



Efecto antifúngico del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* con el fluconazol sobre *Candida albicans*

Antifungal effect of the foliar ethanolic extract of *Azadirachta indica* with fluconazole on *Candida albicans*

Maricielo Loyola Gil^{1,a}, Ana María Chian García^{2,a},
Jaime Abelardo Polo Gamboa^{2,b}

¹ Universidad César Vallejo, Trujillo, Perú

² Facultad de Medicina Humana, Universidad César Vallejo, Trujillo, Perú.

^a Médico Cirujano

^b Microbiólogo

RESUMEN

Introducción: La resistencia antifúngica es un problema de salud pública en aumento por el uso indiscriminado de fármacos antifúngicos. **Objetivo:** Evaluar el efecto antifúngico del extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 100% con fluconazol 25 µg sobre *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*. **Metodología:** Se realizó un estudio cuasi experimental, preclínico y analítico. Se elaboró el extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100% y extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* combinada con fluconazol 25 µg. Se tuvo un grupo control con fluconazol 25 µg y otros con dimetil sulfóxido (DMSO). El efecto antifúngico se determinó a través de la medición del halo inhibitorio (HI) en base a los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Se realizaron 10 repeticiones en cada caso. Se usó la prueba de ANOVA y el análisis de *post hoc* de la mínima diferencia significativa, se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. **Resultados:** La media del HI del extracto etanólico de *Azadirachta indica* fue $13,8 \pm 1,5$ mm, en combinación con el fluconazol fue $25,9 \pm 1,2$ mm, y del fluconazol solo de $22,1 \pm 1,5$ mm. La comparación de las medias de los HI generados por el extracto etanólico de *Azadirachta indica*, fluconazol y la combinación de ambos tuvo un $p < 0,01$. En la prueba *post hoc* todos los grupos fueron diferentes entre sí. **Conclusión:** El extracto etanólico de *Azadirachta indica* combinado con el fluconazol ejerce efecto antifúngico sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, superior al efecto del fluconazol solo.

Palabras Clave: Antifúngicos, *Candida albicans*, *Azadirachta*, *fluconazol* (Fuente: DeCS BIREME).

ABSTRACT

Introduction: Antifungal resistance is a growing public health problem due to the indiscriminate use of antifungal drugs. **Objective:** To evaluate the antifungal effect of the ethanolic extract of *Azadirachta indica* at 100% with fluconazole 25 µg on *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*. **Methodology:** A quasi-experimental, preclinical and analytical study was carried out. The 100% ethanolic leaf extract of *Azadirachta indica* and the ethanolic leaf extract of *Azadirachta indica* combined with 25 µg fluconazole were prepared. There was a control group with fluconazole 25 µg and others with dimethyl sulfoxide (DMSO). The antifungal effect was determined by measuring the inhibitory halo (HI) based on the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 10 repetitions were performed in each case. The ANOVA test and post hoc analysis of the least significant difference were used, $p < 0.05$ was considered as statistically significant. **Results:** The mean HI of the ethanolic extract of *Azadirachta indica* was 13.8 ± 1.5 mm, in combination with fluconazole it was 25.9 ± 1.2 mm, and of fluconazole alone 22.1 ± 1.5 mm. The comparison of the means of the HI generated by the ethanolic extract of *Azadirachta indica*, fluconazole and the combination of both had a $p < 0.01$. In the post hoc test, all groups were different from each other. **Conclusion:** The ethanolic extract of *Azadirachta indica* combined with fluconazole exerts an antifungal effect on strains of *Candida albicans* ATCC 10231, superior to the effect of fluconazole alone.

Keywords: Antifungal agents, *Candida albicans*, *Azadirachta*, *fluconazole* (Source: MeSH NLM).

Información del artículo

Fecha de recibido

18 de marzo del 2022

Fecha de aprobado

26 de junio del 2022

Correspondencia

Maricielo Loyola Gil
Dirección: Diego de Medina 485,
Trujillo-Perú.
Teléfono: 965977117
Correo electrónico: mclg.44@out-look.com.pe

Declaración de conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Contribuciones de autoría

Los autores participaron en la génesis de la idea, diseño de proyecto, recolección e interpretación de datos, análisis de resultados y preparación del manuscrito del presente trabajo de investigación.

Fuente de financiamiento

Autofinanciado

Citar como: Loyola Gil M, Chian García AM, Polo Gamboa JA. Efecto antifúngico del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* con el fluconazol sobre *Candida albicans*. Rev Peru Med Integrativa. 2022;7(1).



INTRODUCCIÓN

En la última década ha incrementado la incidencia de infecciones por hongos, la resistencia a los fármacos antifúngicos y la mortalidad de estas infecciones llegando hasta un 90%⁽¹⁾. Las especies de *Candida* son las causas de mayor morbimortalidad y pueden variar desde infecciones locales a sistémicas de acuerdo a la localización y vía de diseminación. Se calcula que anualmente a nivel mundial la candidiasis invasiva afecta a cerca 250 mil personas, con una incidencia de 2 a 14 casos por cada 100 000 habitantes⁽²⁾. En pacientes hospitalizados, más del 5% pueden desarrollar una infección intrahospitalaria y, de estos, el 5% podría estar causada por *Candida spp.*⁽³⁾. En el Perú, se estimó 581 174 casos de infecciones fúngicas en pacientes inmunosuprimidos, de los cuales 1557 fueron causados por especies de *Candida*, con una incidencia en Lima de 1,18 a 2,6 casos por cada 1000 hospitalizaciones⁽¹⁾.

El uso indiscriminado de los triazoles ha creado resistencia al fluconazol, un fungistático que actúa inhibiendo el citocromo P450 de la enzima 14 α -demetilasa, parte de la vía de la síntesis del ergosterol⁽⁴⁾. Se ha reportado resistencia de *Candida albicans* al fluconazol entre 1 al 6%, según un estudio publicado en el 2016⁽⁵⁾. Ante esta problemática, la medicina tradicional puede jugar un rol importante; así pues, según la OMS un 80% de la población mundial acude a la medicina tradicional. Una de las plantas que se ha usado en la medicina ayurvédica por más de 4000 años debido a sus propiedades medicinales es la *Azadirachta indica* o mejor conocida como neem o flor de la India^(6,7).

La *Azadirachta indica*, perteneciente a la familia *Meliaceae*, es un árbol de crecimiento rápido encontrado en la India y en países tropicales del continente africano y americano. La *Azadirachta indica* contiene varios componentes como la nimbina, nimbidina, nimbolida y limonoides que participan en el manejo de enfermedades a través de la modulación de vías genéticas⁽⁷⁾. El nimolol actúa desnaturalizando proteínas y reacciona con los fosfolípidos de la membrana celular de las células fúngicas⁽⁸⁾. Además, la quercetina y el β -sitosterol fueron los primeros flavonoides polifenólicos purificados a partir de las hojas frescas de neem y se conoce que poseen actividad antifúngica y antimicrobiana⁽⁷⁾.

Diversos estudios han sido realizados en relación al efecto antifúngico de la *Azadirachta indica*. Imran H, et al. demostraron el efecto antifúngico del extracto etanólico foliar de neem sobre cepas de *Candida albicans*, con un efecto inhibitorio a una concentración de 20 mg/mL⁽⁹⁾. Faleh I, et al. concluyeron que el extracto etanólico foliar de neem

al 25% ejerció el mayor efecto antifúngico sobre las cepas *C. albicans*⁽¹⁰⁾. Asimismo, respecto a la actividad antimicótica del extracto etanólico foliar de neem, se ha encontrado que su efecto fungistático es parcial a las 24 horas, su concentración inhibitoria mínima es 30% y su efecto fungicida se alcanza con una concentración de 35%⁽¹¹⁾.

Por ende, ante la presencia de resistencia a los fármacos antifúngicos y la toxicidad de los mismos durante terapias prolongadas, es necesario buscar nuevas opciones terapéuticas, especialmente en la fitoterapia. Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio es evaluar el efecto sinérgico antifúngico del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* comparado con fluconazol sobre cepas de *Candida albicans* en un estudio *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño y área de estudio

Estudio cuasi experimental, analítico, prospectivo. Realizado en la ciudad de Trujillo, al norte del Perú.

Población y muestra

La población de este estudio estuvo conformada por cepas ATCC 10231 de la especie *Candida albicans* cultivados. Se incluyeron especímenes de *Candida albicans* ATCC 10231 puros que fueron cultivados en agar Sabouraud por 48 horas a 35-37 °C de temperatura. Se excluyeron especímenes contaminados. Para determinar el tamaño muestral de 4 placas Petri, se utilizó un muestreo no probabilístico. Se utilizaron 10 repeticiones por cada grupo de estudio, teniendo un total de 40 repeticiones.

Variables e instrumentos

La variable independiente fue el tratamiento antifúngico, clasificado en los siguientes grupos: extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100%, extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100% combinado con fluconazol 25 μ , el grupo control con fluconazol 25 μ g, y el grupo control con Dimetil sulfóxido (DMSO). La variable dependiente fue el efecto antifúngico inhibitorio sobre *Candida albicans*. Esta fue medida con el halo de inhibición (HI), siguiendo los criterios del Estándar M44-A2 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): con efecto antifúngico cuando la zona de inhibición \geq 19 mm y sin efecto antifúngico cuando la zona de inhibición < 19 mm⁽¹²⁾.

Procedimientos

Procesamiento de la muestra vegetal

Se recolectaron hojas de neem (*Azadirachta indica*) en el mercado local de Trujillo, Perú. La identificación taxonómica de *Azadirachta indica* fue realizada por un biólogo botánico,

quien evaluó el control de calidad en el Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo. Se transportó la planta recolectada al laboratorio de Ciencias médicas de la Universidad César Vallejo (UCV), donde se procedió a eliminar las sustancias extrañas. Se lavó la planta con agua destilada, luego se procedió a desinfectarla utilizando hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,5%. Luego, se enjuagó la planta con agua destilada con el fin de retirar los residuos de NaClO. Luego del lavado de las hojas, se procedió a colocar 500 g de hojas sobre papel Kraft, y se procedió a su secado a 40 °C. Se pulverizaron las hojas secas con un mortero y este material pulverizado depurado y homogéneo se guardó en un frasco de vidrio ámbar.

Preparación del extracto etanólico foliar de neem

Se pesó 50 g del material pulverizado y se almacenó en un contenedor de vidrio de 1000 mL, el cual se protegió de la luz recubriéndolo con papel aluminio. Posteriormente, se añadió etanol puro y se maceró en agitación constante por 7 días, obteniéndose así, extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica*. Una vez terminado el proceso de maceración, se filtró tres veces el preparado.

Para el primer filtrado se utilizó papel filtro Whatman N° 41, para el segundo y tercer filtrado se usó papel filtro Whatman N° 2 y N° 1, respectivamente. Una vez filtrado el extracto, se dejó secar en Rotavapor para luego ser pesado y almacenado en papel aluminio. De esta forma, el extracto se encontró listo para ser utilizado. Para preparar la concentración del extracto etanólico foliar de neem al 100%, se le realizaron diluciones en etanol hasta obtener una concentración del 100%. Dicha dilución fue almacenada en un frasco herméticamente tapado y permaneció refrigerada hasta su uso.

Preparación de las cepas

Se adquirió las cepas ATCC 10231 de *Candida albicans* del laboratorio Genlab. Se suspendieron las cepas en NaCl al 0,85% y se procedió a ajustar la turbidez del equivalente al tubo 0,5 de la escala de McFarland para *C. albicans* por cámara cuenta células, hasta lograr la cantidad de inóculo deseada (1×10^6 UFC/mL). Se corroboró a través de la sumatoria de diluciones en las cajas Petri. El medio agar Sabouraud pasó por un proceso de reconstitución, esterilización y enfriado, y se mantuvo a 45°C.

Posteriormente, se procedió a inocular 1 mL de suspensión del inóculo (1×10^6 UFC/mL) por cada 100 mL de medio de cultivo, luego se homogenizó y distribuyó en las cajas esterilizadas de noventa milímetros de diámetro, a razón de 20 mililitros por placa Petri. Se dejó reposar hasta solidificarse y se procedió a rotular las placas con el microorganismo usado. Por último, en cada una de las placas se acondicionaron dos o tres pozos equidistantes de 11 milímetros de diámetro⁽¹³⁾.

Prueba de susceptibilidad

Se añadió 100 µL del respectivo extracto (1 mg/mL) de las distintas muestras en cada pozo, se dejaron en reposo por una hora a temperatura ambiente y luego se procedió a incubar a 37 °C por un día las cepas de *C. albicans*. En esta prueba se usaron como controles positivos, cepas expuestas a fluconazol (0,2 mg/mL) y como control negativo a cepas disueltas en Dimetil sulfoxido (DMSO), respectivamente. Al disco de fluconazol se adicionó con la micropipeta el extracto etanólico de la planta. Posteriormente, se procedió a medir los halos inhibitorios, se recopilaron los resultados obtenidos y se consideró que tiene un efecto antifúngico significativo a una zona de inhibición mayor o igual a 19 milímetros. Para los procedimientos con *Candida albicans* se siguió el protocolo del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁽¹²⁾.

Análisis estadístico

La información recolectada fue ingresada en la base de datos del programa estadístico SPSS versión 25. La información fue detallada en las tablas y se representó gráficamente mediante el diagrama en escalera. Para el análisis de los datos obtenidos se aplicaron las estadísticas descriptivas: medias y desviación estándar en los casos correspondientes. Con el propósito de comparar el efecto de cada tratamiento antifúngico considerando el halo inhibitorio se utilizó el ANOVA. Además, se realizó la prueba *post hoc* de la mínima diferencia significativa con el propósito de establecer cuál de ellos tiene mayor efecto⁽¹⁴⁾.

Aspectos éticos

Para realizar este proyecto se aplicaron las normas de bioseguridad de laboratorio establecidas por el Ministerio de Salud. Además, se contó con la aprobación del proyecto por parte del Comité de Investigación de la Facultad De Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo⁽¹⁵⁾. Es importante resaltar que en este estudio se respetaron los principios de ética estipulados en el código de ética del Colegio Médico del Perú especialmente el Capítulo 6 artículo 48 y se respetó la biodiversidad de la *Azadirachta indica*^(16,17).

RESULTADOS

En la Tabla 1, se evidencia que el extracto etanólico de *Azadirachta indica* no ejerce efecto antifúngico sobre *Candida albicans* al tener un halo inhibitorio de $13,8 \pm 1,5$ mm; en cambio la combinación con fluconazol sí tiene efecto antifúngico $25,9 \pm 1,2$ mm, en comparación con el fluconazol cuyo resultado fue $22,1 \pm 1,4$ mm.

La prueba del análisis de varianza (ANOVA) de las medias de los halos de inhibición generados por el extracto etanólico de *Azadirachta indica*, fluconazol y la combinación de ambos resultó con un p menor a 0,01. En la Tabla 2, al aplicar la prueba *post hoc*, se puede evidenciar que los resultados son diferentes entre sí.

Tabla 1. Datos descriptivos del efecto antifúngico *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica*, solo y con fluconazol sobre *Candida albicans* ATCC 10231

Grupo de tratamiento	Número de repeticiones	Media del HI (mm)	Desviación estándar del HI
Extracto etanólico de <i>A. indica</i> al 100%	10	13,80 (12,74-14,86)	1,476
Extracto etanólico de <i>A. indica</i> al 100% + fluconazol 25µg	10	25,90 (25,30-26,92)	1,197
Fluconazol 25µg	10	22,10 (21,06-23,14)	1,449
Dimetil sulfóxido	10	0,00	0,000

* HI: halo inhibitorio

DISCUSIÓN

Nuestro estudio encontró que el extracto etanólico del *Azadirachta indica* fue inferior al extracto de *Azadirachta indica* con fluconazol sobre *Candida albicans*. En cuanto al efecto del fluconazol solo, este tuvo un halo inhibitorio menor al halo del extracto etanólico de fluconazol con *Azadirachta indica*. Además, se constató que el extracto etanólico de *Azadirachta indica* también posee efecto antifúngico cuando se expuso a las cepas de *Candida albicans*, obteniéndose halos inhibitorios con valores mayores al rango de referencia para sensibilidad de este hongo⁽¹²⁾.

Hemos hallado un efecto antifúngico con la combinación de *A. indica* y fluconazol, mayor que la de fluconazol solamente, lo cual nos podría sugerir un efecto sinérgico entre estos tratamientos. Este valor fue superior al encontrado por Saini *et al.*, cuyo estudio también evaluó el efecto antifúngico de la combinación del extracto hexano foliar de *Azadirachta indica* al 60% y una preparación de gel de fluconazol, el resultado que obtuvieron fue de 16 mm⁽¹⁸⁾.

La diferencia entre los halos obtenidos podría deberse al uso de un solvente diferente y a la concentración menor que fue empleada. Sin embargo, pese a tener un valor inferior al del presente estudio, el halo inhibitorio de la combinación fue mayor al de la *Azadirachta indica* sola, que fue de 14 mm.

Nuestros resultados de la inhibición de neem con fluconazol también fueron superiores a los resultados de las investigaciones de Ayed S. *et al.*⁽¹⁰⁾ y de Das L. *et al.*⁽¹⁹⁾, quienes hallaron un valor medio de 12 mm. Sin embargo, dichos estudios utilizaron concentraciones de extracto etanólico de *Azadirachta indica* al 25% y 30%, respectivamente, que fueron comparadas con concentraciones menores, por lo que la diferencia en resultados podría deberse a la menor concentración que utilizaron. Asimismo, la media del halo de inhibición 7,1 mm hallado por Bohora A, *et al.*⁽²⁰⁾, también es inferior al obtenido por el presente estudio, esto puede deberse al haberse utilizado una concentración del 25%.

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos con los estudios de Imran H. *et al.*⁽⁹⁾ y Arul P. *et al.*⁽²¹⁾, se demuestra

Tabla 2. Comparación *post hoc* de la mínima diferencia significativa de los efectos antifúngicos entre cada grupo de estudio.

Grupos de tratamiento	Diferencia de medias	Desviación estándar	Valor de p	
Extracto etanólico de <i>A. indica</i> al 100%	Extracto etanólico de <i>A. indica</i> al 100% + fluconazol 25µg	-12,1	0,534	<0,001
	Fluconazol 25µg	-8,3	0,534	0,000
	Dimetil sulfóxido	-13,8	0,534	0,000
Extracto etanólico de <i>A. indica</i> al 100% + fluconazol 25µg	Fluconazol 25µg	3,8	0,534	0,000
	Dimetil sulfóxido	25,9	0,534	0,000
Fluconazol 25µg	Extracto etanólico de <i>A. indica</i> al 100% + fluconazol 25µg	-3,8	0,534	0,000
	Dimetil sulfóxido	22,1	0,534	0,000
Dimetil sulfóxido	Extracto etanólico de <i>A. indica</i> al 100% + fluconazol 25µg	-25,9	0,534	0,000
	Fluconazol 25µg	-22,1	0,534	0,000

que fueron inferiores a los valores, puesto que sus investigaciones obtuvieron halos inhibitorios de 29,8 mm y 33 mm, respectivamente. Es importante resaltar que dichos estudios utilizaron concentraciones de 20% y 50%, respectivamente, lo cual resulta relevante porque a pesar que usaron concentraciones menores a las de nuestro estudio, obtuvieron resultados mayores.

También es importante tomar en cuenta el tipo de extracto utilizado. Los estudios de Swapna R. *et al.*⁽²²⁾, Bansal⁽²³⁾ y Arul P. *et al.*⁽²¹⁾, emplearon extractos acuosos de *Azadirachta indica* al 50% y obtuvieron los siguientes halos inhibitorios: 3 mm, 5,8 mm y 29,8 mm, respectivamente. Mientras tanto, autores como Falana M y Nurudeen Q.⁽²⁴⁾ y Akpuaka A. *et al.*⁽²⁵⁾ utilizaron extractos hexánicos de *Azadirachta indica* al 100% y obtuvieron zonas inhibitorias de 9 mm y 28 mm, respectivamente. Los resultados de Akpuaka fueron mayores a nuestro estudio, probablemente debido al solvente utilizado, ya que emplearon n-hexano y su tiempo de maceración fue prolongado.

Por otro lado, la parte de la planta empleada para hacer el extracto puede influir en el resultado. El presente estudio empleó las hojas para realizar el extracto, en cambio en el estudio de Autade⁽²⁶⁾, se utilizó la corteza de la *Azadirachta indica* y acetona como solvente y obtuvo como halo inhibitorio 13 mm, siendo inferior al presente estudio. Este valor podría deberse a la parte que se utilizó para preparar el extracto así como el solvente empleado, puesto que distintas partes de la misma planta podrían tener composiciones fitoquímicas distintas. Otro

estudio como el de Swapna *et al.*⁽²²⁾, utilizó las semillas de *Azadirachta indica* y como solventes al fluido de dióxido de carbono supercrítico y metanol al 30%, obteniendo un halo inhibitorio promedio de 16 mm, siendo inferior también al del presente estudio.

Entre las limitaciones de este estudio puede considerarse el tipo de hongo utilizado, *Candida albicans*, una especie sensible a los azoles con respuesta al fluconazol. No obstante, se empleó una cepa certificada idónea para evaluar el efecto de agentes antifúngicos. Cabe recalcar que una cepa de *Candida albicans* resistente a fluconazol sería más apropiada para evaluar la sinergia del extracto etanólico de *Azadirachta indica* y fluconazol, ya que se podría comparar tanto con el extracto solo como con el mismo fluconazol. Otra limitación de este estudio es el haber utilizado solo el extracto etanólico de las hojas de *Azadirachta indica* en lugar de comparar distintas partes de la planta como las semillas, corteza o frutos, los cuales aún no cuentan con muchos estudios a diferencia de las hojas.

CONCLUSIÓN

Se concluye que el extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100% no tiene efecto inhibitorio del crecimiento sobre *Candida albicans* ATCC 10231. El fluconazol 25 µg ejerce efecto antifúngico sobre *Candida albicans* ATCC 10231. La combinación del extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* al 100% con fluconazol 25µg tiene efecto inhibitorio del crecimiento sobre *Candida albicans* ATCC 10231.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zurita Macalupú S. Situación de la resistencia antifúngica de especies del género *Candida* en Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. enero de 2018;35(1):126-31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.17843/rp-mesp.2018.351.3563>
2. Arendrup MC, Patterson TF. Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment. *J Infect Dis*. 2017;216(suppl_3):445-51. DOI: 10.1093/infdis/jix131
3. Pemán J, Cantón E, Quindós G, Eraso E, Alcoba J, Guinea J, et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(5):1181-7. doi: 10.1093/jac/dks019.
4. Ruiz-Pérez NJ, Arriaga-Alba M, Ocharán-Hernández ME, Sánchez-Navarrete J, Pérez-Cruz E, Montes-Vera M del R, et al. Aspectos farmacocinéticos del fluconazol. *Rev Hosp Juárez México [Internet]*. 2013 [citado 21 de octubre de 2022];80(1):28-33. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=48002>
5. López-Ávila K, Dzul-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León JJ, Zavala-Castro JE, López-Ávila K, et al. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Bioméd*. 2016;27(3):127-36. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1041932>
6. World Health Organization. WHO global report on traditional and complementary medicine 2019. Geneva: World Health Organization; 2019. 226 p. Available on: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312342>
7. Bijauliya Kumar Rohit, Alok Shashi, Kumar Chanchal Dilip, Sabharwal Monika, Deo Yadav Rahul. An updated review of pharmacological studies on *Azadirachta Indica* (Neem). *Int J Pharm Sci Res*. 2018;9(7):2645-55.
8. Saleem S, Muhammad G, Hussain MA, Bukhari SNA. A comprehensive review of phytochemical profile, bio-

- actives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*. *Phytother Res PTR*. julio de 2018;32(7):1241-72. DOI: 10.1002/ptr.6076
9. Imran H, Sohail T, Rehman A ur, Iqbal W, Fatima N, Shakir M. A comparative study of four indigenous medicinal plants of Pakistan against some oral pathogens. *Bangladesh J Med Sci [Internet]*. 16 de enero de 2020 [citado 21 de octubre de 2022];19(2):284-90. Disponible en: <https://www.banglajol.info/index.php/BJMS/article/view/45009>
 10. Ayed S, Faleh I, F. Atshan O. The role of Neem (*Azadirachta indica*) ethanolic extracts on the murine experimentally infected with Candidiasis The role of Neem (*Azadirachta indica*) ethanolic extracts on the murine experimentally infected with Candidiasis. *Trop J Pharm Res*. 19 de mayo de 2020;11:890-6.
 11. Reyes de Fuentes D, Fernández Da Silva R. Efecto biocida in vitro del extracto foliar de *Azadirachta indica* en *Staphylococcus* sp y *Pseudomonas* sp. *Salus*. 2013;17(3):34-41. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-71382013000300006
 12. Alexander BD, Procop GW, Dufresne P, Clinical and Laboratory Standards Institute, editores. Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts. Wayne, Pa: CLSI; 2017. 14 p. (Clinical and Laboratory Standards Institute).
 13. Rathod T, Padalia H, Chanda S. Anticandidal and synergistic anticandidal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* and *Azadirachta indica* essential oils. *IOSR Journal Of Pharmacy*. 2017;7(9):52-71.
 14. Hernández Sampieri, R, Fernández Collado, C., Baptista Lucio, M. P. Metodología de la investigación. 2010.
 15. Universidad César Vallejo. Protocolo de seguridad en laboratorios. 2018.
 16. Ruggiero M de los ÁMD. Declaración de Helsinki, principios y valores bioéticos en juego en la investigación médica con seres humanos. *Rev Colomb Bioét [Internet]*. 2011;6(1):125-44. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=189219032009>
 17. Ortiz Cabanillas P. Acerca del Código de Ética y Deontología del Colegio Médico del Perú: fundamentos teóricos. *Acta Médica Peru [Internet]*. enero de 2008;25(1):46-7. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1728-59172008000100009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 18. Ankit Saini, Geetanjali Saini, Bhupendra Singh, Surajpal Verma, Om Prakash, Manish Vyas. Synergistic effect of *Azadirachta Indica* and *Curcuma Longa* with fluconazole gel against *Candida Albicans*. *IJPSR [Internet]*. 2019;10(2):692-9.
 19. Das L, Godbole SS, Marg N. Antifungal and Phytochemical Analysis of *Lantana Camara*, *Citrus Limonum* (Lemon), *Azadirachta Indica* (Neem) and *Hibiscus Rosasinensis* (China Rose). 2015;
 20. Bohora A, Hegde V, Kokate S. Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extract and 2% sodium hypochlorite against *E. faecalis*, *C. albicans* and mixed culture- An in vitro study. *Endodontology*. 2010;22(1):10.
 21. Arul P, Mohamad I, Salim R, Mohamed Z. Antifungal Effect of Malaysian Neem Leaf Extract on Selected Fungal Species Causing Ootomycosis in In-Vitro Culture Medium. *Malays J Med Health Sci*. 1 de julio de 2015;11:69-84.
 22. Swapna Sonale R, Pushpa S. SM, Ramalakshmi K. Efficacy of Neem Kernel Bioactives Extracted using Supercritical Fluid Carbon Dioxide on Selected Dermatophytes and Foodborne Pathogens. *Int J Innov Technol Explor Eng*. 2019;9(1):4304-9.
 23. Bansal V, Gupta M, Bhaduri T, Shaikh SA, Sayed FR, Bansal V, et al. Assessment of Antimicrobial Effectiveness of Neem and Clove Extract Against *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*: An In vitro Study. *Niger Med J J Niger Med Assoc*. 2019;60(6):285-9. DOI: 10.4103/nmj.NMJ_20_19
 24. Falana MB, Nurudeen QO. Analysis of secondary metabolites and in vitro evaluation of extracts of *Carica papaya* and *Azadirachta indica* leaves on selected human pathogens. *Not Sci Biol [Internet]*. 2020;12(1):57-73. Available on: <https://www.notulaebiologicae.ro/index.php/nsb/article/view/10541>
 25. Akpuaka A, Ekwenchi MM, Dashak DA, Ahmed D. Biological activities of characterized isolates of n-hexane extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves. *N Y Sci J*. 1 de enero de 2013;11:141-7.
 26. Autade R.H., Saini S., Reddy P. G., Deorukhkar S.C. Effect of Neem extract against opportunistic bacterial and fungal pathogens associated with AIDS. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2015;4(3):988-99.
- 