

## Actividad anti-*Trichophyton rubrum* del aceite esencial de *Clinopodium brevicalyx* y elaboración de una emulsión tópica

### Anti-*Trichophyton rubrum* activity of the essential oil of *Clinopodium brevicalyx* and elaboration of a topical emulsion

Cinthy Merma Ccana <sup>1</sup>, Ciro Tomaylla Cruz <sup>2</sup>, Carla del Carpio Jiménez <sup>3,\*</sup>

<sup>1</sup> Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú.

<sup>2</sup> Escuela Profesional de Química, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú.

<sup>3</sup> Laboratorio de Tecnología Farmacéutica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Perú.

\*Autor para correspondencia: [delcarpiojc\\_daqf@unsaac.edu.pe](mailto:delcarpiojc_daqf@unsaac.edu.pe)

Carla del Carpio Jiménez  <https://orcid.org/0000-0001-7487-354X>

#### REPORTE DE CASO

##### INFORMACIÓN DE ARTÍCULO

Artículo recibido: 13/11/2019  
Artículo aceptado: 30/03/2020  
En línea: 30/05/2020

#### PALABRAS CLAVE:

Composición química, cromatografía de gases-espectrometría de masas, difusión en agar, macrodilución en caldo.

#### CASE REPORT

##### ARTICLE INFORMATION

Article received: 13/11/2020  
Article accepted: 30/03/2020  
On line: 30/05/2020

#### KEYWORDS:

Chemical composition, Gas chromatography-mass spectrometry, agar diffusion, broth macrodilution.

#### RESUMEN

*Clinopodium brevicalyx* crece en regiones altoandinas sureñas del Perú y tiene amplio uso popular, sin embargo, hasta la fecha no se tienen investigaciones sobre su actividad frente a *Trichophyton rubrum*, hongo dermatofito antropofílico con afinidad por la queratina humana y de difícil tratamiento, causante de las micosis superficiales más frecuentes como el pie de atleta, tiña e infecciones en las uñas. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad del aceite esencial de *Clinopodium brevicalyx* sobre *Trichophyton rubrum* ATCC 28188. El aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación, el porcentaje de rendimiento fue de  $1,98 \pm 0,02\%$  (p/v), sus características fisicoquímicas fueron: densidad relativa de  $0,93654 \text{ g/mL}$ , un índice de refracción de  $1,4625$ , una rotación óptica de  $2,14^\circ$ , un pH de  $6,20$ . La composición química del aceite esencial se determinó usando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, identificando como componentes principales: isomentona ( $44,24\%$ ), mentona ( $22,22\%$ ) y pulegona ( $8,23\%$ ). La sensibilidad de *T. rubrum* se evaluó por el método de difusión en disco, estableciendo que a mayor concentración de aceite existe mayor sensibilidad del hongo, la concentración mínima inhibitoria del aceite se determinó por el método de macrodilución en caldo, obteniendo una concentración mínima inhibitoria (CMI) de  $125 \mu\text{L/mL}$ . La emulsión tópica con diferentes porcentajes de aceite esencial presentó actividad antimicótica a partir del  $12,5\%$  usando el método de macrodilución. Concluyendo, que tanto el aceite esencial y la emulsión al  $12,5\%$  tienen actividad antifúngica contra *Trichophyton rubrum*.

#### ABSTRACT

*Clinopodium brevicalyx* grows in the southern high Andean regions of Peru and has wide popular use, however to date there is no research on its activity against *Trichophyton rubrum*, an anthropophilic dermatophyte fungus with an affinity for human keratin and difficult to treat, causing the most common superficial mycoses such as athlete's foot, ringworm and nail infections. The aim of this research was to determine the activity of the essential oil of *Clinopodium brevicalyx* against *Trichophyton rubrum* ATCC 28188. The essential oil was obtained by hydrodistillation, the extraction rate was  $1.98 \pm 0.02\%$  (w/v), and the physicochemical characteristics were: relative density of  $0.93654 \text{ g/mL}$ , a refractive index of  $1.4625$ , an optical rotation of  $2.14^\circ$ , and pH of  $6.20$ . The chemical composition of the essential oil was determined using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer, identifying as main components: isomentone ( $44.24\%$ ), menthone ( $22.22\%$ ) and pulegone ( $8.23\%$ ). The sensitivity of *T. rubrum* was evaluated by the disk diffusion method, establishing that at higher oil concentration more sensitivity of the fungus, the minimum inhibitory concentration of the oil was determined by the broth macro-dilution, obtaining a minimum inhibitory concentration (MIC) of  $125 \mu\text{L/mL}$ . The topical emulsion with different percentages of essential oil, showed antifungal activity since  $12.5\%$  using the macrodilution method. Concluding that both the essential oil and the emulsion at  $12.5\%$  have antifungal activity against *Trichophyton rubrum*.

## INTRODUCCIÓN

Las propiedades medicinales de las plantas han sido investigadas en los últimos años en todo el mundo, debido a su potente eficacia farmacológica sus pocos efectos secundarios y bajo costo. Las especies vegetales tienen componentes que las protegen contra infecciones microbianas o infestaciones por plagas. Estos fitoquímicos son ingredientes activos que poseen actividades terapéuticas (Shakya, 2016).

Los aceites esenciales de plantas medicinales se han utilizado tradicionalmente y de forma segura contra bacterias patógenas que causan enfermedades infecciosas en el hombre (Mohammadi et al., 2014). Las investigaciones con especies del género *Clinopodium* han determinado su actividad antibacteriana (Mohammadi et al., 2014) y antifúngica (Gilardoni et al., 2011).

El género *Clinopodium* L. (antes *Satureja* L.) pertenece a la subtribu *Menthinae* y se caracteriza por la presencia de ácido rosmarínico, ácidos triterpénicos como el ácido oleanólico, ácido ursólico (Serrano et al., 2016) y también aceite esencial (Viturro et al., 2000).

Las infecciones por dermatofitos son producidas por hongos que invaden tejidos queratinizados en humanos, siendo la infección cutánea de mayor prevalencia en el Perú (Béjar et al., 2014) y el mundo (Pires et al., 2014; Sahoo & Mahajan, 2016; Hay, 2018). Las especies que afectan a los humanos pertenecen a los géneros *Microsporum* y *Trichophyton* (Pires et al., 2014; Sahoo & Mahajan, 2016). Estos hongos utilizan la queratina como su principal sustrato, y por esta razón la enfermedad afecta principalmente a los tejidos queratinizados. Las enfermedades causadas por dermatofitos incluyen pie de atleta, tiña, tiña inguinal e infecciones de uñas (onicomicosis), causadas especialmente por *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes* (Kaur et al., 2008).

*Trichophyton rubrum* es uno de los principales agentes etiológicos de las dermatofitosis, cuyo tratamiento se

basa en fármacos antifúngicos, principalmente en derivados imidazólicos y alilaminas. Sin embargo, estas drogas sintéticas son bastante caras, presentan efectos adversos y tienen una acción lenta. Su uso también puede aumentar las posibilidades de recurrencia y de seleccionar cepas resistentes, en caso de que los medicamentos no se administren correctamente (Diogo et al., 2010), y tienen un alto costo (Biasi-Garbin et al., 2016), para enfrentar esta problemática, actualmente se buscan explorar nuevas alternativas terapéuticas, especialmente con plantas, de hecho, la actividad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales de especies vegetales nativas, incluyendo su acción contra dermatofitos, ha sido reportada en todo el mundo (Soares et al., 2014). Es fundamental destacar que exhiben una gran diversidad química y actividad biológica, representando una alternativa fácilmente obtenible para tratar diversas enfermedades.

El objetivo de la presente investigación fue comprobar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Clinopodium brevicalyx* sobre cepas de *Trichophyton rubrum* y contribuir a la generación de medicamentos a base de principios activos naturales, ofreciendo una alternativa terapéutica al alcance de la población con menos recursos económicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolección del material vegetal

Un kilo hojas frescas de *C. brevicalyx* fueron recolectadas de los alrededores del complejo arqueológico de Sacsayhuamán, ubicado a 7,1 km de la ciudad del Cusco, a una altitud de 3690 m.s.n.m. Los ejemplares se recolectaron de laderas y zonas pedregosas, su identificación taxonómica fue realizada por el profesor Alfredo Tupayachi Herrera, adscrito al Herbario Vargas CUZ de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

### **Extracción del aceite esencial**

La extracción se realizó utilizando las hojas secas (1000 g) de la especie *Clinopodium brevicalyx*, en un equipo de hidrodestilación usando una trampa de Clevenger. El aceite obtenido fue secado con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se conservó en un frasco oscuro con cierre hermético en refrigeración a 4°C hasta su análisis.

### **Determinación de la composición química del aceite esencial por Cromatografía de gases – espectrometría de masas**

Se determinó la composición química del aceite esencial usando un cromatógrafo de gases modelo THERMO con una columna capilar HP-5MS (Polimetil xiloxano 19091S-133) de 30m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m. La temperatura inicial del horno fue de 60°C manteniéndose constante durante los primeros 3 minutos, aumentando la misma hasta alcanzar los 100°C a una velocidad de 10°C por minuto. Luego, se subió hasta 140°C a 5°C por minuto y finalmente alcanzó los 240°C a 20°C por minuto. El gas portador empleado fue Helio a un flujo constante de 1mL/min. El volumen de inyección fue de 1  $\mu$ L con una disolución Split de 100/1 y una corrida de 50 minutos. Los resultados fueron comparados con la información del estándar de referencia de la base de datos de las librerías NIST 11 y FLAVOR 2L.

### **Actividad anti - *Trichophyton rubrum* in vitro del aceite esencial de *C. brevicalyx***

Para establecer la actividad antimicótica del aceite esencial de *C. brevicalyx* frente a *T. rubrum*, se evaluó la sensibilidad de la cepa micótica a diferentes concentraciones y se determinó la concentración mínima inhibitoria usando el método de macrodilución, según se detalla en a) y b) a continuación:

#### **a) Evaluación de la sensibilidad de *T. rubrum* frente al aceite esencial de *C. brevicalyx***

Se usaron discos de papel filtro de 6 mm impregnados con concentraciones del 1-50% del aceite esencial disuelto en metanol, por cada concentración se emplearon 3 discos con un volumen de 10  $\mu$ L cada uno.

Una vez activo el inóculo de la cepa ATCC 28188, se ajustó a la escala 0,5 de Mc Farland en condiciones estériles, una suspensión de 100  $\mu$ L de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, se frota uniformemente en placas de agar Sabouraud usando un hisopo estéril. Luego, se colocaron los discos con las diferentes concentraciones del aceite esencial. Se incubaron en posición invertida a 30°C durante 48-72 horas. La actividad antimicótica fue evaluada por medición de los diámetros de los halos de inhibición en milímetros según el método descrito por (Nweze, et al., 2010).

#### **b) Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) usando el Método de macrodilución en caldo**

Se usó el protocolo M38-A2 de la CLSI y se procedió según indica Robledo-Leal et al., (2012) (Robledo-Leal, et al., 2012) las diluciones usadas del aceite esencial fueron: 15,63; 31,25; 62,5; 125; 250 y 500  $\mu$ L mL<sup>-1</sup>, el control positivo fue terbinafina 0,624  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Se preparó el inóculo de la cepa ATCC 28188 a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> ajustándola a la escala 0,5 de Mc Farland, se añade 1 mL del inóculo a cada tubo. Se incubó a 25°C durante 7 – 14 días. La CMI fue definida como la mínima concentración de antifúngico a la cual no se observa desarrollo del hongo, es decir no se advierte turbidez. (Scorzoni et al., 2007) Posteriormente, se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ L de los tubos en los cuales se observó inhibición y se sembraron en medio específico libre del agente antimicótico y se valoró a través del cero crecimiento de colonias en la placa.

## Desarrollo de la emulsión tópica elaborada con aceite esencial de *C. brevicalyx*

Para la formulación de las emulsiones tópicas se optó por agregar el aceite esencial a las concentraciones de 3,13; 6,25; 12,5; 25 y 50% en una base O/W.

## Actividad anti - *Trichophyton rubrum* in vitro de la emulsión tópica elaborada con aceite esencial de *C. brevicalyx*

La actividad inhibitoria de las emulsiones tópicas frente a *T. rubrum* fue determinada usando el método

de macrodilución en caldo (Pithayanukul, et al., 2007), usando como fármaco patrón una crema de terbinafina al 1 %.

## RESULTADOS

El porcentaje de extracción del aceite esencial de las hojas secas de *C. brevicalyx* por hidrodestilación, fue de  $1,98 \pm 0,02\%$  p/v. Sus propiedades organolépticas y fisicoquímicas se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1.**

*Propiedades organolépticas y fisicoquímicas del aceite esencial de C. brevicalyx*

Propiedades organolépticas	
Olor	Mentolado persistente
Color	Amarillo
Aspecto	Líquido translúcido
Propiedades fisicoquímicas	
Densidad relativa (25°)	0.93654 g mL <sup>-1</sup>
Índice de refracción a 20°C	1.4625
Rotación óptica	+2°14'
pH	6.20

Las propiedades organolépticas y fisicoquímicas mostradas en la Tabla 1, son compatibles con la

mayoría de los aceites esenciales de otras especies. (Bandoni, 2003).

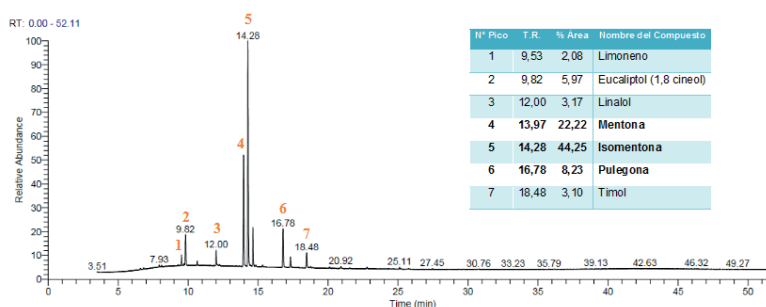


Figura 1. Cromatograma GC/MS del aceite esencial de *C. brevicalyx*

En la Figura 1, se muestran los componentes identificados en el aceite esencial de *C. brevicalyx* por cromatografía de gases-espectrometría de masas, entre ellos destacan: limoneno (2,08%), Eucaliptol (5,97%), Linalol (3,17%) y timol (3,10%) y los más abundantes son: Isomentona (44,25%), mentona (22,22%) y pulegona (8,23%).

Estos componentes mayoritarios serían los responsables de la actividad antimicótica frente a *Trichophyton rubrum*. Estudios han demostrado que los terpenos oxigenados, desempeñan un rol notable en la terapia antifúngica de los aceites esenciales (Soković et al., 2012).

**Tabla 2.**

Actividad anti-*Trichophyton rubrum* de *C. brevicalyx* – método de discos de sensibilidad

Concentración del aceite esencial	N	Halos de inhibición*
50 %	3	26,14 ± 0,76
25 %	3	19,47 ± 0,92
15 %	3	14,72 ± 2,56
10 %	3	9,33 ± 2,06
5 %	3	6,00 ± 0,01
3 %	3	6,00 ± 0,02
2 %	3	6,00 ± 0,01
1 %	3	6,00 ± 0,03

\*Halos de inhibición en mm, diámetro de cada disco 6 mm.

N: Número de repeticiones

Se reportaron las diferentes concentraciones y los halos de inhibición frente a *T. rubrum*, a la concentración de 15 % se presentó un halo promedio de 14,72 ± 2,56 mm, y un halo de 26,14 ± 0,76 mm a 50% (Tabla 2), lo que muestra que a mayor concentración existe mayor halo de inhibición. Otras especies relacionadas como *Satureja cuneifolia* demostraron también actividad antimicótica (Khoury et al., 2016).

**Tabla 3.**

Actividad anti-*Trichophyton rubrum* del aceite esencial de *C. brevicalyx* – método de macrodilución

Concentración del aceite esencial (μL mL <sup>-1</sup> )	N	Observación*	Resultado
15,63	3	-	
31,25	3	-	Turbidez
62,5	3	-	
125**	3	S/C	
250	3	S/C	Sin
500	3	S/C	Turbidez
Terbinafina 0,624 μg mL <sup>-1</sup>	3	S/C	

Nota: \*S/C: Sin crecimiento

En la Tabla 3, se muestran los resultados del método de macrodilución determinados por inspección visual de la inhibición del crecimiento del hongo en comparación con el tubo control según el grado de turbidez. Para corroborar los resultados se sembraron en placas Petri con agar Sabouraud dextrosa, las soluciones que no mostraron turbidez, no hubo crecimiento microbiano (s/c).

La CMI del aceite esencial según observación directa fue de 125 μL/mL. El control positivo terbinafina a la concentración de 0,624 μg/mL tampoco presentó crecimiento.

**Tabla 4.**

Fórmula de la emulsión base O/W

Componente	Porcentaje (%)
Ácido esteárico	15
Glicerina	8
Hidróxido de sodio	0,7
Agua estilada	76,3

Para la elaboración de la formulación tópica se usaron los componentes de una emulsión O/W (Tabla 4), la cual demostró excelentes características organolépticas y fisicoquímicas, aspecto homogéneo, un olor característico al aceite esencial, de color blanco, con sensación refrescante al tacto, muy buena consistencia y textura.

A esta base se incorporó el aceite esencial de *C. brevicalyx* en diferentes porcentajes, hallándose los resultados de la actividad antimicótica frente a *T. rubrum*, presentados en la Tabla 5.

**Tabla 5.**

Actividad anti-*Trichophyton rubrum* de la emulsión O/W con aceite esencial de *C. brevicalyx*

Concentración del aceite esencial en la emulsión tópica	N	Observación*	Resultado
Blanco	3	-	
3,13 %	3	-	TURBIDEZ
6,25 %	3	-	
12,5 %	3	S/C	
25 %	3	S/C	
50 %	3	S/C	SIN TURBIDEZ
Crema de terbinafina al 1 %	3	S/C	

Nota: \*S/C: Sin crecimiento

N: Número de repeticiones

En la Tabla 5, se puede apreciar que la emulsión O/W a partir de 12,5% no presenta turbidez, lo que es comparable con la crema de terbinafina al 1 %. Para corroborar los resultados se sembraron las emulsiones que no presentaron turbidez (12,5%, 25%, 50% y fármaco patrón) en placas con agar Sabouraud dextrosa, los hallazgos evidenciados mostraron que

no hubo crecimiento de *T. rubrum*, este resultado fue observado también en el trabajo desarrollado por Guerra et al., 2004. (Guerra Ordoñez, et al., 2004).

Por lo tanto, se puede afirmar que la emulsión O/W elaborada con el aceite esencial de *C. brevicalyx* posee actividad anti- *Trichophyton rubrum*, siendo los posibles mecanismos de acción: la destrucción de la pared del hongo o la inhibición de la síntesis de ADN, RNA, proteínas y polisacáridos de las células micóticas o la reducción considerable del ergosterol.

## DISCUSIÓN

Las dermatofitosis y las micosis superficiales son un significativo problema de salud pública que afecta al 20-25% de la población mundial. (Asticcioli et al., 2008) El aumento de la resistencia fúngica a los fármacos disponibles en el mercado, junto con su limitado espectro de acción, imponen la necesidad de desarrollar nuevos agentes antifúngicos. Los productos naturales son atractivos prototipos debido a su amplio espectro de actividades biológicas. (Soares et al., 2014).

Los aceites esenciales son compuestos naturales que pueden ser utilizados como tratamiento alternativo natural para el manejo de dermatofitosis (Kurita et al., 1981), en un estudio previo desarrollado por (Mahboubi & Valian, 2019) confirmaron que el aceite esencial de *P. graveolens*, cuyos componentes mayoritarios fueron el geraniol y citronelol, presentan actividad anti dermatofítica, por interferencia con la membrana celular de los dermatofitos, disminuyendo el contenido de ergosterol de la célula por inhibición de su biosíntesis (De Oliveira Pereira et al., 2015).

En nuestro estudio, se determinó que el aceite esencial de *C. brevicalyx* presenta como componentes mayoritarios a isomentona (44,24 %), mentona (22,22 %) y pulegona (8,23%), estos también se encontraron en otras investigaciones relacionadas. (Gilardoni et al., 2011;(Khoury et al., 2016; Božović

et al., 2017). Este aceite presentó acción frente a *T. rubrum*, obteniendo una CMI de 125  $\mu\text{L mL}^{-1}$ , lo que coincide con lo encontrado por Jordá (2018) (Jordá Marín, 2018) quien evaluó la actividad antifúngica de *Mentha longifolia* estableciendo que ésta se debería al elevado contenido en cetonas monoterpénicas, concretamente mentona, isomentona y pulegona. En otra investigación, el aceite esencial de *Z. clinopodioides* con alto porcentaje de pulegona (44,5%) mostró mediante la técnica de inhibición del micelio que las concentraciones de 120 y 250 ppm inhibieron el crecimiento de los micelios en alrededor del 53,5% y el 88,4% respectivamente para *Trichoderma reesei* (Mahboubi et al., 2018).

La emulsión tópica elaborada con el aceite esencial de *C. brevicalyx* presentó actividad frente a *T. rubrum* a partir de una concentración de 12,5%. Tadele et al. (2009), demostró eficacia antimicótica de emulsiones tópicas elaboradas con el aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a *T. mentagrophytes*. Para darle un valor agregado y un mayor grado de innovación, se ha planteado la utilización de los aceites esenciales en la preparación de emulsiones con el propósito de mejorar su aplicación sobre la piel. (García Delgado, et al., 2004).

Nuestros resultados, están de acuerdo con otros hallazgos de eficacia antifúngica demostrada para muchos géneros y especies pertenecientes a la familia Lamiaceae (Khoury et al., 2016). Las propiedades antibacterianas y antifúngicas de plantas del género *Clinopodium* fueron investigadas y la mayoría demostró tener fitoquímicos con actividad antimicrobiana (Gilardoni et al., 2011; Khoury et al., 2016).

Casi sesenta especies del género *Clinopodium* crecen en el trópico de América, y sólo se ha estudiado las actividades biológicas de algunos de ellos (Khoury et al., 2016), por ello consideramos relevantes los hallazgos presentados en el presente documento.

## CONCLUSIÓN

El porcentaje de aceite esencial extraído de las hojas de *C. brevicalyx* fue de  $1,98 \pm 0,02\%$ . La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas permitió identificar como componentes mayoritarios a isomentona, mentona y pulegona en concentraciones de 44,25; 22,22 y 8,23% respectivamente. Se obtuvo una CMI de 125  $\mu\text{L}/\text{mL}$  para el aceite esencial y la emulsión elaborada mostró actividad contra *T. rubrum* a partir de una concentración de 12,5%.

## Agradecimientos

Agradecemos el apoyo brindado por los docentes del área de tecnología farmacéutica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, tanto en la parte metodológica como en el uso de los equipos, instrumentos y reactivos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asticcioli, S., Di Silverio, A., Sacco, L., Fusi, I., Vincenti, L., & Romero, E. (2008). Dermatophyte infections in patients attending a tertiary care hospital in northern Italy. *New Microbiologica*, 31(4), 543–548. Recuperado de <https://europepmc.org/article/med/19123311>
- Bandoni, A. (2003). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Recuperado de <https://bit.ly/2B41G7R>
- Béjar, V., Villanueva, F., Guevara, J. M., González, S., Vergaray, G., Abanto, E., ... Vergaray, S. (2014). Epidemiología de las dermatomicosis en 30 años de estudio en el Instituto de Medicina Tropical Daniel A Carrión, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. *Anales de La Facultad de Medicina*, 75(2). <https://doi.org/10.15381/anales.v75i2.8380>
- Biasi-Garbin, R. P., Demitto, F. de O., do Amaral, R. C. R., Ferreira, M. R. A., Soares, L. A. L., Svidzinski, T. I. E., ... Yamada-Ogatta, S. F. (2016). Antifungal potential of plant species from Brazilian caatinga against dermatophytes. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 58(1), 18–22. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658018>
- Božović, M., Ragno, R., & Tzakou, O. (2017). Calamintha nepeta (L.) Savi and its main essential oil constituent pulegone: Biological activities and chemistry. *Molecules*, 22(2). <https://doi.org/10.3390/molecules22020290>
- De Oliveira Pereira, F., Mendes, J. M., Lima, I. O., De Lira Mota, K. S., De Oliveira, W. A., & De Oliveira Lima, E. (2015). Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharmaceutical Biology*, 53(2), 228–234. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.913299>
- Diogo, H. C., Melhem, M., Sarpieri, A., & Pires, M. C. (2010). Avaliação do método de disco-difusão para determinação da eficácia da terbinafina in vitro em agentes de micoses superficiais e subcutâneas. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85(3), 324–330. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000300005>
- García Delgado, R., Escario Travesedo, E., & Sánchez Romero, A. (2004). Uso racional de la medicación tópica en dermatología. *Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana*, 32(1), 39–44. Recuperado de <https://bit.ly/30Fkp4w>
- Gilardoni, G., Malagon, O., Morocho, V., Negri, R., Tosi, S., Guglielminetti, M., ... Finzi, P. V. (2011). Phytochemical researches and antimicrobial activity of *Clinopodium nubigenum* Kunth (Kuntze) raw extracts. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 21(5), 850–855. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000139>
- Guerra Ordoñez, M., Rodríguez Jorge, M., García Simón, G., & Llerena Rangel, C. (2004). Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). *Stapf. Rev. Cuba. Plantas Med*, 9(2), 3–8. Recuperado de <https://bit.ly/2MZVWP7>

- Hay, R. (2018). Therapy of skin, hair and nail fungal infections. *Journal of Fungi*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/jof4030099>
- Jordá Marín, S. (2018). *Composición química y actividad antifúngica de los aceites esenciales satureja montana y menta longifolia*. Recuperado de <https://riunet.upv.es:443/handle/10251/107144>
- Kaur, R., Kashyap, B., & Bhalla, P. (2008). Onychomycosis-Epidemiology, Diagnosis and Management. 26, 108–116. Recuperado de <https://europepmc.org/article/med/18445944>
- Khoury, M., Stien, D., Eparvier, V., Ouaini, N., & El Beyrouthy, M. (2016). Report on the Medicinal Use of Eleven Lamiaceae Species in Lebanon and Rationalization of Their Antimicrobial Potential by Examination of the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Their Essential Oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2547169>
- Kurita, N., Miyaji, M., Kurane, R., & Takahara, Y. (1981). Antifungal Activity of Components of Essential Oils. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(4), 945–952. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.45.945>
- Mahboubi, M., Tabar, R. H., & Mahdizadeh, E. (2018). Chemical composition and antifungal activities of *Ziziphora tenuir* and *Z. clinopodioides* essential oils against dermatophytes. *Herba Polonica*, 64(2), 37–45. <https://doi.org/10.2478/hepo-2018-0011>
- Mahboubi, M., & Valian, M. (2019). Antidermatophyte activity of *Pelargonium graveolens* essential oils against dermatophytes. *Clinical Phytoscience*, 5(1), 0–4. <https://doi.org/10.1186/s40816-019-0121-3>
- Mohammadi, A., Amrollahi, H., Malek, F., & Nazari, H. (2014). In vitro antibacterial activity and phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(3), 186–194. <https://doi.org/10.5897/jmpr12.1298>
- Nweze, E. I., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2010). Agar-based disk diffusion assay for susceptibility testing of dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), 3750–3752. <https://doi.org/10.1128/JCM.01357-10>
- Pires, C. A. A., da Cruz, N. F. S., Lobato, A. M., de Sousa, P. O., Carneiro, F. R. O., & Mendes, A. M. D. (2014). Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(2), 259–264. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142569>
- Pithayanukul, P., Tubprasert, J., & Wuthi-Udomlert, M. (2007). In vitro antimicrobial activity of Zingiber cassumunar (Plai) oil and a 5% Plai oil gel. *Phytotherapy Research*. <https://doi.org/10.1002/ptr.2048>
- Robledo-Leal, E., Elizondo-Zertuche, M., & González, G. M. (2012). Susceptibility of Dermatophytes to Thiabendazole Using CLSI Broth Macrodilution. *ISRN Dermatology*, 2012, 1–3. <https://doi.org/10.5402/2012/351842>
- Sahoo, A., & Mahajan, R. (2016). Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. *Indian Dermatology Online Journal*, 7(2), 77. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27057486/>
- Scorzoni, L., Benaducci, T., Almeida, A. M. F., Silva, D. H. S., Bolzani, V. D. S., & Gianinni, M. J. S. M. (2007). The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(3), 391–397. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000300001>
- Serrano, C., Curie, B. C., Tupa, A. L., Huaman, R. I., Ludeña, M., & Rodriguez, E. (2016). Quantification of oleanolic acid, ursolic acid and rosmarinic acid in three Peruvian species of *Clinopodium* (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae). *Arnaldoa*, 23(1), 333–350. Recuperado de <http://journal.upao.edu.pe/Arnaldoa/article/viewFile/249/218>



- Shakya, A. K. (2016). Medicinal plants: Future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine*, 4(4), 59–64. Recuperado de <http://www.florajournal.com/archives/2016/vol4issue4/PartA/4-2-13-120.pdf>
- Soares, L. A., Gullo, F. P., Sardi, J. D. C. O., Pitangui, N. D. S., Costa-Orlandi, C. B., Sangalli-Leite, F., ... Fusco-Almeida, A. M. (2014). Anti- Trichophyton activity of protocatechuates and their synergism with fluconazole. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/957860>
- Soković, M., Glamočlija, J., Ćirić, A., Kataranovski, D., Marin, P. D., Vukojević, J., & Brkić, D. (2012). Antifungal activity of the essential oils and components in vitro and in vivo on experimentally induced dermatomycoses at rats. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(3), 959–966. Recuperado de [http://www.chalcogen.ro/959\\_Sokovic.pdf](http://www.chalcogen.ro/959_Sokovic.pdf)
- Tadele, A., Urga, K., Gemedá, N., Lemma, H., Melaku, D., & Mudie, K. (2009). Antimicrobial Activity of Topical Formulations Containing Thymus vulgaris Essential Oil on Major Pathogens Causing Skin Diseases. *Ethiopian Pharmaceutical Journal*, 26(2), 103–110. <https://doi.org/10.4314/epj.v26i2.43041>
- Vituro, C. I., Molina, A., Guy, I., Charles, B., Guinaudeau, H., & Fournet, A. (2000). Essential oils of Satureja boliviana and S. parvifolia growing in the region of Jujuy. Argentina. *Flavour and Fragrance Journal*, 15(6), 377–382. <https://bit.ly/2zBWVIK>