

Actividad antimicótica, citotoxicidad y composición de aceites esenciales de plantas de la familia Labiatae

Antifungal activity, cytotoxicity and composition of essential oils from Labiatae family plants

Bibiana Zapata¹, Camilo Durán², Elena Stashenko²,
Liliana Betancur-Galvis¹, Ana Cecilia Mesa-Arango¹

RESUMEN

Introducción: *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. son causa importante de infecciones a nivel mundial. Considerando la resistencia de estos patógenos a algunos de los antimicóticos disponibles, es necesaria la búsqueda de nuevos agentes antimicóticos. Diferentes aceites esenciales y extractos de plantas han mostrado actividad antimicótica *in vitro*. **El objetivo** de este estudio fue evaluar la actividad antimicótica, citotóxica y la composición química de aceites esenciales de la familia Labiatae. **Materiales y métodos:** Se evaluó la actividad antimicótica de 22 aceites de plantas de la familia Labiatae contra *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *A. flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 204305, siguiendo las técnicas estándar EUCAST y CLSI M38-A para levaduras y hongos filamentosos, respectivamente. Adicionalmente la actividad citotóxica se evaluó en la línea celular Vero mediante la técnica colorimétrica del MTT. La caracterización de los aceites esenciales se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a masas. **Resultados:** El aceite esencial más activo fue el de *Minthostachys mollis* frente a todas las cepas evaluadas con rangos concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) entre 250 y 375 µg/mL. El aceite de la planta *Hyptis mutabilis* mostró actividad frente a *A. fumigatus* (CMI = 396,8 µg/mL). Estos aceites esenciales no fueron citotóxicos sobre las células Vero. Los componentes principales de los aceites de las plantas *M. mollis* y *H. mutabilis* fueron epóxido de cis-piperitona y 1,8-cineol, respectivamente. **Conclusiones:** Los aceites esenciales de las plantas *M. mollis* y *H. mutabilis* mostraron actividad antimicótica y no fueron citotóxicos en células Vero. *Salud UIS 2009; 41: 223-230*

Palabras clave: Labiatae, citotoxicidad, actividad antimicótica, *Aspergillus* spp, *Candida* spp

ABSTRACT

Introduction: *Aspergillus* spp. and *Candida* spp. are important cause of infections worldwide. Considering the resistance of these pathogens to some antifungal agents, there is greater need to search for new antifungal agents. Many extracts and essential oils isolated from plants have shown to exert antifungal effects *in vitro*.

1. Grupo de Investigación Dermatológica, GRID Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín

2. Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL. Universidad Industrial de Santander.

Correspondencia: Ana Cecilia Mesa Arango. Bact, MSc. Grupo de Investigación Dermatológica, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín. Carrera 51D # 62-29 Laboratorio 283, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Teléfono: + 574 219 60 59 Fax: + 574 219 60 51.

E-mail: amesa@medicina.udea.edu.co

Recibido: 10 de octubre de 2009 - **Aceptado:** 20 de diciembre de 2009

The aim of this study was to evaluate the antifungal, cytotoxic effect, and chemical composition of essential oils of family Labiatae. **Materials and methods:** Antifungal activity of twenty two essential oils from Labiatae family was evaluated against *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *A. flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 204305, following EUCAST and M38-A standard protocols for yeast and filamentous fungi, respectively. Additionally, cytotoxic activity was evaluated on Vero cell line by colorimetric assay MTT. Essential oils was characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Results:** The most active oil with all strains was obtained of *Minthostachys mollis* (MIC range 250 - 375 µg/mL). The essential oil from *Hyptis mutabilis* showed activity against *A. fumigatus* (GM-MIC = 396.8 µg/mL). These essential oils were not cytotoxic on Vero cells. The major components of essential oils from *M. mollis* and *H. mutabilis* were cis-piperitone epoxide and 1,8-cineol, respectively. **Conclusions:** Essential oils of *H. mutabilis* and *M. mollis* showed antifungal activity and they were not cytotoxic on Vero cells. *Salud UIS* 2009; 41: 223-230

Keywords: Labiatae, cytotoxicity, antifungal activity, *Aspergillus* spp, *Candida* spp

INTRODUCCIÓN

Especies de *Candida* y *Aspergillus* han sido implicadas en una gran variedad de infecciones que comprende desde formas superficiales a invasivas¹⁻³. Las últimas, son causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes con trasplante de órganos, malignidades hematológicas y enfermedades inmunosupresoras, entre otros¹. Adicionalmente, especies de ambos géneros, tienen la capacidad de formar biopelículas en catéteres⁴⁻⁶. Además, *Aspergillus* es uno de los contaminantes de ambientes hospitalarios, por lo que constituye un riesgo para pacientes hospitalizados⁷.

El tratamiento de las infecciones micóticas es limitado tanto por la toxicidad de Anfotericina B⁸, la resistencia de algunas especies de *Aspergillus* y *Candida* a antimicóticos como Anfotericina B, Itraconazol, Fluconazol y Voriconazol⁹⁻¹⁰, como por el alto costo de los tratamientos³. Lo anterior ha estimulado la búsqueda de nuevas moléculas con potencial antifúngico en productos obtenidos de diferentes plantas¹¹.

En Colombia se han identificado aproximadamente 23 géneros y cerca de 205 especies de plantas de la familia Labiatae¹². La infusión de las hojas de las plantas de esta familia como *Hyptis capitata* y *Salvia officinalis* se usan en la medicina tradicional colombiana, como antisépticas, anti-inflamatorias, antiespasmódicas y analgésicos¹³.

Diferentes estudios han mostrado actividad antimicótica *in vitro* de aceites esenciales de plantas de la familia Labiatae como *Melissa officinalis*, *Hyptis ovalifolia*, *Mentha piperita* y *Ocimum basilicum* contra aislados clínicos de *C. albicans*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* y *Microsporum canis*¹⁴⁻¹⁷. Sin embargo, la actividad sobre especies de hongos ambientales de

importancia médica como *Aspergillus fumigatus* y *A. flavus* y otras especies de *Candida* no *albicans*, no se conoce. Considerando lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad de aceites esenciales derivados de plantas de la familia Labiatae recolectadas en diferentes regiones de Colombia, contra cepas de *Candida* y *Aspergillus* así como la actividad citotóxica en células Vero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y obtención de aceites esenciales

Para la obtención de los aceites, se recolectaron 22 plantas de la familia Labiatae en cuatro departamentos de Colombia (Santander, Choco, Pasto y el Tolima). La identificación taxonómica del material vegetal se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (Bogotá), por el Doctor José Luis Fernández. Los pliegos testigo de cada planta se encuentran depositados como muestras permanentes en el Herbario Nacional de Colombia. Los aceites esenciales se extrajeron por medio de la técnica de hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWH), descrita previamente¹⁸. Para los ensayos, se prepararon soluciones concentradas a 20 mg/mL en dimetil sulfóxido (DMSO). La caracterización de los aceites esenciales que mostraron actividad antimicótica, se llevó a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)¹⁸.

Actividad antimicótica

La actividad antimicótica se evaluó de acuerdo a la técnica de susceptibilidad antimicótica propuesta por el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST)¹⁹ para las levaduras y por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M38-A²⁰

para hongos filamentosos. Se incluyeron las cepas *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258, *A. flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 204305. Los aceites esenciales se evaluaron a concentraciones en el rango de 31,25 - 500 µg/mL. Los fármacos Itraconazol y Anfotericina B (Sigma-Adrich, Co, MO, USA) se emplearon como controles de las técnicas en el rango de concentración de 0,031 - 16 µg/mL. Además se incluyó un control de crecimiento en cada experimento. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) con las levaduras se determinaron por espectrofotometría y correspondieron a las mínimas concentraciones donde se observó inhibición del 50% del crecimiento o más respecto al control (100%). Las CMI de los hongos filamentosos se determinaron por lectura visual y correspondieron a la mínima concentración de cada aceite que inhibió el 100% del crecimiento.

Actividad citotóxica

La citotoxicidad se evaluó en células de riñón de mono verde africano (Vero ATCC CCL-81) mediante la técnica fotocolorimétrica del MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromuro) con algunas modificaciones²¹. Las células se mantuvieron en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con suero bovino fetal (10%), aminoácidos no esenciales (1%), L-glutamina 1%, vitaminas 1%, Penicilina 100 U/mL, Estreptomicina 100 µg/mL, Neomicina 100 µg/mL, Hepes 1M y bicarbonato al 7%.

Las células se cultivaron a una densidad de 1.4×10^5 /mL en placas de 96 pozos y se incubaron durante 24h a 37°C con 5% de CO₂ en atmosfera húmeda. Posteriormente, se agregaron 100 µL de los aceites a concentraciones finales en un rango de 25 - 200 µg/mL. Las placas se incubaron por un periodo adicional de 48h a 37°C y finalmente se realizó lectura espectrofotométrica a 570 nm para la determinación de la concentración que inhibió el crecimiento o mató el 50% de las células (CC₅₀).

Análisis de datos

Los ensayos de la actividad antimicótica, se realizaron por duplicado en tres momentos diferentes para cada hongo. Los valores de las CMI se expresaron como medias geométricas (MG-CMI). Los ensayos de citotoxicidad se realizaron por cuadruplicado y las CC₅₀ se expresaron como CC₅₀ ± desviación estándar (CC₅₀ ± DS). Las CC₅₀ se obtuvieron mediante análisis

de regresión lineal simple con el paquete estadístico R (Development Core Team, Vienna, Austria, 2008). Se aceptaron las regresiones con un coeficiente de correlación múltiple al cuadrado (R²) mayor de 0,7 y se realizó un análisis de residuales para determinar si el efecto de los aceites era dosis dependiente.

RESULTADOS

En este estudio se evaluó la actividad antimicótica y citotóxica de 24 aceites esenciales provenientes de diferentes géneros de la familia Labiatae. En la Tabla 1 se presentan los nombres científicos y números de voucher de las 22 plantas de donde se obtuvieron los aceites, así como las MG-CMI y los valores de CC₅₀ de los aceites

A la fecha no existe un consenso sobre los criterios para definir actividad antimicótica de productos naturales. Holetz y col (2002)²² sugirieron clasificar la actividad antimicótica de productos naturales con base en el valor de la CMI de la siguiente manera: (CMI ≤100 µg/mL) buena, (CMI 100-500 µg/mL) moderada y CMI (500-1000 µg/mL) débil. Con base en lo anterior, el aceite de la planta *M. mollis* mostró actividad moderada contra *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *A. flavus* ATCC 204304 y *A. fumigatus* ATCC 204305 con valores de CMI de 250, 375, 314,9 y 314,9 µg/mL, respectivamente. Asimismo, el aceite de la planta *H. mutabilis* 01 fue moderadamente activo con *A. fumigatus* (CMI = 396,8 µg/mL). Los aceites de las plantas *L. betonicifolia* y *L. bullata* fueron moderadamente activos (CMI = 500 µg/mL) con *C. krusei* ATCC 6258 y *A. fumigatus* ATCC 204305 (Tabla 1). Finalmente, la actividad antimicótica de los demás aceites fue débil.

Las MG-CMI de los fármacos Itraconazol y Anfotericina B con *C. krusei* (CMI = 0,125 µg/mL y 0,630 µg/mL), *C. parapsilosis* (CMI = 0,099 µg/mL y 0,630 µg/mL), *A. flavus* (CMI = 0,198 µg/mL y 1,260 µg/mL) y *A. fumigatus* (CMI = 0,157 µg/mL y 1,260 µg/mL), respectivamente, se encontraron dentro de los rangos establecidos por las técnicas de referencia.

Según el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, un extracto es citotóxico si la CC₅₀ < 30 µg/mL²³. De acuerdo a este criterio, 20 de los aceites esenciales evaluados no fueron citotóxicos sobre células Vero (rangos de CC₅₀ entre 31,2 y 200 µg/mL). Los demás aceites: *O. campechianum* 02, *M. mollis* 02 y *H. mutabilis* 02, fueron citotóxicos (Tabla 1).

Tabla 1. Medias geométricas de las concentraciones mínimas inhibitorias ($\mu\text{g/mL}$) y Concentraciones Citotóxicas 50 ($\mu\text{g/mL}$) de aceites de plantas de la familia Labiatae.

Planta	Voucher	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>A. flavus</i> ATCC 204304	<i>A. fumigatus</i> ATCC 204305	Línea celular Vero ATCC CCL-81	
						MG-CMI ^a	CC ₅₀ ^b \pm DS ^c
<i>H. sidifolia</i>	516927	>500	>500	>500	>500	31,2 \pm 2,6	0,94
<i>H. suaveolens 01</i>	520283	>500	>500	>500	>500	50,4 \pm 10,5	0,82
<i>H. suaveolens 02</i>	516304	>500	>500	>500	>500	63,4 \pm 13	0,8
<i>H. mutabilis 01</i>	512275	>500	>500	>500	396,8	55,2 \pm 12,1	0,78
<i>H. mutabilis 02</i>	517361	>500	>500	>500	>500	29,4 \pm 1	0,99
<i>Lepechinia betonicifolia</i>	24575	>500	500	>500	>500	33,5 \pm 3,9	0,89
<i>Lepechinia conferta</i>	521068	>500	>500	>500	>500	64,3 \pm 14,7	0,74
<i>Lepechinia salviifolia 01</i>	521027	>500	>500	>500	>500	57,9 \pm 13,4	0,75
<i>Lepechinia salviifolia 02</i>	521061	>500	>500	>500	>500	\geq 200	----
<i>Lepechinia salviifolia 03</i>	521070	>500	>500	>500	>500	67,9 \pm 14,7	0,77
<i>Lepechinia vulcanicola</i>	521090	>500	>500	>500	>500	72,9 \pm 14,6	0,8
<i>Lepechinia bullata 01</i>	517763	>500	>500	>500	>500	70 \pm 15,8	0,75
<i>Lepechinia bullata 02</i>	517187	>500	>500	>500	500	42,5 \pm 2,3	0,98
<i>M. mollis 01</i>	521089	>500	>500	>500	>500	\geq 200	----
<i>M. mollis 02</i>	516286	375	250	314,9	314,9	\leq 25	----
<i>M. tormentosa</i>	520282	>500	>500	>500	>500	\geq 200	----
<i>S. sagittata</i>	23353	>500	>500	>500	>500	57,9 \pm 12,3	0,79
<i>Satureja sp.</i>	22733	>500	>500	>500	>500	97,6 \pm 3,8	0,99
<i>O. campechianum 01</i>	520281	>500	>500	>500	>500	\geq 200	----
<i>Ocimum sp.</i>	512280	>500	>500	>500	>500	\geq 200	----
<i>Ocimum sp.</i>	512283	>500	>500	>500	>500	\geq 200	----
<i>O. campechianum 02</i>	520286	>500	>500	>500	>500	26,8 \pm 5,2	0,74
Itraconazol	----	0,099	0,125	0,198	0,157	----	----
Anfotericina B	----	0,630	0,630	1,260	1,260	----	----

^a Media geométrica de la concentración mínima inhibitorias. ^b Concentración que inhibe el crecimiento o mata el 50% de las células. ^c desviación estándar. ^d coeficiente de correlación múltiple al cuadrado.

En la Tabla 2 se muestra la composición los aceites esenciales en los que se encontró la mayor actividad. En el aceite de la planta *M. mollis* se identificaron 33 componentes y los mayoritarios fueron epóxido de *cis*-

piperitona (29,9%) y óxido de piperitenona (25,6%). Los componente mayoritarios del aceite de la planta *H. mutabilis* correspondieron a 1,8-cineol (17,4%) y fenchona (17,1%), de 41 identificados

Tabla 2. Composición del aceite esencial (%) de *M. mollis*.

I _k	Identificación	Cantidad relativa (%) ^a
		<i>M. mollis</i>
930	α-Pineno	0,5
962	Benzaldehido	0,1
974	Sabineno	0,3
981	β-Pineno	0,6
989	β -Mirceno	0,1
1034	Limoneno	0,7
1036	β-Felandreno	0,1
1038	1,8-Cineol	0,1
1075	<i>cis</i> -Óxido de linalool	0,1
1089	Terpinoleno	0,1
1102	Linalol	1,2
1128	<i>trans-p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	0,2
1167	Mentona	7,4
1174	<i>iso</i> -Mentona	0,4
1177	<i>neo</i> - Mentol	0,1
1199	Salicilato de metilo	0,1
1203	α-Terpineol	0,4
1205	<i>cis</i> -Dihidrocarvona	0,1
1250	Pulegona	5,5
1278	Epóxido de <i>cis</i> -piperitona	29,9
1303	Timol	0,9
1352	Piperitenona	1,7
1385	Óxido de piperitenona	25,6
1399	β-Bourboneno	0,7
1401	β-Elemenno	0,4
1439	<i>trans</i> -β-Cariofileno	4,5
1446	β-Copaeno	0,2
1473	α-Humuleno	1,1
1499	Germacreno D	5,8
1513	Biciclogermacreno	2,6
1530	δ-Cadineno	0,1
1594	Germacren-4-ol	0,3
1601	Óxido de cariofileno	0,2

^a Las cantidades relativas (%) se calcularon con base en las áreas de los picos cromatográficos (GC/FID)

DISCUSIÓN

El uso medicinal de algunas de las plantas de la familia Labiatae es permitido por parte del Instituto Nacional de Medicamentos y Alimentos de Colombia (INVIMA), entre ellas *S. officinalis* como antifatulento¹³.

El aceite de la planta *M. mollis* 02 fue el más activo con *C. krusei* (CMI = 250 µg/mL). Es posible que la actividad antimicótica del aceite esté asociada a su componente mayoritario (epóxido de *cis*-piperitona). En la literatura revisada, no se encontraron reportes de actividad antimicótica de epóxido de *cis*-piperitona. Saleh y col (2006) demostraron que los componentes mayoritarios del aceite de *Artemisia herba*, carvona y piperitona, fueron los responsables de la actividad contra *Penicillium citrinum* y *Mucor rouxii*²⁴.

La importancia de encontrar compuestos activos contra *C. krusei* radica en que esta levadura es intrínsecamente resistente a Fluconazol y con baja sensibilidad a otros azoles y a Anfotericina B²⁵.

Diferentes estudios *in vitro* han mostrado la actividad antimicótica de aceites esenciales de plantas de la familia Labiatae empleadas en la medicina tradicional¹⁴⁻¹⁷. La infusión de las hojas de la planta *M. piperita* (Labiatae) se empleada en la medicina tradicional colombiana como antiséptico, antiespasmódico y para el tratamiento del reumatismo¹³. Iscan y col (2002)¹⁴, encontraron actividad en el aceite de la planta *M. piperita* contra *C. albicans* (rango CMI = 312 y 2500 µg/mL) con una técnica de difusión en agar. En general, las CMI de los aceites evaluados en este estudio fueron inferiores a los valores encontrados por Iscan y col (2002)¹⁴.

Otra planta de la familia Labiatae utilizada en la medicina tradicional colombiana como antidiarréico¹³ es *H. capitata*. La actividad antimicótica de plantas de otra especie de este género, *H. ovalifolia*, se ha demostrado con hongos de importancia médica como *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*¹⁵. Nuestro aporte en este estudio fue demostrar la actividad del aceite de *H. mutabilis* contra el hongo ambiental *A. fumigatus*, importante por su capacidad para causar infección en el hombre, principalmente en ambientes hospitalarios donde puede ocasionar infecciones nosocomiales⁷.

En la medicina tradicional de Perú, la planta *M. mollis* se emplea para el tratamiento de infecciones del tracto digestivo y como sedante²⁶; sin embargo, la actividad antimicótica y la citotoxicidad de los aceites esenciales de esta planta aun no se ha evaluado. El

aceite de esta planta fue activo contra las cuatro cepas evaluadas, y adicionalmente su citotoxicidad fue baja sobre células Vero.

En este estudio no se encontró actividad en los aceites de las plantas del género *Ocimum*, sin embargo en un trabajo previo¹⁷, se encontró actividad del aceite de *O. basilicum* contra otros hongos de importancia médica como *C. albicans*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. rubrum*, *M. canis* y *Epidermophyton floccosum*.

La diferencia en la actividad antimicótica entre los diferentes estudios con aceites de plantas de los mismos géneros y/o especies podrían estar asociados a las técnicas usadas en cada estudio para evaluar la susceptibilidad antimicótica, a la diferencias estructurales que existen entre los diferentes géneros y especies de hongos evaluados²⁷ y/o a la composición de los aceites esenciales.

Fenchona es una cetona en la que se ha demostrado actividad antimicótica contra *Rhizoctonia solani*. Nosotros encontramos esta molécula como componente mayoritario del aceite esencial de la planta *H. mutabilis*. Con base en lo anterior, es posible pensar que la actividad del aceite de *H. mutabilis* contra *A. fumigatus* esté dada por fenchona.

Este es el primer estudio en Colombia en el que se demuestra la actividad del aceite esencial de la planta *H. mutabilis* contra *A. fumigatus* y del aceite *M. mollis* no solo contra este hongo sino contra *A. flavus*, *C. krusei* y *C. parapsilosis*. Los resultados obtenidos son importantes si se tiene presente que las especies de *Candida* y *Aspergillus* tienen capacidad de formar biopelículas en catéteres, convirtiéndose en una amenaza para una infección nosocomial⁴⁻⁵.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de este artículo se derivan del proyecto RC 432-2004 financiado por el Instituto colombiano para el desarrollo de la ciencia y la tecnología-COLCIENCIAS, Bogotá, Colombia.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores no tienen conflictos de intereses que declarar.

Ana Cecilia Mesa Arango certifica que:
El manuscrito representa un trabajo válido, y que ni este manuscrito, ni otro con un contenido sustancial similar, ha sido publicado bajo mi autoría o está siendo

considerado para su publicación en otro lugar. No tiene intereses financieros en relación con este manuscrito. Todo el apoyo material y de financiación para este trabajo está claramente expresado en el manuscrito.

REFERENCIAS

1. Warnock DW. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2007; 48: 1-12.
2. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 2008; 51(Suppl. 4): 2-15.
3. Kaur R, Kashyap B, Bhalla P. Onychomycosis--epidemiology, diagnosis and management. *Indian J Med Microbiol* 2008; 26(2): 108-116.
4. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 2006; 6(7):979-86.
5. Quindós G, Villar-Vidal M, Eraso E. Activity of micafungin against Candida biofilms. *Rev Iberoam Micol* 2009; 26(1): 49-55.
6. Seidler MJ, Salvenmoser S, Müller FM. *Aspergillus fumigatus* forms biofilms with reduced antifungal drug susceptibility on bronchial epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 4130-4136.
7. Haiduven D. Nosocomial aspergillosis and building construction. *Med Mycol* 2008; 25: 1-7.
8. De Sarro A, La Camera E, Fera MT. New and investigational triazole agents for the treatment of invasive fungal infections. *J Chemother* 2008; 20: 661-671.
9. Chamilos G, Kontoyiannis DP. Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigates*. *Drug Resistance Updates* 2005; 8: 344-350.
10. Johnson E, Espinel-Ingroff A, Szekely A, Hockey H, Troke P. Activity of voriconazole, Itraconazole, Fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 511-514.
11. De Lucca AJ, Cleveland TE, Wedge DE. Plant-derived antifungal proteins and peptides. *Can J Microbiol* 2005; 51(12):1001-1014.
12. Perez G, Vega N. Lectin prospecting in colombian labiatae. A systematic-ecological approach - II. *Caldasia* 2006; 28(2):179-195.
13. Fonnegra R, Jimenez S. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2006. 2da edición, editorial Universidad de Antioquia.
14. Iscan GK, Kirimer N, Kurkcuglu M, Can-Baser KH, Demirci F. Antimicrobial Screening of *Mentha piperita* Essential Oils. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3943-3946.
15. Souza LKH, De Oliveira CMA, Ferri PH, De Oliveira-Júnior JG, De Souza-Júnior AH, Lisboa-Fernandes OF, Silva MDR. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98(7): 963-965.
16. Mimica-Dukic N, Bozin B, Sokovic M, Simin N. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) Essential Oil. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 2485-2489.
17. Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N, Anackov G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem* 2006; 54(5): 1822-1828.
18. Stashenko EE, Jaramillo BE, Martinez JR. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J Chromatogr A* 2004; 1025: 93-103.
19. Cuenca-Estrella M, Moore CB, Barchiesi F, Bille J, Chryssanthou E, Denning DW, Donnelly JP, Dromer F, Dupont B, Rex JH, Richardson MD, Sancak B, Verweij PE, Rodríguez-Tudela JL. Multicenter evaluation of the reproducibility of the proposed antifungal susceptibility testing method for fermentative yeasts of the Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST). *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 467-474.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. Document M38-A. Wayne, USA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
21. Betancur-Galvis LA, Morales GE, Forero JE, Roldan J. Cytotoxic and antiviral activities of Colombian medicinal plant extracts of the Euphorbia genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 541-546.
22. Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(7): 1027-1031.
23. Hennebelle T, Sahpaz S, Joseph H, Bailleul F. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *J Ethnopharmacol* 2008; 116: 211-222.

24. Saleh MA, Belal MH, El-Baroty G. Fungicidal Activity of *Artemisia herba alba* Asso (Asteraceae). J Environ Sci Health B 2006; 41(3): 237-244.
25. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, Dobiasova S, Rinaldi M, Barton R, Veselov A. Global Antifungal Surveillance Group. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. J Clin Microbiol 2008; 46: 515-521.
26. De Feo V. Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes. Fitoterapia 1992; 63, 417-440.
27. Ruiz-Herrera J. Fungal cell wall. CRC Press, Boca Raton, 1992.
28. Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *lavandula stoechas* L. Ssp. *Stoechas* essential oils From stem/leaves and flowers. J. Agric. Food Chem 2006; 54, 4364-4370.