

Aceite esencial de *Thymus vulgaris* L (tomillo), su combinación con EDTA contra *Cándida albicans* y formulación de una crema

Thymus vulgaris L (thyme) essential oil and its combination with EDTA against *Candida albicans*; formulation of a cream

Juan Rojas Armas^{1,a}, José Ortiz Sánchez^{1,b}, José Jáuregui Maldonado^{2,c},
Julio Ruiz Quiroz^{2,c}, Robert Almonacid Román^{2,d}

¹ Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

^a Profesor Asociado, Ciencias Dinámicas; Instituto de Investigaciones Clínicas.

^b Profesor Principal, Ciencias Dinámicas; Instituto de Biología Andina.

² Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

^c Profesor Asociado; ^d Profesor Auxiliar.

Resumen

Introducción. El patógeno *Cándida albicans* puede causar infecciones invasivas graves y frecuentes lesiones superficiales. Los fármacos usados en el tratamiento presentan inconvenientes y es necesario buscar alternativas. **Objetivos.** Determinar la actividad del aceite esencial (AE) de *Thymus vulgaris* y de su combinación con EDTA sobre *Cándida albicans*, y formular una crema con el AE suplementado con derivados terpénicos naturales. **Diseño.** Estudio experimental in vitro y toxicidad in vivo. **Lugar.** Facultad de Medicina y Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. **Material biológico.** Cepa de *Cándida albicans* para las pruebas in vitro y conejos para la toxicidad dérmica. **Métodos.** La actividad antifúngica se determinó por el método de difusión en pozo de agar; la concentración inhibitoria mínima (CIM), por el método de microdilución en caldo. La crema se formuló con el AE al 1% y otra suplementada con carvacrol, timol, citral y EDTA. La toxicidad dérmica se determinó en conejos. **Principales medidas de resultados.** Halos de inhibición, CIM, signos de toxicidad. **Resultados.** El AE a 100 mg/mL inhibió el crecimiento de *Cándida albicans* con halos de inhibición de $30,33 \pm 0,58$ mm, mientras que la adición de EDTA produjo halos de $35,33 \pm 0,58$ mm. La CIM para el AE y AE + EDTA fue de 8 mg/mL y 0,5 mg/mL, respectivamente. La crema con AE 1% produjo halos de inhibición de $13,33 \pm 0,58$ mm, mientras que la adición de EDTA, timol, carvacrol y citral aumentó el halo hasta $24,33 \pm 0,58$ mm. No se evidenció signos de toxicidad dérmica en conejos. **Conclusiones.** El AE de *Thymus vulgaris* presentó actividad inhibitoria sobre *Cándida albicans* y el EDTA incrementó dicha actividad; asimismo, el aceite esencial, EDTA, carvacrol, timol y citral formulados en una crema mostraron efecto sinérgico y sin signos de toxicidad dérmica.

Palabras clave. *Thymus*; Tomillo; *Cándida albicans*; EDTA; Crema; Conejos.

Abstract

Introduction: *Candida albicans* may cause severe invasive infections and frequently superficial lesions. Drugs used in treatment present drawbacks and search of alternatives becomes necessary. **Objectives:** To determine the activity of *Thymus vulgaris* essential oil (EO) alone and combined with EDTA on *Candida albicans*, and formulate a cream with EO supplemented with natural terpenes. **Design:** In vitro experimental and in vivo toxicity study. **Setting:** Faculty of Medicine and Faculty of Pharmacy, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru. **Biological material:** *Candida albicans* strain for in vitro study and rabbits for dermal toxicity tests. **Methods:** Antifungal activity was determined by agar well diffusion method, and minimum inhibitory concentration (MIC) by broth microdilution method. A cream was formulated with EO 1% and another supplemented with carvacrol, thymol, citral and EDTA. Dermal toxicity in rabbits was determined. **Main outcome measures:** Inhibition halos, MIC, signs of toxicity. **Results:** EO at 100 mg/mL inhibited *Candida albicans* growth with 30.33 ± 0.58 mm inhibition halos; adding EDTA produced 35.33 ± 0.58 mm halos. MIC for EO and EO + EDTA was respectively 8 mg/mL and 0.5 mg/mL. EO 1% cream originated 13.33 ± 0.58 mm inhibition halos, and addition of EDTA, thymol, carvacrol and citral increased halos to 24.33 ± 0.58 mm. No signs of dermal toxicity in rabbits were observed. **Conclusions:** *Thymus vulgaris* EO showed inhibitory activity against *Candida albicans* and EDTA increased this activity; essential oil, EDTA, carvacrol, thymol and citral formulated in cream also showed synergistic effect without evidence of dermal toxicity.

Keywords: *Thymus*; Thyme; *Candida albicans*; EDTA; Cream; Rabbits.

INTRODUCCIÓN

La frecuencia de infecciones fúngicas invasivas se ha incrementado con el aumento del número de pacientes de riesgo, siendo las especies de *Cándida* las causantes de infecciones fúngicas más comunes ⁽¹⁾. Entre los pacientes de la unidad de cuidados intensivos (UCI), las especies de *Cándida* son la tercera causa más común de infección sanguínea nosocomial, y la mortalidad atribuible a candidemia es cerca del 40%, siendo *Cándida albicans* el patógeno humano más común ⁽²⁾. Asimismo, las infecciones superficiales de la piel están entre las enfermedades más comunes observadas en la práctica diaria, y son causadas principalmente por dermatofitos, levaduras y mohos. *Cándida albicans* es la más virulenta de las levaduras y puede causar enfermedades de la piel, uñas y membranas mucosas ⁽³⁾.

Los fármacos antifúngicos actualmente disponibles presentan problemas de toxicidad, resistencia, interacciones farmacológicas y elevado precio; además del precio de la droga, el costo de la terapia antifúngica incluye los costos asociados a la mortalidad por el fracaso del tratamiento, hospitalización prolongada y tratamiento de las complicaciones, y tratamiento antifúngico adicional para compensar el tratamiento primario ^(4,4). Por esto es necesario la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos. En este contexto, las plantas medicinales representan una potencial alternativa.

Thymus vulgaris L. es un subarbusto de la familia *Lamiaceae*, que es perenne y aromática, rica en aceite esencial, cuyo principal componente es el timol ⁽⁵⁾. Es una planta introducida de Europa y en la medicina tradicional peruana se conoce como 'tomillo' y se utiliza el aceite esencial como antiséptico ⁽⁶⁾. Se ha demostrado que el extracto de esta planta tiene efecto antiviral contra HSV-1, HSV-2 y HSV-1 resistente a aciclovir ⁽⁷⁾ y efecto relajante sobre anillos traqueales de cobayo comparable a teofilina ⁽⁸⁾; mientras que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* ha mos-

trado actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Vibrio spp*, *Listeria monocytogenes*, *Propionibacterium acnes* ^(9, 10, 11); además, actividad citotóxica contra 3 líneas celulares de cáncer humano -células de carcinoma de próstata humano (PC-3), carcinoma pulmonar humano (A549) y cáncer de mama humano (MCF-7) ⁽¹¹⁾-, y significativa actividad antioxidante ⁽¹²⁾.

En Francia, Giordani y col ⁽¹³⁾ demostraron que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* potencia la acción de la anfotericina B contra *Cándida albicans*; sin embargo, muchos factores medioambientales alteran la composición química tanto cualitativa como cuantitativa de los metabolitos secundarios, lo cual influye directamente en sus propiedades farmacológicas. También se ha demostrado actividad contra *Cándida* de derivados terpenoides, como carvacrol y timol ^(14, 15), del citral ⁽¹⁶⁾, así como del quelante etilendiaminotetraacetato (EDTA) ⁽¹⁷⁾. Por lo que, basados en estos antecedentes y teniendo en cuenta que no se ha reportado ningún estudio realizado en el Perú sobre actividad antifúngica de *Thymus vulgaris*, nos propusimos determinar la actividad sobre *Cándida albicans* del aceite esencial de *Thymus vulgaris* y de su combinación con EDTA en un modelo in vitro, así como formulación de una crema con este aceite esencial suplementado con carvacrol, timol y citral.

MÉTODOS

La planta *Thymus vulgaris* L fue colectada en Lima, Perú. Una muestra fue llevada al museo de Historia Natural de la UNMSM para su identificación taxonómica (constancia N° 078-HSM-USM-2012). El aceite esencial (AE) fue obtenido por arrastre con vapor de agua en un aparato tipo cleveger ⁽¹⁸⁾, para lo cual se utilizó las hojas frescas de la planta; el aceite esencial fue separado y deshidratado con Na₂SO₄ anhidro, se filtró y guardó en un frasco de vidrio color ámbar bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C, hasta su uso.

La cepa de *Cándida albicans* ATCC 10231 fue proporcionada por el laboratorio de Microbiología del Instituto en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo" Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

En la preparación del inóculo de *Cándida albicans*, para el método de difusión en pozo de agar se utilizó *Cándida albicans* crecida en agar dextrosa Sabouraud de 48 h a 28°C, para la preparación de la suspensión del inóculo. La levadura se suspendió en solución salina 0,85% estéril y se ajustó la turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland (1 x 10⁶ ufc/mL).

Para el método de microdilución en caldo, se preparó por turbidimetría un inóculo de *Cándida albicans* de 1 - 5 x 10³ ufc/mL. El inóculo stock fue preparado con *Cándida albicans* crecida en agar dextrosa Sabouraud al 4% (Merck®) en el día 2 a 28°C. El microorganismo fue suspendido en solución salina 0,85% estéril y se ajustó la turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland; en seguida se realizó una doble dilución, de 1:50 y de 1:20, con el medio RPMI 1640 con L-glutamina y sin bicarbonato de sodio (Sigma-Aldrich®), para obtener un inóculo de 1 - 5 x 10³ ufc/mL (inóculo 2x).

Para la determinación de la actividad antifúngica in vitro se utilizó el método de difusión en pozo de agar ⁽¹⁹⁾. Placas petri de 90 mm de diámetro fueron preparadas con agar dextrosa Sabouraud y sembradas con *Cándida albicans*. Se agregó 1 mL de suspensión del inóculo (1 x 10⁶ ufc/mL) por cada 100 mL de medio de cultivo, se mezcló asépticamente y se agitó suavemente; luego se repartió en las placas a razón de 20 mL por placa y se dejó solidificar. Finalmente, se hizo pozos en el agar con un sacabocado de acero de 11 mm de diámetro externo; en cada placa se hizo 5 pozos equidistantes. El AE fue pesado y disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) al 1% para obtener concentraciones de prueba de 25, 50, 75 y 100 mg/mL, de las cuales se virtió 50 µL en cada pozo.

El EDTA se adicionó al aceite esencial en una concentración de 4 mg/mL. También se determinó la actividad antifúngica de la crema preparada, agregando 50 μ L en los pozos. Las placas se dejaron reposar por un periodo de 60 minutos a temperatura ambiente y luego se incubaron a 37°C por 48 horas. Se utilizó DMSO al 1% como control negativo y fluconazol (0,2 mg/mL) como control positivo. Las pruebas se realizaron por triplicado. La lectura e interpretación de los resultados se realizó con la observación de las zonas claras de inhibición del crecimiento, mediante el registro de los diámetros en mm de estas zonas. Se consideró tener una actividad antifúngica significativa a un halo de inhibición mayor a 18 mm ⁽²⁰⁾.

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), se tomó como base los protocolos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (*Clinical and Laboratory Standards Institute: CLSI*), protocolo M27-A3 ⁽²¹⁾ estandarizado por Ruiz JR., 2012 ⁽²²⁾. El AE de *Thymus vulgaris* L disuelto en DMSO 1% fue sometido a diluciones dobles seriadas en el medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 con rojo de fenol y sin bicarbonato (Sigma-Aldrich®), obteniendo 10 diluciones doblemente concentradas finales, en el rango de 31,25 – 16 000 μ g/mL. Se utilizó fluconazol como control positivo, en un rango de concentraciones de 0,125 - 64 μ g/mL. El control negativo fue el medio RPMI 1640 con resazurina. Para la prueba de microdilución se procedió teniendo en cuenta que por cada 20 mL de la suspensión del inóculo 2x se agregó 0,1 mL de la solución de resazurina 20 mg/mL. La prueba de microdilución fue realizada en microplacas (Brand®) estériles de 96 pozos; se colocó 100 μ L/pozo de cada dilución 2x de la muestra y del fluconazol; luego se adicionó a cada pozo 100 μ L del inóculo 2x con indicador resazurina. En otra fila también se colocó 200 μ L del medio RPMI 1640 con resazurina, sirviendo estos como control de esterilidad, y 100 μ L del medio RPMI más 100 μ L del inóculo 2x con indicador

resazurina, sirviendo estos pozos como control de crecimiento. Las microplacas se incubaron a 37°C por 24 h. La lectura de resultados se hizo visualmente. Cualquier cambio de color de púrpura a rosado o incoloro fueron registrados como positivos. La concentración más baja a la que no se produjo el cambio de color se tomó como el valor de la CIM. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

En la formulación de la crema, el AE de *Thymus vulgaris* se adicionó en una concentración de 1%. También se formuló una crema a la que además se añadió EDTA en concentración de 4 mg/mL (0,4%), y otra con AE 1% + EDTA 0,4% + carvacrol 1% + timol 1% y citral 1%. Como control se utilizó una crema sin AE, y otra con fluconazol 0,2 mg/mL. Fueron formuladas en una base hidrosoluble.

Para la prueba de irritabilidad/corrosión dérmica aguda, se procedió según la directriz 404 de la *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) ⁽²³⁾. Se utilizó 25 conejos albinos Nueva Zelandia machos, jóvenes adultos, procedentes de la Facultad de Medicina veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con una masa corporal de 1,8-2,5 kg. Fueron mantenidos durante el ensayo a temperatura y humedad controladas y un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 h. Un día antes de la prueba, se tomó varios animales al azar, se les depiló y rasuró en la superficie de la región dorsal del lomo en un área de 10x18 cm², distancia equidistante de la columna vertebral, y se seleccionó aquellos que mostraron la piel intacta. Los animales fueron asignados aleatoriamente a 5 grupos (n = 5): crema sin AE (control), crema con AE 1%, crema con AE 1% + EDTA 0,4%, crema con AE 1% + EDTA 0,4% + carvacrol 1% + timol 1% + citral 1%, y crema con fluconazol 0,2 mg/mL. Para el ensayo se aplicó 0,5 g de la crema en un área de 6 cm², cubierta con gasa y adherida a la piel con un esparadrapo hipoalérgico. Una vez transcurridas 4 h, se retiró los parches y la muestra fue removida empleando

agua. Las observaciones de la zona de aplicación se realizó a las 0,5, 1, 24, 48 y 72 h. En caso de presencia de signos clínicos de toxicidad en ese periodo, la observación se prolongó hasta los 14 días. Las reacciones en la piel para el eritema y edema se establecieron según el sistema descrito para la evaluación de la irritación de la piel. Para dar los resultados de la prueba, se comparó los valores obtenidos con los del sistema de clasificación para irritabilidad/corrosión dérmica.

Los datos obtenidos de la prueba de susceptibilidad fueron expresados como media \pm desviación estándar y las comparaciones entre los grupos experimentales fueron realizadas por ANOVA de una vía seguido por una prueba post-hoc de Scheffé. Las medias fueron consideradas significativamente diferentes cuando $p < 0,05$. Se utilizó el software SPSS versión 19.

RESULTADOS

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. inhibió el crecimiento de *Cándida albicans* de manera dependiente de la concentración, produciendo halos de inhibición de $30,33 \pm 0,58$ mm a la concentración de 100 mg/mL. Comparando con el control fluconazol, hubo diferencia significativa con las concentraciones de 50, 75 y 100 mg/mL ($p = 0,001$). La adición de EDTA 4 mg/mL al AE aumentó el tamaño de los halos de inhibición en las diferentes concentraciones, siendo mayor con 25 mg/mL (59,5% de aumento), mientras que con 100 mg/mL se observó halos de $35,33 \pm 0,58$ mm con aumento de 16,5% (tabla 1).

La crema formulada con AE de *Thymus vulgaris* al 1% + EDTA produjo halos de inhibición de $21,00 \pm 1,00$ mm, mientras que la adición de timol, carvacrol y citral aumentó significativamente el halo de inhibición hasta $24,33 \pm 0,58$ mm ($p < 0,05$) (tabla 2).

La concentración inhibitoria mínima (CIM) para el AE de *Thymus vulgaris* y AE + EDTA fue de 8 mg/mL y 0,5

Tabla 1. Actividad antifúngica del AE de *Thymus vulgaris* e influencia de EDTA contra *Cándida albicans* por el método de difusión en pozo de agar.

Concentración mg/mL	Halo de inhibición (mm)		% de aumento
	AE de <i>T. vulgaris</i>	AE de <i>T. vulgaris</i> + EDTA	
25	15,67 ± 0,58	25,00 ± 0,0*	59,5
50	24,33 ± 0,58*	29,67 ± 0,58*	21,9
75	27,33 ± 0,58*	32,33 ± 0,58*	18,3
100	30,33 ± 0,58*	35,33 ± 0,58*	16,5
Control negativo: DMSO 1%	0,00		
Fluconazol 0,2 mg/mL	17,00 ± 1,00		

Valores expresados como media ± DE, de muestras trabajadas en triplicado.

*p = 0,001 vs. fluconazol.

Tabla 2. Actividad antifúngica de la crema preparada con aceite esencial (AE) de *Thymus vulgaris*, EDTA y derivados terpénicos.

Componentes de la crema	Halo de inhibición (mm)
Sin AE (control)	0,00 ± 0,00
AE 1%	13,33 ± 0,58
AE 1% + EDTA 0,4%	21,00 ± 1,00*
AE 1% + EDTA 0,4% + carvacrol, timol, citral (1%)	24,33 ± 0,58*
Fluconazol 0,2 mg/mL	16,00 ± 1,00

Valores expresados como media ± DE, de muestras trabajadas en triplicado.

*p = 0,001 vs. AE 1%.

mg/mL, respectivamente. El fluconazol usado como control positivo mostró una CIM de 0.25 µg/mL.

La crema formulada con AE 1% y en la que además se adicionó EDTA, timol, carvacrol y citral no presentaron alguna evidencia de toxicidad dérmica en conejos.

DISCUSIÓN

En la presente investigación, el AE de *Thymus vulgaris* L. mostró actividad anti-*Cándida albicans* de manera dependiente de la concentración, alcanzando halos de inhibición de 30,33 ± 0,58 mm con la concentración de 100 mg/mL (tabla 2), lo cual fue significativo. La adición de EDTA al aceite esencial produjo un efecto sinérgico, evidenciándose un mejor incremento de la actividad con la menor dosis de 25 mg/mL, con una variación del halo de inhibición de

15,67 ± 0,58 a 25,00 ± 0,00 mm, lo cual representó el 59,5% de aumento.

En la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos, de fuentes naturales, se ha encontrado que los aceites esenciales de otras plantas medicinales tienen actividad contra *Cándida albicans*. Así se ha evidenciado en estudios in vitro con los aceites esenciales de *Coriandrum sativum* L. (24), *Cymbopogon citratus* y *Syzygium aromaticum* (25), *Pimpinella anisum* L. (26), *Mintostachys mollis* (27), *Salvia officinalis* (28), *Lippia sidoides* (19), *Aloysia triphylla* (29), también el aceite del árbol de té y sus componentes derivados -específicamente el terpinen-4-ol-, exhibieron fuerte actividad antimicrobiana contra biofilms de *Cándida albicans* (30). En modelos experimentales in vivo, el aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (árbol de te) y su principal componente terpinen-4-ol protegió a ratones con candidiasis oral experimental (31), y el aceite esencial de geranio y su compo-

nente geraniol protegió la candidiasis vaginal experimental en ratones (32).

La concentración inhibitoria mínima (CIM) determinada en este estudio para el AE de *Thymus vulgaris* fue 8 mg/mL, la cual varió a 0,5 mg/mL con la adición de EDTA al AE. Teniendo en cuenta la definición propuesta por Duarte y col., 2005, que considera fuerte actividad una MIC hasta 0,5 mg/mL, moderada actividad MIC entre 0,51 y 1 mg/mL, y débil actividad MIC superior a 1,1 mg/mL (33), la combinación de AE y EDTA produjo una fuerte actividad antifúngica con un evidente sinergismo. Se ha demostrado que EDTA, un anticoagulante quelante de metales, posee actividad antimicrobiana de amplio espectro en cultivos planctónicos y biofilm, sugiriéndose que su efecto fue debido a su capacidad de secuestrar los iones divalentes esenciales para la matriz extracelular polimérica de la estructura del biofilm (34). Ramage y col., 2007, encontraron que la expresión genética de la proteína 1 de la pared de las hifas de *Cándida albicans* fue reducida en muestras planctónicas y biofilm tratadas con EDTA, por lo que la inhibición del biofilm sería probablemente a través de su efecto inhibitorio sobre la filamentación, lo cual es relevante porque *C. albicans* fácilmente forma biofilm en superficies tanto inanimadas como biológicas (17). Además, EDTA mostró actividad bactericida contra patógenos periodontales y no tuvo toxicidad en células mamíferas (35).

El AE de *Thymus vulgaris* también ha demostrado eficacia terapéutica antifúngica en solución al 1% cuando se evaluó contra dermatomicosis experimentalmente inducida en ratas, usando dermatomicetos más frecuentes, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, and *T. tonsurans*, donde los animales tratados fueron curados, durante un periodo de observación de 37 días (36).

Los monoterpenos, como timol, carvacrol y citral, también han mostrado actividad contra *Cándida albicans*. Timol y carvacrol, a diferencia de la naturaleza fungistática del fluconazol, pre-

sentaron fuerte efecto fungicida contra aislados de *Cándida*, dañaron significativamente la biosíntesis de ergosterol y rompieron la integridad de la membrana⁽¹⁵⁾. El tratamiento profiláctico con carvacrol erradicó la carga vaginal de *Cándida albicans* de ratas infectadas y podría ser considerado como un producto prometedor en el tratamiento de candidiasis vaginal⁽³⁷⁾. El citral fue efectivo contra aislados de *Cándida sp.*, deteniendo el ciclo celular de *Cándida albicans* en fase S y causó más del 50% de inhibición de inducción del tubo germinal, exhibiendo excelente actividad contra la forma levadura e hifas de *Cándida albicans* a concentraciones que no son tóxicas para las células HeLa⁽³⁸⁾.

En este estudio, la crema preparada con el AE de *Thymus vulgaris* L. mostró actividad contra *Cándida albicans* y la adición de EDTA incrementó el tamaño de los halos de inhibición en 57,5%, mientras que la adición de carvacrol, timol y citral produjo efecto sinérgico (tabla 2), aumentando la actividad en 82,5%; por lo tanto, el efecto atribuido a los terpenoides representó el 24,9%, lo cual fue significativo ($p < 0,05$). Por otra parte, en la prueba de irritabilidad/corrosión dérmica en conejos, la crema no mostró algún signo de toxicidad. Esto podría convertir a este preparado en un potencial producto para el tratamiento de candidiasis cutánea y de mucosas. Se sugiere continuar los estudios de eficacia in vivo.

Se concluye que, en las condiciones experimentales, el AE de *Thymus vulgaris* fue eficaz in vitro contra *Cándida albicans* y el EDTA incrementó la actividad. Asimismo, el aceite esencial, EDTA, carvacrol, timol y citral formulados en una crema mostraron efecto sinérgico contra *Cándida albicans*, sin signos de toxicidad dérmica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Rapp RP. Changing strategies for the management of invasive fungal infections. *Pharmacother*. 2004;(2):4S-28S.

- Kauffman C. Fungal infections. *Proc Am Thorac*. 2006;3:35-40.
- Ho K, Cheng T. Common superficial fungal infections – a short review. *Med Bull*. 2010;15(11):23-7.
- Badiee P, Alborzi A, Shakiba E, Farshad S, Japoni A. Susceptibility of *Candida* species isolated from immunocompromised patients to antifungal agents. *Eastern Mediterranean Health J*. 2011;17(5):425-30.
- Sartoratto A, Machado A, Delarmelina C, Figueira G, Duarte M, Rehder V. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian J Microbiol*. 2004;35:275-80.
- Brack A. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Cuzco: Centro de Estudios Regionales Andinos "Bartolomé de las Casas"/PNUD, 1999.
- Nolkemper S, Reichling J, Stintzing FC, Carle R, Schmitzler P. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the *Lamiaceae* family against *Herpes simplex virus* type 1 and type 2 in vitro. *Planta Med*. 2006;72(15):1378-82.
- Boskabady M, Aslani M, Kiani S. Relaxant effect of *Thymus vulgaris* on guinea-pig tracheal chains and its possible mechanism(s). *Phytother Res*. 2006;20:28-33.
- Mohsenzadeh M. Evaluation of antibacterial activity of selected Iranian essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nutrient broth medium. *Pak J Biol Sci*. 2007;10(20):3693-7.
- Snoussi M, Hajlaoui H, Noumi E, Usai D, Sechi L, Zanetti S, Bakhruf A. In-vitro anti-*Vibrio spp.* activity and chemical composition of some Tunisian aromatic plants. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008;24:3071-6.
- Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, Wu N. Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules*. 2010;15(5):3200-10.
- Chizzola R, Michitsch H, Franz C. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. *J Agric Food Chem*. 2008;56(16):6897-904.
- Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H. Antifungal Effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother Res*. 2004;18:990-5.
- Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complementary and Alternative Med*. 2011;11:119. Disponible en internet en <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/11/119>
- Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30:41-50.
- Mesa-Arango A, Montiel-Ramos J, Zapata B, Durán C, Betancur-Galvis C, Stashenko E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(6):878-84.
- Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition on *Candida albicans* biofilm formation using divalent cation chelators (EDTA). *Mycopathologia*. 2007;164(6):301-6.
- Lahlou M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *J Phytother Res*. 2004;18:435-48.
- Fontenelle R, Morais S, Brito E, Kerntopf M, Brilhante R, Cordeiro R, et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59:934-40.
- Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2003;88:199-204.
- Clinical and Laboratory Standards Institute: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 3 edition. CLSI document M27-A3 and Supplement S3. Wayne, PA, USA; 2010.
- Ruiz JR. Estandarización del método de microdilución de placa para determinar la actividad antifúngica in vitro de extractos de plantas medicinales peruanas. Tesis de Maestría en microbiología. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2012.
- OECD. Guideline for the testing of chemicals. 404. Acute Dermal Irritation/corrosion. 2002.
- Soares BV, Morais SM, dos Santos Fontenelle RO, Queiroz VA, Vila-Nova NS, Pereira CM, et al. Antifungal activity, toxicity and chemical composition of the essential oil of *Coriandrum sativum* L. fruits. *Molecules*. 2012;17(7):8439-48.
- Khan MS, Ahmad I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol*. 2012;140(2):416-23.
- Kosalec I, Pepeljnjak S, Kustrac D. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., *Apiaceae*). *Acta Pharm*. 2005;55:377-85.
- Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2008;25(3):298-301.
- Badiee P, Nasirzadeh AR, Motaffaf M. Comparison of *Salvia officinalis* L. essential oil and antifungal agents against *Candida* species. *J Pharmaceutical Technol Drug Res*. 2012, disponible en internet, <http://www.hoajonline.com/journals/pdf/2050-120X-1-7.pdf>
- Oliva M de L, Carezzano ME, Gallucci MN, Demo MS. Antimycotic effect of the essential oil of *Aloysia triphylla* against *Candida* species obtained from human pathologies. *Nat Prod Commun*. 2011;6(7):1039-43.
- Ramage G, Milligan S, Lappin DF, Sherry L, Sweeney P, Williams C, et al. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Frontiers in Microbiology. Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy*. 2012;3:1-8.
- Ninomiya K, Maruyama N, Inoue S, Ishibashi H, Takizawa T, Oshima H, et al. The essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil) and its main component, terpinen-4-ol protect mice from experimental oral candidiasis. *Biol Pharm Bull*. 2012;35(6):861-5.
- Maruyama N, Takizawa T, Ishibashi H, Hisajima T, Inouye T, Yamaguchi H, et al. Protective activity of geranium oil and its component, geraniol, in combination with vaginal washing against vaginal candidiasis in mice. *Biol. Pharm Bull*. 2008;31(8):1501-6.
- Duarte MC, Figueira GM, Sartoratto A, Rehder VL, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2005;97(2):305-11.

34. Al-Bakri AG, Othman G, Bustanji Y. The assessment of the antibacterial and antifungal activities of aspirin, EDTA and aspirin-EDTA combination and their effectiveness as antibiofilm agents. *J Applied Microbiol.* 2009;107:280-6.
35. Miura T, Tanabe K, Yoshinari M. Ca (II)-EDTA shows antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *J. Biomedical Science and Engineering.* 2012;5:10-4.
36. Sokovic M, Glamoclija J, Ciric A, Kataranovski D, Marin PD, Vukojevic J, et al. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. and thymol on experimentally induced dermatomycoses. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 2008;34:1388-93.
37. Chami F, Chami N, Bennis S, Trouillas J, Remmal A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *J Antimicrobial Chemother* 2004;54:909-14.
38. Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppaiyl SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomed.* 2011;18:1181-90.

Artículo recibido para publicación el 13 de febrero de 2015 y aceptado para publicación el 14 de marzo de 2015.

Estudio realizado como Investigación 2013 Con Asignación a la Investigación y Con Incentivo al Investigador (CON/CON), del Vicerrectorado de Investigación, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Código 130103151.

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés para la publicación de este artículo.

Correspondencia:

Dr. Juan Rojas Armas

Correo electrónico: jprojasarmas@yahoo.com