

# Actividad antimicótica del aceite esencial de *Plumbago scandens* *L. (Plumbaginaceae)*

## *Antifungal activity of the essential oil from Plumbago scandens L. (Plumbaginaceae)*

Luis Alberto Morocho-Yaguana<sup>1,\*</sup>, Anabel Marisol Carrión-Lluguín<sup>1</sup>, Grace del Pilar Cambizaca-Mora<sup>2</sup> y Humberto Daniel Riascos-Jaramillo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Carrera de Laboratorio Clínico, Universidad Nacional de Loja. Loja, Ecuador  
 luis.morochoy@unl.edu.ec, annycarrion@outlook.com, humberto.riascos@unl.edu.ec.

<sup>2</sup> Carrera de Enfermería, Universidad Técnica Particular de Loja. Loja, Ecuador  
 gdcambizaca@utpl.edu.ec

\* Autor para correspondencia: luis.morochoy@unl.edu.ec

Fecha de recepción del manuscrito: 28/04/2021

Fecha de aceptación del manuscrito: 12/07/2021

Fecha de publicación: 15/07/2021

**Resumen**—Los hongos son organismos eucariotas, heterótrofos, carentes de clorofila, causantes de infecciones en los seres humanos cuando ingresan por vía respiratoria, inoculación, pinchazos o contacto físico. La incidencia de las infecciones fúngicas oportunistas está en aumento, debido al incremento de la población inmunocomprometida, el turismo y la falla terapéutica. En el presente estudio se planteó evaluar la actividad antimicótica del aceite esencial de las partes aéreas de *Plumbago scandens* L. extraído por arrastre de vapor y purificado por cromatografía de columna contra cepas de hongos de la *American Type Culture Collection* (ATCC). La actividad antimicótica se evaluó mediante la técnica de Kirby Bauer modificada; para ello se prepararon tres diluciones en acetona, en concentraciones de 50, 25 y 12,5 µg/mL, con 10 µL de estas soluciones se impregnaron discos de papel Whatman N° 3, de 6 mm de diámetro, con un contenido de 0,5 µg, 0,25 µg y 0,125 µg/disco. Como controles positivo y negativo se usó nistatina y acetona respectivamente. La actividad antimicótica se evaluó midiendo el diámetro en mm de los halos de inhibición alrededor del disco de papel. El aceite esencial presentó actividad antimicótica contra *Candida albicans* (ATCC 26790), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 14116), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) y *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) en todas las concentraciones, excepto *Candida albicans* a la concentración de 0,125 µg/disco.

**Palabras clave**—Actividad antimicótica, Aceite esencial, *Plumbago scandens*, Método Kirby Bauer.

**Abstract**—Fungi are eukaryotic, heterotrophic, chlorophyll-free organisms that cause infections in humans when they enter by air, inoculation, punctures or physical contact. The incidence of opportunistic fungal infections is increasing due to the increase in the immunocompromised population, tourism, and therapeutic failure. The present study considered evaluating the antifungal activity of the essential oil of the aerial parts of *Plumbago scandens* L. extracted by steam entrainment and purified by column chromatography against fungal strains of the *American Type Culture Collection* (ATCC). The antifungal activity was evaluated by the modified Kirby Bauer technique. For this, three dilutions in acetone were prepared in concentrations of 50, 25 and 12.5 µg/mL. With 10 µL of these solutions, Whatman No. 3 paper discs of 6 mm diameter were impregnated, containing 0.5 µg, 0.25 µg and 0.125 µg/disc. As positive and negative controls, nystatin and acetone were used respectively. Antifungal activity was evaluated by measuring the diameter in mm of the inhibition halos around the paper disk. The essential oil showed antifungal activity against *Candida albicans* (ATCC 26790), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 14116), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) and *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) at all the concentrations; only *Candida albicans*, at a concentration of 0.125 µg/disc did not show sensitivity.

**Keywords**—Antifungal activity, Essential oil, *Plumbago scandens*, Kirby Bauer method.

## INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos eucariotes, heterótrofos, carentes de clorofila, que tienen nutrición absorptiva, caracterizados por la formación de hifas, estructuras filamentosas formadas por células intercomunicadas denominadas micelio (Ocara et al., 2019). Se presentan en todos los ambientes y superficies: se les puede encontrar en suelo,

agua, aire, sobre la superficie de objetos inanimados, en el ambiente cerrado de casa, hospitales, edificios e, incluso, colonizando animales y al propio ser humano, por lo que están íntimamente ligados a la historia y desarrollo del hombre, pues este los usa como fuente de alimentos y sustancias activas de medicamentos, y su capacidad enzimática es ampliamente usada en la industria y la silvicultura (Janbon et al., 2019).

Los hongos son los causantes de muchas enfermedades infecciosas, tanto en hombre como animales y plantas (Ocara et al., 2019). En la biosfera desempeñan una función importante al permitir el desdoblamiento de la materia orgánica, contribuyendo de esta manera a completar el ciclo de la materia y energía (Guarro, 2012).

Los hongos producen infecciones superficiales y mucocutáneas leves, con tendencia a la cronicidad en personas inmunocompetentes. Las especies oportunistas solo causan enfermedad a las personas inmunocomprometidas, por lo que existe un gran interés en aquellas enfermedades causadas por hongos y que afectan a este tipo de pacientes (Valderrama et al., 2018). Se estima que más de 300 millones de personas de todas las edades sufren de una infección fúngica grave cada año en todo el mundo, de las cuales, más de 1,66 millones mueren por dicha causa, número que supera a las causadas por malaria, SIDA y tuberculosis (Herrera Gancino, 2017).

Para el tratamiento de las micosis se cuenta con varios fármacos de usos tópico y sistémico, principalmente el grupo de los azoles, ciclopiroxolamina (piridonas), tiocarbamatos, benzofuranos, alilaminas y morolfinas (Conejo Fernández et al., 2016), pero estos pueden tener una actividad antifúngica limitada o pueden no ser seguros en la administración sistémica (Sepahvand. A , Ezatpour. B., F.Tarkhan , Mahmoud Bahmani Razi, 2017), a lo que se suma el surgimiento de cepas resistentes. Todo ello se ha traducido en un incremento en la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos de origen natural, enfocada en la variedad de metabolitos secundarios (Soo Khoo et al., 2018).

*Plumbago scandens* es ampliamente usada en la medicina tradicional en países de Asia, África y América. En América es frecuente encontrarla desde Estados Unidos hasta Bolivia (Farcio-villarreal et al., 2015; Karishma et al., 2018; Logarto Parra et al., 2001; Mengane Kemble, 2015; Muralidharan et al., 2018; Murov, 2010; Nair et al., 2016; Riveiro de Paiva et al., 2003; Singh et al., 2017) y sus propiedades terapéuticas son referidas en varias publicaciones (Abdallah, 2016; Apenteng et al., 2016; Hassan et al., 2016; Karishma et al., 2018; Kaur et al., 2016; Roy Bharadvaja, 2017a, 2017b; Singh et al., 2017). En Ecuador *P. scandens* se considera una planta nativa, tanto en la región costa como sierra, hasta los 1500 metros en las provincias de Bolívar, El Oro, Esmeraldas, Guayas, Zamora (hierba de la culebra), Loja y Manabí donde es conocida como Churupa (Jorguensen Leon Yáñez, 1999; Valverde Badillo, 1998).

Se considera que la actividad antimicrobiana, antimicótica y anticancerígena de *P. scandens* se debe a la presencia de la plumbagina, una naftoquinona presente en toda la planta, especialmente en las raíces (Ahamed Khan et al., 2014; Chaudhari Chaudhari, 2015; Chauhan et al., 2012; Farcio-villarreal et al., 2015; Malar Tharmaraj Marimuthu Antonysamy, 2016; Muralidharan et al., 2018; Roy Bharadvaja, 2017b; Sobhani et al., 2018). El análisis fitoquímico de esta planta revela la presencia de alcaloides, glucósidos, azúcares reductores, fenoles simples, taninos, lignina, sapo-

nina, terpenoides, esteroides y flavonoides, mas no revela la presencia de aceites esenciales (AE) (Banik et al., 2014; Dhale Markandeya, 2011; Najafpour Navaei et al., 2005; Subhash et al., 2013).

Estudios sobre las propiedades antimicrobianas de extractos de *P. scandens*, desarrollados en el Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Nacional de Loja, revelaron que el extracto hexánico es activo contra varias especies de bacterias (Morocho-Yaguana et al., 2019), pero esta actividad decrece con el tiempo, presumiéndose que se debe a metabolitos secundarios como los AE o a la degradación de esos metabolitos. Este antecedente, sumado a la presencia de AE en otras especies del género *Plumbago* (Najafpour Navaei et al., 2005), sirvió de base para considerar los AE de esta especie.

El presente estudio planteó evaluar la actividad antimicótica, por el método de Kirby Bauer, del AE de *P. scandens* purificado por cromatografía de columna, utilizando como referentes especies de hongos ATCC.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Obtención del aceite esencial de P. scandens*

*P. scandens* se colectó en la ciudad de Palanda, Provincia de Zamora Chinchipe (sur de Ecuador), en octubre de 2017, y una muestra fue identificada por el Ing. Bolívar Merino, taxónomo del Herbario Reinaldo Espinosa de la Universidad Nacional de Loja y codificado con el vóucher EC14-069.

Una muestra de 8,7 kg de planta fresca fue lavada con solución de hipoclorito de sodio al 0,5%, enjuagada con agua corriente, escurrida, secada a la sombra y refrigerada en un recipiente de polietileno. La planta entera fue troceada y sometida a destilación por arrastre de vapor, recogiendo los destilados de color amarillento en un balón en baño de hielo. Los destilados fueron lavados con n-hexano por tres ocasiones y estos fueron concentrados en un evaporador rotatorio Yamato RE-200 a 30 °C.

El producto, cristales de color amarillo, fue almacenado en un balón de vidrio, protegido de la luz y en refrigeración. Una muestra de los cristales fue rediluida en n-hexano y se desarrolló una cromatografía en capa fina (TLC) con silica-gel 60 F254 (Merck®) usando como eluyente una mezcla hexano:acetato de etilo 80:20 y en la cual se evidenció la presencia de varias franjas visibles con luz ultravioleta de 254 nm.

El aislamiento de la fracción bioactiva se realizó por cromatografía de columna, guiada por autografiografía (Choma, 2005; Lockhart, 1954), usando silica-gel 60 (0,063-0,200 mm, Merck®) y como eluyente una mezcla de hexano:diétil éter 5:0,4. Se obtuvieron 22 fracciones, a las cuales se les desarrolló una TLC usando el mismo eluyente, las fracciones bioactivas 5-9, de color amarillo y con idéntico perfil por TLC, fueron unidas y concentradas en evaporador rotatorio a 30 °C y recristalizadas con acetona. Se obtuvo 830 mg de cristales, en forma de aguja, de color amarillo ocre y olor

bastante penetrante, los cuales fueron conservados en refrigeración

### Elaboración de discos de sensibilidad

Con el AE purificado se prepararon soluciones de 50, 25 y 12,5 µg/mL en acetona. Con 10 µL de las soluciones se impregnaron discos de papel Whatman N° 3 de 6 mm de diámetro obteniéndose discos con una concentración final de 0,5, 0,25 y 0,125 µg/disco. Los discos preparados fueron esterilizados con luz ultravioleta de 254 nm y 55W por 30 minutos.

Como control positivo se usaron discos de nistatina de 100 UI (Unidades Internacionales) y para el control negativo se esterilizaron en autoclave discos de papel Whatman N° 3, de 6 mm de diámetro y se impregnaron con 10 µL de acetona esterilizada por filtración con filtros de jeringuilla de 0,22 µm (Millex GV ®).

### Cepas de hongos utilizadas

Se usaron cepas de *Candida albicans* (ATCC 26790), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 14116), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) y *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188) viabilizadas según las recomendaciones del fabricante y conservadas por pases sucesivos en medio *Agar Dextrosa Sabourad* e incubadas a 28 °C (incubadora MRC, BOD-80 ®).

### Preparación del inóculo

El inóculo se preparó por suspensión de las cepas jóvenes en solución salina, equivalente al tubo 0,5 de la escala de MacFarland (aproximadamente 108 UFC/mL). Con las cepas filamentosas, el inóculo se preparó tocando las conidias de la superficie del cultivo de 7 días de edad con un asa microbiológica y se suspendieron en 4 mL de solución salina estéril. El contenido se agitó por 30 segundos en un vórtex y se dejó sedimentar durante 4 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo y se diluyó, ajustando la densidad de la suspensión de conidias a 0,5 de la escala MacFarland.

### Medios de cultivo

Los ensayos se desarrollaron en medio de cultivo Muller Hinton, enriquecido con 20 g de glucosa y 100 µl de la solución de azul de metileno (5 mg/mL) por litro de medio y distribuido en cajas Petri de 90 mm de diámetro a razón de 20 mL/caja.

### Evaluación de actividad antimicótica

La evaluación de la actividad antimicótica se desarrolló según la metodología de Kirby Bauer, con discos de sensibilidad en papel filtro (Bauer et al., 1966; Biemer, 1973; Boyle et al., 1973; Hudzicki, 2009; Stratton, 1984) y las recomendaciones del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (Lacasa Mazuelos, 2007). Para ello se sumergió un hisopo en la suspensión de conidias, se eliminó el exceso por rotación y el contenido se inoculó por estría en cajas de agar Muller Hinton enriquecido.

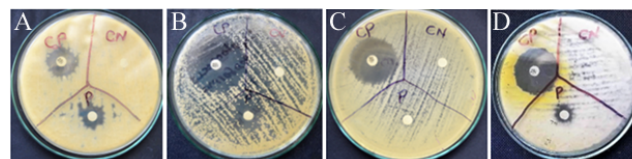
Pasados 15 minutos, en cada caja se colocó un disco de

prueba (P), un control negativo (CN) y un control positivo (CP), se dejaron reposar por 15 minutos, se invirtieron y se incubaron a 35 °C ± 2 por 48 horas (MRC, BOD-80 ®); de cada dilución se realizaron ensayos por triplicado. Se consideró como halo de inhibición las zonas alrededor del disco de sensibilidad que no presentaban crecimiento visible; los halos se midieron en mm a las 48 horas de incubación.

## RESULTADOS

La evaluación de la actividad antimicótica se desarrolló según la metodología de Kirby Bauer, con discos de sensibilidad en papel filtro (Bauer et al., 1966; Biemer, 1973; Boyle et al., 1973; Hudzicki, 2009; Stratton, 1984) y las recomendaciones del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (Lacasa Mazuelos, 2007). Para ello se sumergió un hisopo en la suspensión de conidias, se eliminó el exceso por rotación y el contenido se inoculó por estría en cajas de agar Muller Hinton enriquecido.

Pasados 15 minutos, en cada caja se colocó un disco de prueba (P), un control negativo (CN) y un control positivo (CP), se dejaron reposar por 15 minutos, se invirtieron y se incubaron a 35 °C ± 2 por 48 horas (MRC, BOD-80 ®); de cada dilución se realizaron ensayos por triplicado. Se consideró como halo de inhibición las zonas alrededor del disco de sensibilidad que no presentaban crecimiento visible; los halos se midieron en mm a las 48 horas de incubación.



**Fig. 1:** Halos de inhibición con discos de 0,125 µg/disco en *Trichophyton rubrum* (A), *Cryptococcus neoformans* (B), *Candida albicans* (C) y *Aspergillus brasiliensis* (D). CP= control positivo; CN= control negativo; P= prueba.

En la tabla 1 se exponen los promedios de los halos de inhibición, evidenciándose que, a 0,125 µg/disco, *T. rubrum* presentó la mayor sensibilidad al tiempo que *C. albicans* no la presentó. Se resalta el hecho de que, a la mayor concentración 0,5 µg/disco, *T. rubrum*, igualmente, presenta mayor sensibilidad, y *C. albicans* la menor.

## DISCUSIÓN

El ensayo de sensibilidad de Kirby-Bauer, aplicado en la presente investigación, es una prueba muy usada en la evaluación de la actividad antimicrobiana y cuyos procedimientos fueron validados por una prueba piloto usando especies ATCC referenciadas de los microorganismos (Hudzicki, 2009).

La literatura especializada reporta varios estudios en los que se pone de manifiesto el amplio y arraigado uso de *P. scandens* con una amplia gama de propiedades, como abortivas, antituberculosas, laxantes y expectorantes, así como para tratar cólicos estomacales, flatulencias, dolor de muelas, gangrena, escabiosis y leishmaniasis (Abera et al.,

**Tabla 1:** Promedios y desviación estándar (paréntesis) de los diámetros de halos de inhibición de las concentraciones del AE de *P. scandens* (mm.). CP= control positivo; CN= control negativo; P= prueba; -, sin halo de inhibición.

Microorganismo	0,50 µg/disco			0,25 µg/disco			0,125 µg/disco		
	CP	CN	P	CP	CN	P	CP	CN	P
<i>C. albicans</i>	29 (1,73)	-	13 (1,00)	28 (0,58)	-	12 (1,15)	30 (1,15)	-	-
<i>A. brasiliensis</i>	27 (0,58)	-	29 (0,58)	27 (1,54)	-	20 (0,58)	27 (1,15)	-	10 (1,00)
<i>T. rubrum</i>	21 (0,58)	-	36 (0,58)	19 (1,73)	-	32 (-)	20 (0,58)	-	28 (0,58)
<i>C. neoformans</i>	27 (1,53)	-	34 (1,53)	27 (3,60)	-	28 (3,60)	22 (3,46)	-	21 (-)

2008; Adegbite *et al.*, 2014; Apenteng *et al.*, 2016; Chaudhari Chaudhari, 2015; Ganesan Gani, 2013; Karishma *et al.*, 2018; Pant *et al.*, 2012; Ribeiro *et al.*, 2014; Riveiro de Paiva *et al.*, 2003; Roy Bharadvaja, 2017b, 2017a; A. Sharma Singh, 2015; N. Sharma Kaushik, 2014; Valverde Badillo, 1998).

Muchos de los trabajos publicados mencionan, especialmente, las propiedades antibacterianas (Karthika, 2015; Malar Tharmaraj Marimuthu Antonysamy, 2016; Morocho-Yaguana *et al.*, 2019; Nair *et al.*, 2016; Shweta Dubey, 2015; Singh *et al.*, 2017) y antifúngicas de extractos con variadas metodologías y, mayoritariamente, se refieren a *C. albicans* (Hassan *et al.*, 2016; Mehmood *et al.*, 1999; Mengane Kemble, 2015; Rathanel *et al.*, 2014; Sepahvand. A, Ezatpour. B., F.Tarkhan, Mahmoud Bahmani Razi, 2017; Soo Khoo *et al.*, 2018; Uniyal *et al.*, 2014).

Existen estudios sobre la actividad antimicótica de extractos de las partes aéreas de *P. scandens*, aplicando varias metodologías contra *Trichosporon asahhi*, *Trichosporon inkin*, *C. albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium gypseum* y *Trichophyton rubrum* (de Paiva *et al.*, 2003; Hassan *et al.*, 2016; Mehmood *et al.*, 1999; S. Sharma *et al.*, 2012; Shweta Dubey, 2015). El presente estudio demuestra que es factible obtener el AE de *P. scandens* por arrastre de vapor y el aislamiento, por cromatografía de columna y bio guiada por bioautografía, de una fracción bioactiva; también aporta nueva información a la ya existente sobre las actividad antimicrobianas de extractos de *P. scandens* (Banik *et al.*, 2014; Hassan *et al.*, 2016; Nair *et al.*, 2016; Shweta Dubey, 2015) con la actividad antimicótica de la fracción aislada del AE contra *C. albicans*, *T. rubrum*, *A. brasiliensis* y *C. neoformans* a concentraciones tan pequeñas como las ensayadas, quedando pendiente la identificación molecular del o los componentes de la fracción activa.

## CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

Conceptualización: LMY y ACLI; metodología: LMY y ACLI; análisis formal: LMY, HRJ y GCM.; investigación: LMY y ACLI; recursos: UNL y ACLI; curación de datos: LMY, ACLI y HRJ; redacción — preparación del borrador: LMY, ACLI y GRM; redacción — revisión y edición: LMY, GCM y HRJ; visualización: LMY; supervisión: LMY; administración de proyecto: LMY; adquisición de financiamiento para la investigación: LMY y ACLI. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

## FINANCIAMIENTO

Este proyecto fue financiado por la Universidad Nacional de Loja.

## REFERENCIAS

- Abdallah, E. M. (2016). Medicinal Plants with Antibacterial Properties Against *Helicobacter pylori*: A Brief Review. *Current Trends in Nutraceuticals*, 1(3), 1-5. <http://www.imedpub.com/>
- Abera, B., Negash, L., Kumlehn, J. (2008). Reproductive biology in the medicinal plant, *Plumbago zeylanica* L. *African Journal of Biotechnology*, 7(19), 3447-3454. <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/59352>
- Adegbite, A. A., Adebanjo, A. A., Yusuf-Babatunde, O. A., Sowole, R. A. (2014). Antimicrobial activity of *Plumbago zeylanica* plant extracts and its application in water and laboratory disinfection. *American Academic and Scholarly Research Journal*, 6(6), 55-64.
- Ahamed Khan, S., Ravi, M., Lal, G. (2014). A review on *Plumbago zeylanica*: Pharmacological properties. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*, 3(6), 79-92.
- Apenteng, J. A., Brookman-Amisshah, M. G., Osei-asare, C., Oppong, E. E., Ogundeyi, M. (2016). In Vitro Anti-infective and Antioxidant Activity of *Plumbago zeylanica* Linn. *International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology*, 3(8), 49-52. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20546/ijcrbp.2016.308.020>
- Banik, B., Sarkar, P., Sultana, F., Saikia, M., Dey, A. (2014). In-vitro antimicrobial screening with phytochemical study of *Plumbago zeylanica* L. collected from two regions of Eastern Himalayas- A comparative study. *International Journal of Phytopharmacy*, 4(5), 5120-5123. <https://doi.org/10.7439/ijpp>
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, 493. <https://doi.org/10.1128/AAC.1.6.451> Updated
- Biemer, J. J. (1973). Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 3(2), 135-140.

<http://www.annclinlabsci.org/content/3/2/135.short>

Boyle, V. J., Fancher, M. E., Ross, R. W. (1973). Rapid, modified Kirby-Bauer susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 3(3), 418-424. <https://doi.org/10.1128/AAC.3.3.418>

Chaudhari, S. S., Chaudhari, G. S. (2015). A review on *Plumbago zeylanica* Linn. -A divine Medicinal Plant. *International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research*, 30(2), 119-127. <http://globalresearchonline.net/journalcontents/v30-2/20.pdf>

Chauhan, R., Ruby, K., Shori, A., Dwivedi, J. (2012). *Plumbago zeylanica* a potent herb for various ailments: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and research*, 15(15), 72-78. <http://globalresearchonline.net/journalcontents/v15-1/15.pdf>

Choma, I. (2005). The Use of Thin-Layer Chromatography with Direct Bioautography for Antimicrobial Analysis. *Advanstar Communications Inc.* <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/Features/The-Use-of-Thin-Layer-Chromatography-with-Direct-B/ArticleStandard/Article/detail/177453>

Conejo Fernández, A., Martínez Roig, A., Ramírez Balza, O., Álvarez González, F., Hernández Hernández, A., Baquero Artigao, F., Alfayate Miguélez, S., Piñeiro Pérez, R., José Cilleruelo Ortega, M., Moraga Llop, F. A., de Lucas González, R., Calvo Rey, C., España, M. (2016). Documento de consenso Documento de consenso SEIP-AEPap-SEPEAP sobre la etiología, el diagnóstico y el tratamiento de las infecciones cutáneas micóticas de manejo ambulatorio SEIP-AEPap-SEPEAP consensus document on the etiology, diagnosis, treatment and am. *Revista Pediatría Atención Primaria*, 18, 149-172. [www.pap.es](http://www.pap.es)

De Paiva, S. R., Figueiredo, M. R., Aragão, T. V., Kaplan, M. A. C., Ribeiro De Paiva, S., Figueiredo, M. R., Aragão, T. V., Auxiliadora, M., Kaplan, C. (2003). Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(7), 959-961. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000700017>

Dhale, D. A., Markandeya, S. K. (2011). Antimicrobial and Phytochemical Screening of *Plumbago zeylanica* Linn. (*Plumbaginaceae*) Leaf. *Journal of Experimental Sciences*, 2(3), 04-06. [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Exp\\_Sci\\_6028-16279-1-PB\[1\].pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Exp_Sci_6028-16279-1-PB[1].pdf)

Farcio-villarreal, M., Rojas-idrogo, C., Moncada-ascencio, N., Trevisan-Ferreira, D., Pereira Pinto, J., Delgado-paredes, G. E., Farcio-Villareal, M., Rojas-idrogo, C., Moncada-ascencio, N., Trevisan-Ferreira, D., Pereira-Pinto, J., Delgado-paredes, G. E., Farcio-villarreal, M., Rojas-idrogo, C., Moncada-ascencio, N., Trevisan-Ferreira, D., Pereira

Pinto, J., Delgado-paredes, G. E. (2015). In vitro tissue culture, chemical composition and biological activity of *Plumbago scandens* L. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 6(1), 199-209.

Ganesan, K., Gani, S. B. (2013). Ethnomedical and Pharmacological Potentials of *Plumbago zeylanica* L-A Review. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 3, 313-337. [www.ajpct.org](http://www.ajpct.org) Guarro, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(1), 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.006>

Hassan, S. T. S., Berchová-Bímová, K., Petráš, J. (2016). Plumbagin, a Plant-Derived Compound, Exhibits Antifungal Combinatory Effect with Amphotericin B against *Candida albicans* Clinical Isolates and Anti-hepatitis C Virus Activity. *Phytotherapy Research*, May, 1487-1492. <https://doi.org/10.1002/ptr.5650>

Herrera, H. J., Gancino, M. (2017). Infecciones micóticas: esas enfermedades relegadas de la salud pública. *Bionatura*. <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.03.2>

Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *En American Society For Microbiology*. American Society for Microbiology.

Janbon, G., Quintin, J., Lanternier, F., Christophe D'enfert, C. (2019). Studying fungal pathogens of humans and fungal infections: fungal diversity and diversity of approaches. *Genes and Immunity*, 20(5), 403-414. <https://doi.org/10.1038/s41435-019-0071-2>

Jorguensen, P. M., Leon Yáñez, S. (1999). Catálogo de las plantas vasculares de Ecuador (V. Hollowell (ed.); Primera). Missouri Botanical Garden.

Karishma, S., Yougasphree, N., Baijnath, H. (2018). a Comprehensive Review on the Genus *Plumbago* With Focus on *Plumbago* (*Plumbaginaceae*). *Afr. J. Tradit. Complement Altern Med.*, 15(1), 199-215. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v15i1.21>

Karthika, K. S. M. (2015). Antibacterial activity of plant extract *Plumbago zeylanica* against clinical bacteria. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 4(6), 1603-1607. [www.ijset.net](http://www.ijset.net)

Kaur, D., Prasad, S. B., Verma, S. (2016). Formulation and Evaluation Gel from Extract of *Plumbago indica* for Acne. *En Available online on www.ijddt.com International Journal of Drug Delivery Technology* (Vol. 6, Número 3). [www.ijddt.com](http://www.ijddt.com)

Lacasa, C. E., Mazuelos, M. E. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la

- sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A) 15a.1. Fundamento. CLSI. <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>
- Lockhart, W. R. (1954). A Rapid Micromethod for Bioautographic Assay'. Logarto Parra, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardinias, I., Iglesias
- Buela, L., Lagarto Parra, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardiñas, I. Iglesias Buela, L., LAGARTOPARRA, A. (2001). Comparative study of the assay of Artemia salina L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 8(5), 395-400. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00044>
- Malar Tharmaraj, R. J. J., Marimuthu Antonysamy, J. (2016). Screening of Bactericidal Activity of Selected Plumbago Species Against Bacterial Pathogens. *Journal of Microbiology Experimentation*, 2(6), 7. <https://doi.org/10.15406/jmen.2015.02.00070>
- Mehmood, Z., Ahmad, I., Mohammad, F., Ahmad, S. (1999). Indian Medicinal Plants: A Potential Source for Anticandidal Drugs. *Pharmaceutical Biology*, 37(3), 237-242. <https://doi.org/10.1076/phbi.37.3.237.6296>
- Mengane, S. K., Kemble, S. S. (2015). Phytochemical screening and antifungal activity of *Plumbago zeylanica* L. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 6(January), 40-42. [http://www.ijprd.com/PHYTOCHEMICAL\\_SCREENING\\_AND\\_ANTIFUNGAL\\_ACTIVITY\\_OF\\_PLUMBAGO\\_ZEYLANICA.pdf](http://www.ijprd.com/PHYTOCHEMICAL_SCREENING_AND_ANTIFUNGAL_ACTIVITY_OF_PLUMBAGO_ZEYLANICA.pdf)
- Morocho-Yaguana, L., Cambizaca-Mora, G., Salazar-Briceño, J. (2019). Actividad antimicrobiana de extractos de *Plumbago scandens* L. (Yerba de la culebra) Antimicrobial activity of extracts of *Plumbago scandens* L. *Bosques Latitud Cero*, 10(1), 46-56.
- Muralidharan, K., Jayanthi, M., Surendran, R., Balasubramanian, M., Girija, S. (2018). Effect of sample extraction, preparation methods on HPLC quantification of plumbagin in in vivo and in vitro plant parts of *Plumbago zeylanica* L. *African Journal of Biotechnology*, 17(33), 1021-1030. <https://doi.org/10.5897/AJB2018.16561>
- Murov, S. (2010). Miller's Home. Properties of Organic Solvents. <https://sites.google.com/site/miller00828/in/solvent-polarity-table>
- Nair, S. V., Baranwal, G., Chatterjee, M., Sachu, A., Vasudevan, A. K., Bose, C., Banerji, A., Biswas, R. (2016). Antimicrobial activity of plumbagin, a naturally occurring naphthoquinone from *Plumbago rosea*, against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *International Journal of Medical Microbiology*, 306(4), 237-248. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.004>
- Najafpour Navaei, M., Mirza, M., Dini, M. (2005). Chemical composition of the essential oil of *Plumbago europaea* L. roots from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(2), 213-214. <https://doi.org/10.1002/ffj.1384>
- Ocara, M., Vieille, P., Carvajal, L., Cruz, R. (2019). Los Hongos en la salud y la enfermedad. Parte I. *Boletín Micológico*, 33(2), 1-9.
- Pant, M., Lal, A., Rana, S., Rani, A. (2012). *Plumbago Zeylanica* L.: a Mini Review. *International Journal of Pharmaceutical Applications*, 3(3), 399-405. <http://www.bipublication.com/files/IJPA-V3I32012-4.pdf>
- Rathanavel, C., Sumitha, J., Thillai Arasu, P. (2014). Antimicrobial activity in selected indian medicinal plant extracts using disc diffusion method. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 5(1).
- Ribeiro, T. G., Chávez-Fumagalli, M. a., Valadares, D. G., Franca, J. R., Lage, P. S., Duarte, M. C., Andrade, P. H. R., Martins, V. T., Costa, L. E., Arruda, A. L. a, Faraco, A. a G., Coelho, E. a F., Castilho, R. O. (2014). Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Experimental Parasitology*, 143, 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.05.004>
- Riveiro de Paiva, S., Da Silva Marques, S., Figueiredo, M. R., Coelho Kaplan, M. A. (2003). *Plumbaginales*: A pharmacological approach. *Floresta e Ambiente*, 10(jan/jul), 98-105. <http://www.floram.org/files/v10n1/v10n1a11.pdf>
- Roy, A., Bharadvaja, N. (2017a). A Review on Multi-Purpose Medicinal Plant *Plumbago zeylanica* and In-vitro A Review on Multi-Purpose Medicinal Plant *Plumbago zeylanica* and In-vitro Production of Plumbagin. September.
- Roy, A., Bharadvaja, N. (2017b). A review on pharmaceutically important medical plant: *Plumbago zeylanica*. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 3(4), 225-228. [www.ayurvedjournal.com](http://www.ayurvedjournal.com) Sepahvand. A , Ezatpour. B., F.Tarkhan , Mahmoud Bahmani, A. K. and M. R.-K., Razi. (2017). Phytotherapy in fungi and fungal disease: A review of effective medicinal plants on important fungal strains and diseases. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 8(11), 4473-4495. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8\(11\).4473-95](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.8(11).4473-95)
- Sharma, A., Singh, N. (2015). A multifarious potent herb: *Plumbago zeylanica*-A mini review. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(6), 4825-4829. <http://www.recentscientific.com/sites/default/files/2736.pdf>
- Sharma, N., Kaushik, P. (2014). Medicinal, Biological and Pharmacological Aspects of *Plumbago zeylanica* (Linn

.). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 3(4), 117-120.

Sharma, S., Yadav, D. P., Singh, B., Chhipa, R. C. (2012). Antimicrobial activity of the Soxhlet extraction of *Plumbago zeylanica* leaf extracts in-vitro conditions. Research Journal of Pharmacy and Technology, 5(October), 1320-1322.

Shweta, S., Dubey, S. (2015). Antimicrobial Activity of Leaves Extract of *Plumbago Zeylanica* Plant against Known Drugsquot; International Journal of Research Studies in Biosciences, 3(6), 1-6. [www.arcjournals.org](http://www.arcjournals.org)

Singh, M. K., Pandey, A., Sawarkar, H., Gupta, A., Gidwani, B., Dhongade, H., Tripathi, D. K. (2017). Methanolic Extract of *Plumbago Zeylanica* - A Remarkable Antibacterial Agent Against Many Human and Agricultural Pathogens. Journal of pharmacopuncture, 20(1), 18-22. <https://doi.org/10.3831/KPI.2017.20.004>

Sobhani, M., Abbas-Mohammadi, M., Ebrahimi, S. N., Aliahmadi, A. (2018). Tracking leading anti-candida compounds in plant samples; *Plumbago europaea*. Iranian Journal of Microbiology, 10(3), 187-193.

Soo Khoo, K., Tunku Abdul Rahman, U., Pharm Sci, P. J., Sin Chan, Y., Hong Cheah, Y., Zen Chong, P., Lai Khor, H., Siang Teh, W., Chooi Ong, H., Weng Sit, N. (2018). Antifungal and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Malaysia Analysis of phyobiliprotein in Seaweeds View project extracts and compounds from medicinal plants View project Sit Nw Antifungal and cytotoxic activities of selected medicinal. Pakistan journal of pharmaceutical sciences, 31(1), 119-127. <https://www.researchgate.net/publication/322480858>

Stratton, C. W. (1984). Susceptibility testing revisited. Progress in clinical pathology, 9, 65-100.

Subhash, K., Wabale, A. S., Kharde, M. N. (2013). Phytochemical Screening and Antimicrobial Studies on *Plumbago*. Advances in BioResearch, 4(September), 115-117. <http://soeagra.com/abr/abrsept2013/22.pdf>

Uniyal, V., Bhatt, R. P., Saxena, S., Negi, R. (2014). Phytochemical screening and anti trichosporon activity of *Plumbago zeylanica* Lin. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6(9), 107-110.

Valderrama, S. O., Martínez, J. A. H., Torresb, A. H., Escudero, E. M., Gómez, J. G., Hernández, M. S. (2018). Micosis sistémicas en pacientes inmunocomprometidos. Medicine - Programa de Formación Médica Continuada, 12(57), 3357-3368.

<https://doi.org/10.1016/J.MED.2018.05.003>

Valverde Badillo, F. de M. (1998). Plantas útiles del litoral ecuatoriano (Primera). Ministerio del Ambiente de Ecuador, Editorial Jumandi.