Appl Hort.* 7 (1); 2005, pp. 20–22.

Ahmad N., Alam M.K., Shehbaz A., Khan A., Mannan A., Rashid H.S., Bisht D., Owais M. (2005). "Antimicrobial activity of clove oil and its potential in the treatment of vaginal candidiasis". *J Drug Target.* 13 (10); December 2005, pp. 555–56.

Guerrero E., Solis S., Hernández F.D., Flores A., Sandoval V., Jasso D. (2007). "Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.), Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum*. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 25(1); January-June 2007, pp. 48-53.

Pinto E., Vale S.L., Cavaleiro C. y Salgueiro L. (2009). "Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species". *J Med Microbiol.* 58 (Pt 11); November 2009, pp. 1454-1462.

Soto-Domínguez A., García-Garza R., Ramírez-Casas Y., Morán-Martínez J. y Serrano-Gallardo L.B. (2012). "El extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens* HBK) del norte de México tiene actividad antioxidante sin

mostrar un efecto tóxico *in vitro* e *in vivo*". *Int. J. Morphol.* 30(3); September 2012, pp. 937-944.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2010). *Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of non dermatophyte filamentous fungi; approved guideline.* CLSI document M51-A. USA: Clinical Laboratory Standards Institute.