

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE
EXTRACTOS VEGETALES Y SU EVALUACIÓN ANTIMICÓTICA
PARA SU APLICACIÓN EN ODONTOPEDIATRÍA**

POR

MARTHA ELIZABETH GALINDO HERNÁNDEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA**

MARZO, 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS
VEGETALES Y SU EVALUACIÓN ANTIMICÓTICA PARA SU APLICACIÓN EN
ODONTOPEDIATRÍA**

Por

MARTHA ELIZABETH GALINDO HERNÁNDEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA**

Marzo, 2018

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS
VEGETALES Y SU EVALUACIÓN ANTIMICÓTICA PARA SU APLICACIÓN EN
ODONTOPEDIATRÍA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA**

Por

MARTHA ELIZABETH GALINDO HERNÁNDEZ

Comité de examen de Tesis

Dra. Sonia Martha López Villarreal

Presidente

Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis

Secretario

Dra. Hilda Hortencia Hermelinda Torre Martínez

Vocal

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS
VEGETALES Y SU EVALUACIÓN ANTIMICÓTICA PARA SU APLICACIÓN EN
ODONTOPEDIATRÍA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA**

Por

MARTHA ELIZABETH GALINDO HERNÁNDEZ

Dirección de Tesis

Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis

Director de tesis

Dr. Claudio Cabral Romero

Codirector de Tesis

Dr. René Hernández Delgadillo

Asesor metodológico

**OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS
VEGETALES Y SU EVALUACIÓN ANTIMICÓTICA PARA SU APLICACIÓN EN
ODONTOPEDIATRÍA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA**

Por

MARTHA ELIZABETH GALINDO HERNÁNDEZ

Dirección de Tesis

Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis

Director de tesis

Dr. Abelardo Chávez Montes

Asesor externo

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis padres, por darme la oportunidad de superar cada meta que me propuse, por apoyarme y siempre estar ahí para mí. Por apoyarme económica y moralmente en este proceso de crecimiento. Por forjarme y enseñarme los valores que me han llevado a ser la persona que soy. A ustedes les dedico este trabajo, y cualquier otro logro que llegue a alcanzar en mi vida.

A mi hermano, que ha sido mi ejemplo a seguir durante toda mi vida, quien creció conmigo y con quien un día soñamos ser odontólogos, a quien le debo tanto de lo que soy como profesionalista y como persona, a quien siempre acudiré y se que ahí estará a pesar de la distancia que nos separe.

A Isaac, que siempre estuvo ahí para animarme cuando sentía que no podía más, por acompañarme y ayudarme durante esas horas y horas en los ensayos de laboratorio, por siempre estar pendiente de mi en todos los aspectos.

A la Doctora Osvelia Rodriguez, quien estuvo a mi lado apoyándome en todo el proceso de la investigación, defendiendo nuestros métodos y trabajando en conjunto con los demás doctores. Me reafirmó el valor del compañerismo, la paciencia, la constancia, el compromiso, la ética, pero, sobre todo, me demostró que para ser un excelente investigador, primero tienes que ser un excelente ser humano con buenos valores y principios. Gracias infinitas por compartir su conocimiento conmigo

A mis trece compañeros del posgrado que me hicieron una estancia más amena y de los quienes en 2 años aprendí tantas cosas, siempre los recordaré hermanos.

Al Dr. Claudio Cabral, el Dr. René Delgadillo, el Dr. Casiano del Ángel, el Dr. Ezequiel Viveros, el Dr. Sergio y la QBP. Vilma por su apoyo, paciencia y conocimientos compartidos al encontrarme trabajando en los diferentes laboratorios de la Facultad de Odontología y de Ciencias biológicas de la UANL.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado a través de la beca otorgada.

Al programa para el desarrollo profesional docente, para el tipo superior (PRODEP) 2017.

Al programa de apoyo a la investigación científica y tecnológica (PAICYT-UANL), No. SA200-15

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL por facilitarme el equipo, instalaciones y personal para realizar esta investigación.

A la Facultad de Odontología de la UANL, por el apoyo brindado al trabajar en el Laboratorio de Biología Molecular y de Microbiología

DEDICATORIA

A mi familia:

Mamá, Papá y Hermano, siempre serán mis pilares, a ustedes les debo todo lo que soy hoy,
en toda mi vida no terminaré de agradecerles por tanto.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	V
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	VI
DEDICATORIA	VII
LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
RESUMEN	15
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS.....	19
General:	19
Específicos:	19
ANTECEDENTES.....	20
Candida.....	20
Candidiasis	20
Candida albicans.....	21
Manifestaciones clínicas	23
Tratamiento	23
Resistencia a los antifúngicos.....	24
Alternativas naturales	25
Propiedades de las plantas	26
MARCO DE REFERENCIA	27
Extractos vegetales	27
Eryngium carlinae	27
Coriander Sativum	28
Illicium verum.....	29
Hippocratea excelsa.....	30
Elettaria cardamomum	31
Arctostaphylos pungens	32
Ensayo de viabilidad celular XTT.....	32
METODOLOGÍA	34
Obtención del extracto de las plantas Eryngium carlinae, Coriandrum sativum, Illicium verum, Hippocratea excelsa, Elettaria cardamomum y Arctostaphylos	

pungens	34
Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de Eryngium carlinae,	
Coriandrum sativum, Illicium verum, Hippocratea excelsa, Elettaria cardamomum	
y Arctostaphylos pungens contra C. albicans (ATCC 90029)	37
Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	37
Prueba contra C. albicans (ATCC 90029) en pozo	37
Obtención de aislados clínicos de muestras de saliva de pacientes infantiles	38
Frotis y tinción de las muestras de aislados clínicos	39
ChromAgar para diferenciar la cepa de Candida presente	39
Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de Eryngium carlinae,	
Coriandrum sativum, Illicium verum, Hippocratea excelsa, Elettaria cardamomum	
y Arctostaphylos pungens contra aislados clínicos de Candida	40
Preparación de muestras a utilizar	40
Prueba contra aislados clínicos de Candida en pozo	40
Determinación del efecto antifúngico de los extractos empleando ensayos de	
viabilidad celular XTT	42
RESULTADOS.	44
Obtención y caracterización fitoquímica de los extractos de Eryngium carlinae,	
Coriandrum sativum, Illicium verum, Hippocratea excelsa, Elettaria cardamomum	
y Arctostaphylos pungens	44
Obtención de los extractos acetónicos de Hippocratea excelsa, Eryngium carlinae,	
Coriandrum sativum, Illicium verum y Elettaria cardamomum y metanólico de	
Arctostaphylos pungens mediante maceración.....	45
Determinación de la actividad antifúngica de los extractos esenciales contra aislados	
clínicos de C. albicans (ATCC 90029).....	46
Prueba contra C. albicans (ATCC 90029) en pozo	46
Obtención de aislados clínicos de muestras de saliva de pacientes infantiles	47
ChromAgar para diferenciar la cepa de Candida presente	48
Frotis y tinción de las muestras de aislados clínicos	49
Obtención de muestras II	49
ChromAgar para diferenciar la cepa de Candida presente	50
Frotis y tinción de las muestras de aislados clínicos	51
Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de Eryngium carlinae,	
Coriandrum sativum, Illicium verum, Hippocratea excelsa, Elettaria cardamomum	
y Arctostaphylos pungens contra aislados clínicos de Candida	52
Determinación de la actividad antifúngica de los extractos empleando ensayos de	
viabilidad celular XTT	54
DISCUSIÓN	56

CONCLUSIÓN	58
LITERATURA CITADA.....	59
ANEXOS.....	69
Anexo 1: Consentimiento informado a padres.....	69
Anexo 2: Hoja de captura de datos	70
PRODUCTOS GENERADOS	71

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Relación material vegetal/solvente para obtención de extractos.....	34
Tabla 2. Distribución de Extracto/ Especie de Candida “Otras especies”	41
Tabla 3. Distribución de Extracto/ Especie de Candida “C. albicans”	42
Tabla 4. Distribución de Extracto/ Especie de Candida “C. Krusei”	42
Tabla 5. Pruebas químicas realizadas para los extractos.	45
Tabla 6. Rendimiento del material vegetal.	46
Tabla 7. Solubilidad de los extractos en Acetona, Etanol y DMSO.	46
Tabla 8. Halos de inhibición contra Candida albicans (ATCC 900-29)	47
Tabla 9. Relación de muestras I positivas con la especie encontrada	48
Tabla 10. Relación de muestras II positivas con la especie encontrada	50
Tabla 11. Relación especies de Candida/Extractos empleados.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Candida albicans vista al microscopio	20
Figura 2. Lesión de Candida en un paciente infantil	21
Figura 3. Hifas de Candida albicans	22
Figura 4. Candidiasis Eritematosa (García et al, 2014)	23
Figura 5. Nistatina en suspensión oral	23
Figura 6. Fluconazol en cápsulas	24
Figura 7. Plantas utilizadas como alternativas farmacéuticas.....	26
Figura 8. Extractos vegetales	27
Figura 9. Eryngium carlinae (Hierba del sapo)	28
Figura 10. Coriander sativum (Cilantro bolita).....	29
Figura 11. Illicium verum (Anís estrella).....	30
Figura 12. Hippocratea excelsa (Cancerina)	30
Figura 13. Elettaria cardamomum (Cardamomo).....	31
Figura 14. Arctostaphylos pungens (Pingüica).....	32
Figura 15. Ensayo de Viabilidad Celular XTT (Moravský et al, 2015).....	33
Figura 16. Rotavapor para la obtención de extractos	35
Figura 17. Obtención de extractos.....	36
Figura 18. Diluciones con DMSO	37
Figura 19. Siembra de Candida albicans (ATCC 900-29) en cajas petri.	
a) Siembra de Candida albicans, b) Realización de pozos, c) Adición de	
extracto, d) Colocación en la incubadora.....	38
Figura 20. Obtención de muestras	38

Figura 21. Frotis y tinción de las muestras.	
a) Frotis, b) Colocación de cristal violeta, c) Colocación de yodo lugol, d) Colocación de safranina, e) Reactivos utilizados para la tinción de Gram.....	39
Figura 22. Siembra de los aislados clínicos en cajas petri con ChromAgar.	
a) y b) Siembra de aislados clínicos, c) Cajas listas para incubarse.....	40
Figura 23. Siembra de los aislados clínicos.	
a) Material a utilizar, b) Extractos diluidos, control positivo y negativo, c) Siembra de los aislados, d) Colocación de los extractos en los pozos	41
Figura 24. Pruebas químicas realizadas.	
a) Pruebas colorimétricas positivas a grupos carbohidratos, carbonilos y cumarinas,	
b) Cromatografía de Capa delgada con fracciones de tonalidad rojiza y verdosa, que corresponde a los grupos identificados.....	44
Figura 25. Halos de inhibición	47
Figura 26. Distribución de muestras de acuerdo a edad y género (n=15)	47
Figura 27. Muestras I positivas sembradas en ChromAgar	48
Figura 28. Relación de muestras Negativas (Sanos) y Positivas (Presencia de especie de	48
Candida) (n=15)	48
Figura 29. Muestras I positivas vistas al microscopio	49
Figura 30. Distribución de muestras de acuerdo a edad y género (n=15)	49
Figura 31. Muestras II positivas sembradas en ChromAgar.....	50
Figura 32. Relación de muestras Negativas (Sanos) y Positivas (Presencia de especie de Candida) (n=15).....	51
Figura 33. Muestras II positivas vistas al microscopio.....	51

Figura 34. Actividad antifúngica de los extractos, control positivo y negativo contra los tres tipos de especies encontradas.....	53
Figura 35. Ensayo de viabilidad celular XTT contra C. Krusei.....	54
Figura 36. Ensayo de viabilidad celular XTT contra C. albicans (ATCC 90029).....	55

RESUMEN

Introducción: El género *Candida* forma parte de la flora normal del sistema gastrointestinal, vagina y mucosa perioral de los seres humanos. Se ha descrito que en individuos inmunosuprimidos o bajo tratamientos médico local o sistémico, puede ser patógeno y producir candidiasis. El fluconazol y la nistatina son fármacos utilizados para tratar la candidiasis. En los últimos años, se han aislado cepas de levaduras resistentes o con susceptibilidad disminuida a los antifúngicos, por lo que se requiere desarrollar nuevos tratamientos para dichas infecciones. Se ha demostrado efectividad en el uso de extractos contra *Candida*, por lo que en este estudio se evaluó la acción antimicótica de los extractos acetónicos de *Eryngium carlinae*, *Coriandrum sativum*, *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y metanólico de *Arctostaphylos pungens* contra cepas aisladas de pacientes pediátricos. **Metodología:** Se obtuvieron los extractos y se caracterizaron fitoquímicamente, mediante pruebas colorimétricas y cromatografía en capa delgada (CCD) para la identificación preliminar de grupos químicos. Se evaluó su efecto antimicótico empleando ensayos de viabilidad celular XTT analizando diversas concentraciones contra *C. albicans* (ATCC 90029) y aislados clínicos obtenidos de pacientes. **Resultados:** Los extractos respondieron de manera positiva para la presencia de carbohidratos, grupos carbonilo y cumarinas y en la CCD se identificaron fracciones de tonalidad rojiza y verdosa que concuerdan con los grupos químicos identificados. Todos los extractos presentaron efecto inhibitorio contra *C. albicans* (ATCC 90029), y los ensayos de viabilidad celular sugieren fuertemente que los extractos de *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y *Arctostaphylos pungens* poseen una alta actividad antifúngica. Se encontró que *Elettaria cardamomum* presentó mayor acción contra *Candida albicans* con inhibición de 28.6 mm, para *Candida Krusei* 35.6mm y contra otras especies de *Candida* 28.6mm, con inhibición promedio de 30.66mm, siendo cercano al de la nistatina, control positivo empleado con 29.06mm. **Conclusiones:** Los extractos mostraron propiedades antifúngicas favorables por lo que se podría dar continuidad a estudios que permitan utilizarlos como una opción terapéutica al tratamiento de micosis orales.

ABSTRACT

Introduction: The genre *Candida* is part of the normal flora of the gastrointestinal system, vagina and perioral mucosa of human beings. It has been described that in immunosuppressed individuals or under local or systemic medical treatment, it can be pathogenic and cause candidiasis. Fluconazole and nystatin are drugs used to treat candidiasis. In recent years, strains of resistant or susceptible yeast have been isolated to antifungals, which is why new treatments for these infections must be developed. Effectiveness has been demonstrated in the use of extracts against *Candida*, that's why in this study the antifungal action of the acetic extracts of *Eryngium carlinae*, *Coriandrum sativum*, *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* and methanolic of *Arctostaphylos pungens* against isolated strains of pediatric patients were evaluated.

Methodology: The extracts were obtained and characterized phytochemically by colorimetric tests and thin layer chromatography (TLC) for the preliminary identification of chemical groups. Its antifungal effect was evaluated using XTT cell viability assays analyzing several concentrations against *C. albicans* (ATCC 90029) and clinical isolates obtained from patients.

Results: The extracts responded positively for the presence of carbohydrates, carbonyl groups and coumarins and in the TLC, fractions of reddish and greenish hue were identified, which agrees with the chemical groups identified. All the extracts showed an inhibitory effect against *C. albicans* (ATCC 90029), and cell viability assays strongly suggest that the extracts of *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* and *Arctostaphylos pungens* possess a high antifungal activity. It was found that *Elettaria cardamomum* showed greater action against *Candida albicans* with inhibition of 28.6 mm, for *Candida Krusei* 35.6mm and against other species of *Candida* 28.6mm, with average inhibition of 30.66mm, being close to that of nystatin, positive control used with 29.06 mm.

Conclusions: The extracts showed favorable antifungal properties, which is why studies that allow them to be used as a therapeutic option for the treatment of oral mycosis should be continued.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones oportunistas bucales más frecuentes son causadas por levaduras del género *Candida*. Al ser un hongo oportunista, su presencia no implica necesariamente infección clínica. En 1839 Langenbeck descubrió el microorganismo causante del *muguet* observándolo en forma de placas en las membranas mucosas de la boca y otros órganos, microorganismo que en 1923 Burkhout denominó *Candida albicans*.

El Género *Candida* comprende más de 150 especies, solamente una docena de las especies pertenecientes al Género *Candida* poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C. y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre.

La candidiasis es la infección fúngica más comúnmente diagnosticada en humanos, puede ser el resultado de una disfunción del sistema inmune o por resultado de un tratamiento médico local o sistémico. La candidiasis comúnmente afecta a la población infantil en la forma de candidiasis orofaríngea, intertrigo y dermatitis del pañal. Es sabido que la presencia de Candidiasis orofaríngea puede ser un importante factor de riesgo independiente para predecir infecciones por VIH. En los últimos años, se han aislado con mayor frecuencia, cepas de levaduras con resistencia o susceptibilidad disminuida a los antifúngicos, clínica o *in vitro*, siendo la primera, consecuencia fundamental del bajo nivel del fármaco en el tejido y/o sangre, debido a una interacción entre fármacos o al severo grado de inmunosupresión del paciente.

Actualmente se ha indagado en los productos naturales derivados de plantas, ya que tienen una fuente abundante de compuestos biológicamente activos, muchos de los cuales han sido las bases para el desarrollo de nuevos químicos farmacéuticos y son considerados como buenas alternativas para el tratamiento de infecciones.

HIPÓTESIS

“Los extractos de *Eryngium carlinae*, *Coriandrum sativum*, *Illicium verum*, *Elettaria cardamomum* y *Arctostaphylos pungens* mostrarán acción antifúngica contra *C. albicans* (ATCC 90029) y aislados clínicos”.

OBJETIVOS

General:

- Evaluar la acción antimicótica de los extractos de *Eryngium carlinae*, *Coriandrum sativum*, *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y *Arctostaphylos pungens* contra *C. albicans* (ATCC 90029) y aislados clínicos de *Candida*.

Específicos:

- Obtener los extractos acetónicos de *Eryngium carlinae*, *Coriandrum sativum*, *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y metanólico *Arctostaphylos pungens* mediante maceración.
- Caracterización fitoquímica de los extractos de *Eryngium carlinae*, *Coriandrum sativum*, *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y *Arctostaphylos pungens* mediante reacciones colorimétricas y Cromatografía en Capa Delgada (CCD).
- Analizar la actividad antifúngica de los extractos de *Eryngium carlinae*, *Coriandrum sativum*, *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y *Arctostaphylos pungens* contra aislados clínicos de *C. albicans* (ATCC 90029).
- Analizar la actividad antifúngica de los extractos de *Eryngium carlinae*, *Coriandrum sativum*, *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y *Arctostaphylos pungens* contra aislados clínicos de *Cándida* obtenidos de pacientes infantiles.
- Determinar la acción antifúngica de los extractos de mayor resultado mediante ensayos de viabilidad celular XTT contra *C. albicans* (ATCC 90029) y un aislado clínico.
- Identificar la sensibilidad del tipo de hongo (levadura) aislado de *Candida albicans* presente en las muestras obtenidas de pacientes infantiles.

ANTECEDENTES

Candida

Las infecciones oportunistas bucales más frecuentes son causadas por levaduras del género *Candida*, un hongo dimórfico potencialmente patógeno capaz de colonizar la mucosa bucal. Al ser un hongo oportunista, su presencia no implica necesariamente infección clínica (Gaitán *et al*, 2012). Históricamente fue en el año 1839 cuando Langenbeck descubrió el microorganismo causante del *muguet* observándolo en forma de placas en las membranas mucosas de la boca y otros órganos, microorganismo que en 1923 Burkhout denominó *Candida albicans* (Figura 1) (Hernández *et al*, 2015).

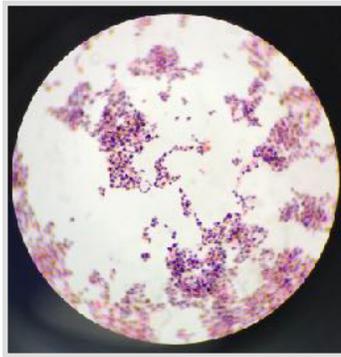


Figura 1. *Candida albicans* vista al microscopio

Candidiasis

La candidiasis es la infección fúngica más comúnmente diagnosticada en humanos, puede ser el resultado de una disfunción del sistema inmune o por resultado de un tratamiento médico local o sistémico. La candidiasis orofaríngea es, dentro de las micosis superficiales de la boca, la más importante. Su agente causante es la *Candida albicans* que se transforma de comensal a agente patógeno, convirtiéndose en un auténtico problema clínico la infección micótica oportunista llamada “candidiasis oral”. Todo esto ocurre cuando los factores predisponentes locales y generales que potencian aquella transformación están presentes y actúan (Crespo *et al*, 2005).

La candidiasis comúnmente afecta a la población infantil en la forma de candidiasis orofaríngea, intertrigo y dermatitis del pañal (Figura 2). Es sabido que la presencia de Candidiasis orofaríngea puede ser un importante factor de riesgo independiente para predecir infecciones por VIH. Las infecciones recurrentes de candida en la piel y la membrana mucosa conocida como candidiasis mucocutánea crónica, alertan al médico de una posible endocrinopatía u otra condición. (Bhai *et al*, 2014). Los niños infectados con VIH tienen alta prevalencia de lesiones bucales particularmente candidiasis oral y el grado de infección va de acuerdo con el grado de inmunosupresión. Se han aislado más de ochenta especies de *Candida*, siendo *Candida albicans* la más frecuente. (González, 2011).



Figura 2. Lesión de *Candida* en un paciente infantil

El Género *Candida* comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies micóticas. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular. Solamente una docena de las especies pertenecientes al Género *Candida* poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C. y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre. (Chilaca & Cava, 2014).

Candida albicans

C. albicans crece como levadura a 30°C y como filamentos o hifas (Figura 3) a los 37°C (Kasehm *et al*, 2015). *C. albicans* tiene amplia distribución mundial, ya que es parte de la

flora normal del aparato gastrointestinal, de la mucosa oral (31-55%) y vaginal (13% de las mujeres), así como también de la piel periorificial de individuos sanos (25-50%). *C. albicans* vive en equilibrio con otros microorganismos del cuerpo humano, coexistiendo como comensal, pero cuando este balance se pierde, se torna patógeno causando compromiso mucocutáneo (Villanueva & Arenas 2007). Puede causar desde infecciones superficiales en la piel, hasta infecciones sistémicas que pongan en riesgo la vida del paciente (Mayer *et al*, 2012).

Las infecciones del torrente sanguíneo causadas por *Candida* han aumentado en las dos últimas décadas, su mortalidad es de 29 a 50%. Estas infecciones representan un importante problema clínico-epidemiológico en las unidades de cuidados intensivos, principalmente en pacientes inmunocomprometidos. En la población pediátrica ocupan el segundo lugar en fallecimientos entre todas las causas de sepsis. En Estados Unidos, las candidemias corresponden a la tercera causa de infecciones del torrente sanguíneo, con 19 a 24 infecciones por cada 10,000 egresados, es decir, se ha observado un aumento en la incidencia de incluso 487% en las últimas dos décadas. En México, la prevalencia es de 0.71%. (Morales *et al*, 2013).

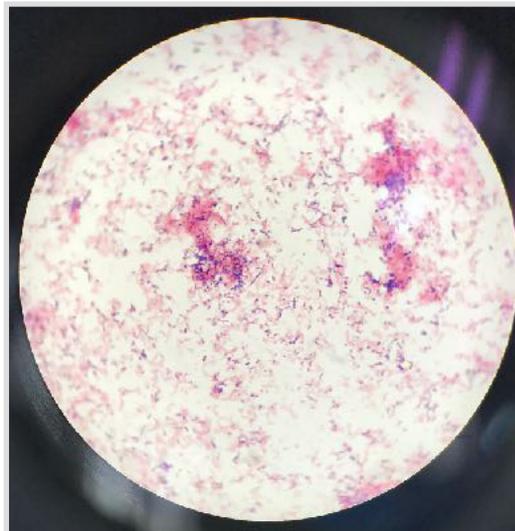


Figura 3. Hifas de *Candida albicans*

Manifestaciones clínicas

La manifestación más común es la infección pseudo-membranosa (conocida como algodoncillo), apareciendo en la mucosa como una placa color crema que se retira fácilmente y queda una superficie sangrante. La candidiasis hiperplásica es blanca, dura y no se puede remover. La candidiasis Eritematosa (Figura 4) aparece como manchas rojas en el paladar duro, paladar blando o en el dorso de la lengua (Bellón *et al*, 2004).



Figura 4. Candidiasis Eritematosa (García *et al*, 2014)

Tratamiento

La candidiasis oral es por lo general una infección localizada y la primera línea de tratamiento son los tratamientos tópicos (Muzyka *et al*, 2013). Entre los antibióticos poliénicos se encuentra la anfotericina B u la nistatina (Figura 5), los cuales han sido usados para el tratamiento de candidiasis oral, vaginal y en piel, produciendo una acción eficaz. Se presenta como pomadas, cremas, talcos, óvulos, tabletas o suspensión. La dosis es en adultos y niños: 100000 U/ml de nistatina 4 veces al día, y seguir con el medicamento 2 días después de que hayan desaparecido los síntomas (Chamba, 2015).



Figura 5. Nistatina en suspensión oral

Entre los azoles, el fluconazol ha demostrado tener una gran eficacia en el tratamiento de la candidiasis en paciente neutropénico, aunque la mayoría de los estudios no estaban diseñados específicamente para estos pacientes. El fluconazol (Figura 6) es igual de eficaz y mejor tolerado que la anfotericina B desoxicolato, que fue el tratamiento estándar de la Candidiasis oral en estos pacientes durante mucho tiempo (Aguado *et al*, 2011). Se recomienda el fluconazol (dosis de carga de 800 mg [12 mg/kg], luego 400 mg [6 mg/kg] diarios) o una equinocandina (casposfungina: dosis de carga de 70 mg, luego 50 mg diarios; micafungina: 100 mg diarios; anidulafungina: se recomienda una dosis de carga de 200 mg, luego 100 mg diarios) como terapia inicial para la mayoría de los pacientes adultos Clasificación Asa-I (A-I). El panel de expertos favorece una equinocandina en el caso de pacientes con enfermedad moderadamente grave a grave, o en el caso de pacientes con exposición reciente a azoles (A-III). El fluconazol se recomienda para pacientes con enfermedad menos crítica y que no hayan estado recientemente expuestos a azoles (A-III). Se recomienda el mismo enfoque terapéutico en niños, prestando atención a las diferencias en los regímenes de dosis (Pappas *et al*, 2009).



Figura 6. Fluconazol en cápsulas

Resistencia a los antifúngicos

En los últimos años, se aíslan cada vez con mayor frecuencia, cepas de levaduras con susceptibilidad disminuida o resistentes a los antifúngicos (Febré *et al*, 1999). La resistencia a antifúngicos puede ser clínica o *in vitro*, siendo la primera, consecuencia fundamental del bajo nivel del fármaco en el tejido y/o sangre, debido a una interacción entre fármacos o al severo grado de inmunodepresión del paciente. La resistencia *in vitro* puede ser primaria,

donde la levadura es naturalmente resistente, siendo el mejor ejemplo la resistencia intrínseca que presenta *C. krusei* frente a fluconazol. También puede ser secundaria, donde cepas susceptibles se transforman en organismos resistentes debido al contacto previo con el antimicótico. Este último tipo de resistencia, inusual en el pasado, es hoy el más frecuente y se observa principalmente en cepas de *C. glabrata*. El consenso es que la resistencia antifúngica depende de la interacción entre el huésped, el fármaco y el hongo; sin embargo, los factores del paciente son con frecuencia los más relevantes para definir resistencia (Silva *et al*, 2002).

Alternativas naturales

Entre los productos obtenidos de las plantas podemos mencionar los extractos etanólicos, los cuales tienen un marcado efecto fungitóxico sobre diversos patosistemas (García & Pérez, 2009), así como los aceites esenciales, que son una compleja mezcla de compuestos químicos sensibles al oxígeno, la luz y las altas temperaturas (Dima *et al*, 2015), los cuales contienen metabolitos que se ha demostrado son los responsables de la diferente actividad. Por mucho tiempo se consideró que los compuestos derivados del metabolismo secundario eran sustancias de desecho sin función fisiológica definida. El efecto fungitóxico es debido a la participación de metabolitos secundarios en las interacciones entre las plantas y factores bióticos, resultando en la inhibición del crecimiento de otros organismos vegetales (Infante, 2015).

Actualmente se ha indagado en esta línea de investigación ya que los productos naturales derivados de plantas medicinales tienen una fuente abundante de compuestos biológicamente activos, muchos de los cuales han sido las bases para el desarrollo de nuevos químicos farmacéuticos y son considerados como buenas alternativas para el tratamiento (Figura 7) (Ramakrishna *et al*, 2011). El conocimiento etnobotánico es fuertemente vinculado al aspecto cultural y constituye un indicador particular de la respuesta de la población para encontrar cura a ciertas enfermedades. En los últimos años el uso de agentes

de origen natural se ha incrementado por ser más accesibles, beneficiosos y eficaces en numerosas patologías comunes en la cavidad bucal. Trabajos recientes han reportado que ciertos metabolitos tienen actividad farmacológica para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, dermatológicas, neurales y cardiovasculares, así como de cáncer y diabetes, entre otros (Esquivel *et al* 2013, Saavedra *et al*, 2015).



Figura 7. Plantas utilizadas como alternativas farmacéuticas

Propiedades de las plantas

Se han determinado múltiples propiedades de las plantas como: antiinflamatorias, antihistamínicas, cicatrizantes, analgésicas y beneficiosas para el buen funcionamiento del sistema digestivo (Rodríguez *et al* 2011). Entre los que se puede mencionar el extracto etanólico de *Psidium acutangulum*, el cual ha mostrado una buena actividad antifúngica *in vitro* frente a diversos hongos patógenos humanos (Wen *et al*, 2011). Por otro lado, se encontró que *Lantana camara* inhibió el crecimiento de *C. dublinensis* y *C. albicans*, tanto para la cepa de referencia como para el aislamiento primario, y otra que inhibió *C. Guillermondii* (Pardo *et al*, 2011).

A diferencia de las técnicas tradicionales, la extracción con fluidos supercríticos (EFS) permite obtener extractos libres de solventes, manteniendo las propiedades organolépticas del material vegetal de partida, sin ocasionar contaminación sobre el medio ambiente (Reyes *et al.*, 2011).

MARCO DE REFERENCIA

Extractos vegetales

Los extractos vegetales (Figura 8) constituyen una alternativa terapéutica a los medicamentos de síntesis en el tratamiento de muchas enfermedades. En la medicina tradicional herbolaria se ha comprobado experimentalmente que la *Calendula officinalis L.* presenta acciones farmacológicas como colerética, antiulcerosa, hipoglicemiante, y en la piel y las mucosas, es antibacteriana y antiinflamatoria (Milián Vazquez, 2011).



Figura 8. Extractos vegetales

En los extractos alcohólicos, los aceites esenciales y los compuestos de naturaleza sulfúrica aislados de los bulbos del ajo (*Allium sativum*) han demostrado un importante efecto antimicótico, atribuido a los componentes activos alicina y ajoeno, sobre especies de los géneros *Candida*, *Malassezia*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*, así como contra especies de dermatofitos y el hongo *Paracoccidioides brasiliensis* (Rodríguez *et al*, 2011).

Eryngium carlinae

El *Eryngium carlinae* (Figura 9) es conocido comúnmente como “Hierba del sapo” y es utilizado en la medicina tradicional para tratar diferentes enfermedades. Es una hierba común que crece abundantemente en México. Esta planta se utiliza en la medicina

tradicional para el tratamiento de disenteria, para aftas, como antidiarréico y como antiséptico en varias enfermedades dermatológicas (Gitiérrez & Solis 2006). Decocciones de las partes aéreas de la planta se utilizan para tratar tos, indigestión, enfermedades de la próstata, desorden de lípidos y diabetes. Se le han atribuido propiedades curativas y diabéticas a extractos de la planta. (Noriega *et al*, 2012).



Figura 9. *Eryngium carlinae* (Hierba del sapo)

Coriander Sativum

El cilantro bolita (*Coriander sativum*) (Figura 10) es una hierba anual de la familia *Apiaceae*, la cual se dispersa en el mediterráneo y las regiones del medio este. El aceite esencial de esta planta se ha utilizado en productos alimenticios, perfumes, cosméticos y la industria farmacéutica por su sabor y olor (Sourmaghi *et al*, 2015). El aceite esencial del cilantro se extrae de los frutos vía hidrodestilación de entre 180 y 240 minutos, sin embargo se ha encontrado que 40 minutos son suficientes para maximizar el rendimiento del aceite esencial, no obstante se puede utilizar diferente tiempo para obtener el aceite esencial con distinta composición. Su capacidad antioxidante se afecta, entre 20 y 240 minutos se obtiene la mayor actividad antioxidante (Zheljzakov *et al*, 2015). El aceite esencial de *C. sativum* ha probado tener un fuerte efecto antifúngico contra especies de *Candida*. Los componentes principales del aceite esencial son alcoholes y aldehídos (De Almeida *et al* 2014). Se han

realizado estudios que han proporcionado soporte científico para el posible uso seguro del aceite esencial de *Coriander sativum* contra *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* en infecciones vaginales en alternativa al tratamiento ginecológico (Bogavac *et al*, 2015).



Figura 10. *Coriander sativum* (Cilantro bolita)

Illicium verum

Los componentes activos principales del anís estrella (*Illicium verum*) (Figura 11) son el abundante aceite esencial (5%- 8%), anetol (80-90%), trananetol, monoterpenos, aldehídos y cetonas anísicas, estragol, safrol, ácidos grasos, flavonoides y taninos (Ize-Ludlow *et al*, 2004). El anís estrella tiene efectos farmacológicos como expectorante y antiespasmódico para el tracto gastrointestinal. Los aceites esenciales y los flavonoides actúan sobre el músculo liso del tracto gastrointestinal y sobre la mucosa del tracto respiratorio. El aceite esencial determina la acción aperitiva, carminativa, eupéptica, espasmolítico, antiséptica, antidiarreica, expectorante, emenagoga y galactogena. Se usa bastante como corrector organoléptico de olor y sabor. En uso externo es parasiticida (Brandstrup *et al*, 2002). Se han identificado cuatro nuevos componentes antimicrobianos de la planta medicinal *Illicium verum* y se ha juzgado su eficacia antibacteriana. Los extractos etanólicos y con CO₂ supercrítico han demostrado actividad antibacteriana sustancial contra sesenta y siete aislados clínicos resistentes a fármacos. Ambas fracciones revelaron actividad antibacteriana, por lo

que dichos extractos podrán ser utilizados en un futuro para la fabricación de fármacos antibióticos (Yang *et al*, 2010).



Figura 11. *Illicium verum* (Anís estrella)

Hippocratea excelsa

Los extractos de la cancerina (Figura 12) (*Hippocratea excelsa*) poseen gran actividad antibacteriana ante enteropatógenos. En general los extractos metanólicos han tenido mayor actividad que los extractos acuosos (Alanís *et al*, 2005). De igual manera, estos mismos extractos han mostrado actividad gastroprotectora en estudios de úlceras en ratas (Navarrete *et al*, 2002). En diversos estudios con animales se ha examinado el efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de *Hippocratea excelsa*, el cual ha presentado efectividad en la fase exudativa-proliferativa y fases crónicas de la inflamación (Pérez *et al*, 1995).



Figura 12. *Hippocratea excelsa* (Cancerina)

Elettaria cardamomum

Estudios *in vitro* han demostrado el efecto antiinflamatorio y los efectos inmunomoduladores del cardamomo. La administración oral del extracto de Cardamomo (*Elettaria cardamomum*) (Figura 13) ha reducido significativamente colesterol, lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y triglicéridos en ratas de laboratorio. El cardamomo en dosis de 3g, dividido en dos porciones por día, después de 3 meses, redujo la presión sistólica, diastólica y la presión sanguínea, incrementó la actividad fibrinolítica y aumentó los antioxidantes en un estudio de pacientes recién diagnosticados con hipertensión primaria. (Nitasha *et al*, 2015). El cardamomo ha demostrado tener un potencial químico protector contra el cáncer de piel químicamente inducida en ratas de laboratorio y una disminución significativa de la peroxidación de lípidos a nivel del hígado. El extracto del cardamomo aumenta significativamente la actividad citotóxica de las células natural killer (NK), indicando su potencial anticáncer (Kumari & Dutta, 2013). Se ha conocido que el cardamomo es una fuente de agentes antimicrobianos que actúan en la caries dental y la enfermedad periodontal asociadas a bacterias Gram positivas y Gram negativas (Al-Sohaibani *et al*, 2011).



Figura 13. *Elettaria cardamomum* (Cardamomo)

Arctostaphylos pungens

Arctostaphylos pungens también conocida como pingüica (Figura 14) es una especie de arbusto originaria de México que se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta los estados de Veracruz y Oaxaca, México. Esta planta se encuentra en todas las zonas montañosas desarrollándose entre los 1375 a 3230 m.s.n.m. (Moreno *et al*, 2015). Sus frutas se pueden comer crudas o cocinadas. También se pueden secar y moler para utilizarla como condimento. Las hojas se utilizan en el tratamiento de la diarrea y para mitigar el ardor y comezón causado por la hiedra venenosa. De las hojas y las frutas también se elabora un té utilizado para tratar la bronquitis y problemas del tracto urinario (Moreno *et al*, 2014).



Figura 14. *Arctostaphylos pungens* (Pingüica)

Ensayo de viabilidad celular XTT

Es un ensayo colorimétrico semicuantitativo que mide la actividad mitocondrial del metabolismo de la célula activa. Se basa en la capacidad mitocondrial del succinato deshidrogenasa para reducir la sal amarilla XTT 2,3-bis-(2-methoxi-4-nitro-5- sulfofenil)-5-(fenilamin-carbonil -2H-tetrazol hidróxido) a un formazan color naranja soluble en agua (Buozi *et al*, 2016). Las alteraciones colorimétricas resultantes de la reacción entre las

células y la sal XTT se miden espectrofotométricamente (Figura. 15) y es proporcional al número de células activas metabólicamente (Honraet *et al*, 2005).

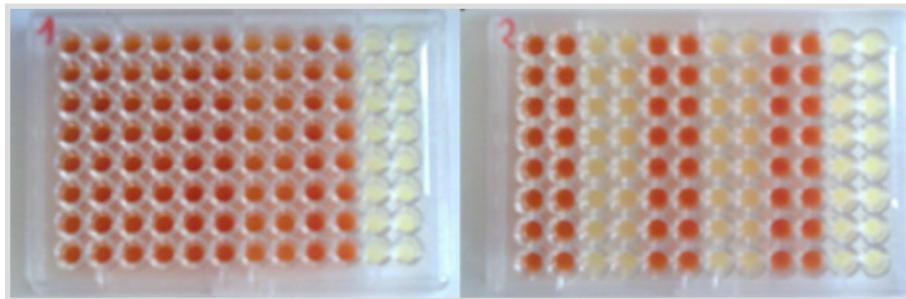


Figura 15. Ensayo de Viabilidad Celular XTT (Moravský *et al*, 2015)

METODOLOGÍA

Obtención del extracto de las plantas Eryngium carlinae, Coriandrum sativum, Illicium verum, Hippocratea excelsa, Elettaria cardamomum y Arctostaphylos pungens

Las partes utilizadas de las plantas fueron las partes aéreas de *Eryngium Carlinae*, los frutos de *Coriandrum sativum*, *Illicium verum* y *Arctostaphylos pungens* y la corteza de *Hippocratea excelsa* y *Elettaria cardamomum*, adquiridas en lugares certificados para su venta.

Se adquirieron 100g de cada planta, los cuales fueron triturados en un molino para disminuir el tamaño de partícula, posteriormente se obtuvieron los extractos con acetona de *Eryngium carlinae*, *Coriandrum sativum*, *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa* y *Elettaria cardamomum*, mientras que para *Arctostaphylos pungens*, fue obtenido con metanol, en las concentraciones mencionadas en la Tabla 1.

Tabla 1. Relación material vegetal/solvente para obtención de extractos

Nombre científico	Gramos de material vegetal (g)	Volumen de solvente 1er filtrado (mL)	Volumen de solvente 2do filtrado (mL)
<i>Eryngium carlinae</i>	100.119	600	400
<i>Illicium verum</i>	100.102	300	200
<i>Hippocratea excelsa</i>	100.017	400	200
<i>Coriandrum sativum</i>	100.045	300	200
<i>Elettaria cardamomum</i>	100.006	400	200
<i>Arctostaphylos pungens</i>	90.475	300	200

g= gramos, mL= mililitros

Una vez colocado el material vegetal en el solvente, se cubrió el matraz con papel aluminio y se dejó reposar durante 24 horas para después realizar una filtración transcurridas las 24 horas y repitiendo el proceso a las 48 horas. La filtración se realizó con papel filtro poro

calibre 1mm previamente humedecido con agua destilada, colocándolo en un embudo para obtener el volumen final del rendimiento del extracto.

Se utilizó el rotavapor para realizar la evaporación del solvente. El agua de la base del rotavapor se encontraba a 48° centígrados, sobre la cual se encontraba girando un matraz bola con la mezcla durante 7 minutos, provocando la evaporación de la acetona y obteniendo después de su condensación mediante un serpentín refrigerante la acetona de recuperación, así como el metanol (Figura 16).



Figura 16. Rotavapor para la obtención de extractos

Los extractos se dejaron reposar durante 1 semana en un recipiente de vidrio cubierto con papel aluminio para realizar la evaporación final del solvente (Figura 17).



Figura 17. Obtención de extractos

a) Plantas antes y después de ser trituradas, b) Plantas con el solvente para el primer filtrado, c) Plantas con el solvente para el segundo filtrado, d) Extracto obtenido.

Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de Eryngium carlinae, Coriandrum sativum, Illicium verum, Hippocratea excelsa, Elettaria cardamomum y Arctostaphylos pungens contra C. albicans (ATCC 90029)

Para evaluar la actividad antifúngica del extracto se activó la cepa *C. albicans* (ATCC 90029) se tomó una muestra de cada extracto y se realizaron diluciones de 100 mG de extracto con 2mL de DMSO (Figura 18).

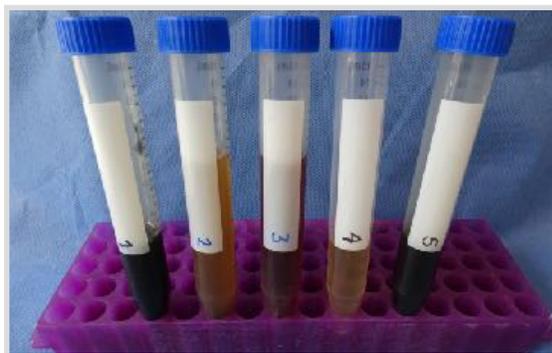


Figura 18. Diluciones con DMSO

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Los estudios experimentales *in vitro* se realizaron empleando la cepa de laboratorio *C. albicans* (ATCC 90029) proporcionadas por el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Odontología de la UANL. Fueron activadas en medio de cultivo agar Tripticaseína de Soya y Sabouraud estéril y después incubados a 37° Centígrados durante 24 horas.

Prueba contra C. albicans (ATCC 90029) en pozo

En cajas de petri con agar Sabouraud se sembró *Candida albicans* (ATCC 900-29) en forma de estría cerrada. Se realizaron 3 pozos de 5mm de diámetro en donde se colocaron 30 µL de extracto en cada uno y se colocaron en la incubadora durante 24 horas (Figura 19).

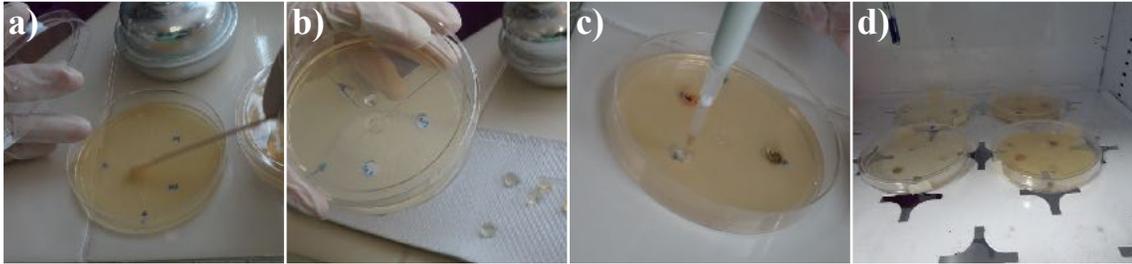


Figura 19. Siembra de *Candida albicans* (ATCC 900-29) en cajas petri.
 a) Siembra de *Candida albicans*, b) Realización de pozos, c) Adición de extracto, d) Colocación en la incubadora.

Obtención de aislados clínicos de muestras de saliva de pacientes infantiles

Los aislados clínicos fueron obtenidos de dos muestras diferentes, la muestra I de pacientes entre los 6 y 10 años que acudieron a consulta en la clínica de Odontología infantil pregrado, de la Facultad de Odontología de la UANL y la muestra II de pacientes entre los 3 y 9 años alumnos del Colegio “Gregorio Torres Quintero” ubicado en el municipio de Cadereyta Jiménez, Nuevo León. A los padres se les explico el procedimiento que se realizaría en sus hijos, y a los que accedieron se les entregó un consentimiento informado (Anexo 1) en el cual aceptaban la participación del paciente en la toma de muestra. Las muestras se tomaron considerando las siguientes variables: edad, género y enfermedades sistémicas de cada participante, los cuales se escribieron en la hoja de captura de datos (Anexo 2). La toma de muestra consistió en tomar una muestra de saliva del dorso de la lengua de los pacientes con un hisópo estéril. Inmediatamente después de la toma se abrió el tubo de ensayo con medio de cultivo de Sabouraud estéril, se flameó la boca del tubo, se introdujo el hisópo con la muestra, y se dejó incubar a 37° centígrados por una semana (Figura 20).

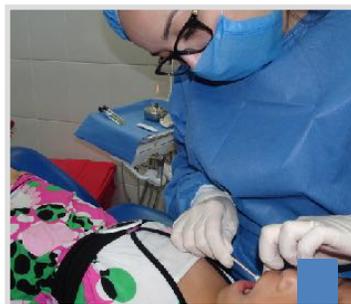


Figura 20. Obtención de muestras

Frotis y tinción de las muestras de aislados clínicos

Se realizó un frotis con cada una de las muestras para analizarlos al microscopio. Con un asa se tomaron 3 gotas del contenido del tubo de ensayo con el hisopo y se colocaron en un portaobjetos de vidrio. Se fijó la muestra con fuego y se procedió a la tinción de Gram. Se colocaron 3 gotas de cristal violeta y se dejaron actuar por 1 minuto y se enjuagó con gotas de agua por arrastre. Se colocaron 3 gotas de yodo lugol y se dejaron actuar por 1 minuto y se enjuagó con gotas de agua por arrastre. Se colocaron tres gotas de cristal violeta y se dejaron actuar por un minuto, realizando posteriormente el enjuague con agua por arrastre, se procedió a colocar tres gotas de yodo lugol y se dejaron actuar por un minuto y se enjuagó de la misma forma, luego se colocó sobre la muestra tres gotas de alcohol acetona y se dejaron actuar por tres segundos y se enjuagó. Finalmente, se colocó tres gotas de safranina y se dejaron actuar por un minuto y se enjuagó con gotas de agua por arrastre y se secó cada muestra con papel filtro y se observaron al microscopio (Figura 21).

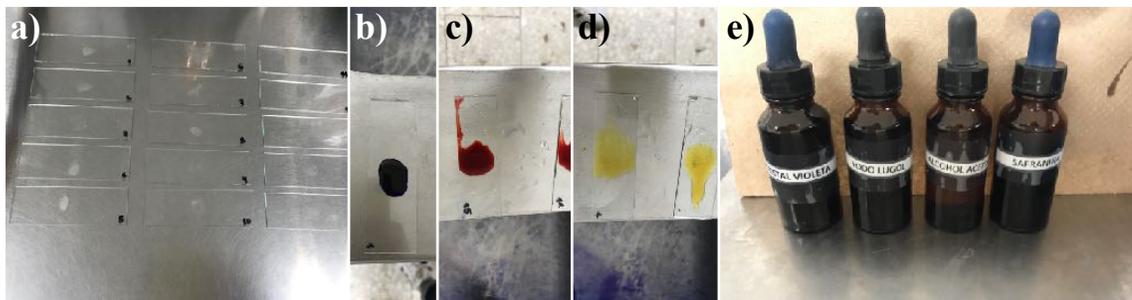


Figura 21. Frotis y tinción de las muestras.

a) Frotis, b) Colocación de cristal violeta, c) Colocación de yodo lugol, d) Colocación de safranina, e) Reactivos utilizados para la tinción de Gram

ChromAgar para diferenciar la cepa de Candida presente

Se realizó la siembra de cada uno de los inóculos obtenidos de cada paciente, sobre medio de cultivo selectivo y de diferenciación para el aislamiento de hongos, Chromagar estéril en forma de estría cerrada. Se dejaron incubar las muestras por 48 horas y se observó posteriormente el crecimiento de las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y otras

especies, ya que se presentan reacciones colorimétricas diferentes para cada colonia, lo que permitió la detección directa de estas especies de levaduras en la placa de aislamiento.

Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de Eryngium carlinae, Coriandrum sativum, Illicium verum, Hippocratea excelsa, Elettaria cardamomum y Arctostaphylos pungens contra aislados clínicos de Candida

Preparación de muestras a utilizar

Se preparó caldo Sabouraud para inocular las especies a utilizar de las pruebas positivas de las muestras I y II. Se agregaron 2 mL de caldo Sabouraud en cada tubo de ensayo y se esterilizó a 121° centígrados durante 45 minutos.

Se sembró el contenido de las cajas petri con Chromagar positivas con un asa estéril en el caldo de Sabouraud y se dejaron incubar durante 24 horas (Figura 22).

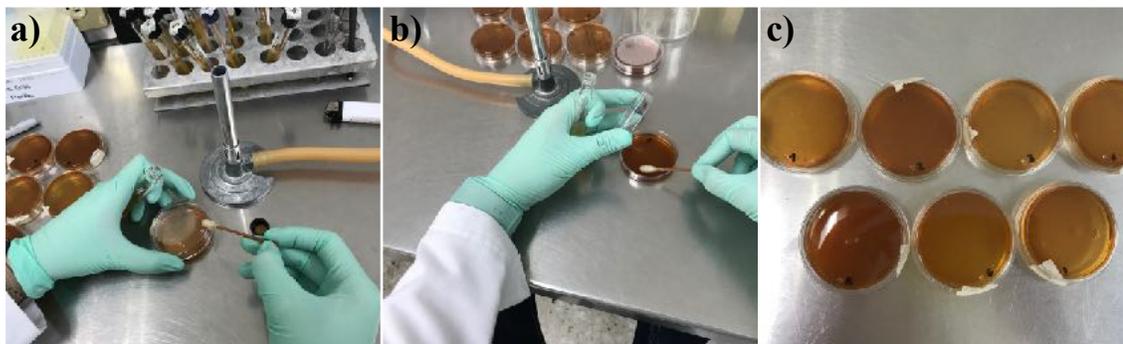


Figura 22. Siembra de los aislados clínicos en cajas petri con ChromAgar.
a) y b) Siembra de aislados clínicos, c) Cajas listas para incubarse

Prueba contra aislados clínicos de Candida en pozo

En cada una de las 6 cajas de petri con agar Sabouraud se sembraron con un hisópo estéril la especie 13 de la muestra I y las especies 3 y 10 de la muestra II en forma de estría cerrada (Figura 23).

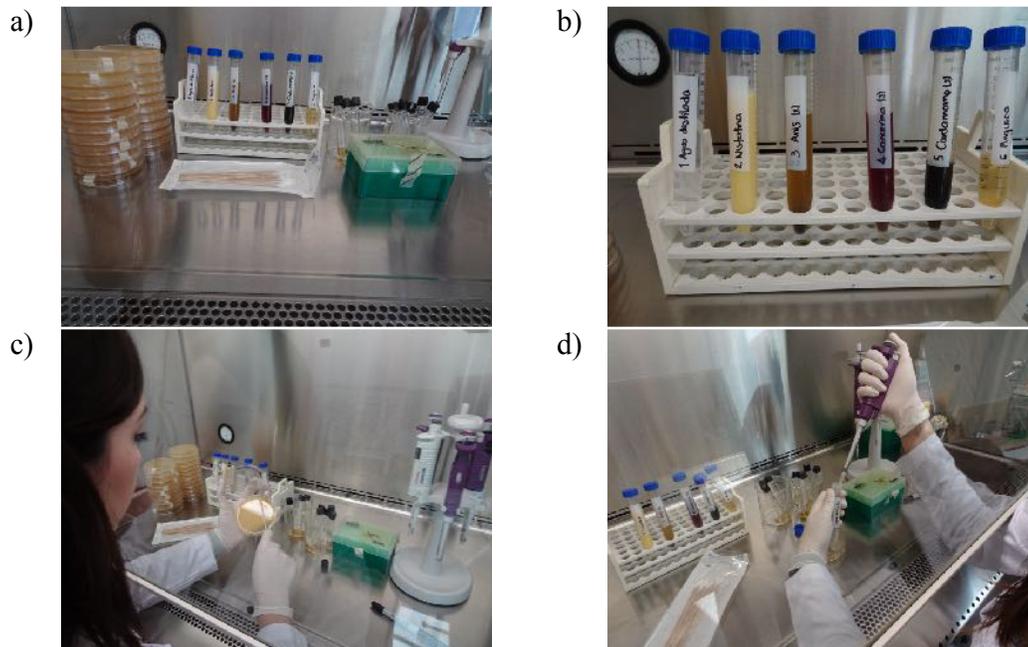


Figura 23. Siembra de los aislados clínicos.

- a) Material a utilizar, b) Extractos diluidos, control positivo y negativo, c) Siembra de los aislados, d) Colocación de los extractos en los pozos

Se realizaron tres pozos de 5mm de diámetro en donde se colocaron 30 μ L de Agua destilada, Nistatina, *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y *Arctostaphylos pungens* en triplicado por caja y se colocaron en la incubadora durante 24 horas, distribuidas de acuerdo a las tablas 2, 3 y 4.

Tabla 2. Distribución de Extracto/ Especie de *Candida* “Otras especies”

Caja	Extracto	Especie de <i>Candida</i>
1A	Agua destilada	Otras especies (Blanco, especie 3, muestra I)
2A	Nistatina	
3A	<i>Illicium verum</i>	
4A	<i>Hippocratea excelsa</i>	
5A	<i>Elettaria cardamomum</i>	
6A	<i>Arctostaphylos pungens</i>	

Tabla 3. Distribución de Extracto/ Especie de Candida “C. albicans”

Caja	Extracto	Especie de <i>Candida</i>
1B	Agua destilada	<i>C. albicans</i> (Verde, especie 10, muestra II)
2B	Nistatina	
3B	<i>Illicium verum</i>	
4B	<i>Hippocratea excelsa</i>	
5B	<i>Elettaria cardamomum</i>	
6B	<i>Arctostaphylos pungens</i>	

Tabla 4. Distribución de Extracto/ Especie de Candida “C. Krusei”

Caja	Extracto	Especie de <i>Candida</i>
1C	Agua destilada	<i>C. krusei</i> (rosa, especie 13, muestra II)
2C	Nistatina	
3C	<i>Illicium verum</i>	
4C	<i>Hippocratea excelsa</i>	
5C	<i>Elettaria cardamomum</i>	
6C	<i>Arctostaphylos pungens</i>	

Determinación del efecto antifúngico de los extractos empleando ensayos de viabilidad celular XTT

Para llevar a cabo el ensayo antifungico, se colocó en una placa de cultivo con 96 pozos, 1×10^4 células de *Candida albicans* (ATCC 90029) y *C. krusei* por pozo. Posteriormente, fueron colocados los extractos de *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y *Arctostaphylos pungens* en dilución seriada (1:2-1:64). Como control positivo se utilizó Amfotericina B (AmB) a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como control positivo fue el crecimiento normal de *C. albicans* y *C. krusei* sin ningún tratamiento. El volumen final del medio de cultivo en cada pozo fue de 100 μl . Después, la placa fue incubada por 18 horas a 37 grados centígrados. Posteriormente, se preparó la solución XTT antes de usarse de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Primero, se agregaron de

25µl de la solución activa de XTT en cada pozo y después, se incubó la placa por 4 horas. Finalmente, se cuantificó la absorbancia en una lectora de placas de ELISA (BioTek) una longitud de onda de 490 nm.

RESULTADOS.

Obtención y caracterización fitoquímica de los extractos de Eryngium carlinae, Coriandrum sativum, Illicium verum, Hippocratea excelsa, Elettaria cardamomum y Arctostaphylos pungens

Se realizaron doce pruebas químicas para analizar los extractos de *Eryngium carlinae*, *Coriandrum sativum*, *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y *Arctostaphylos pungens* (Figura 24) (Tabla 5).

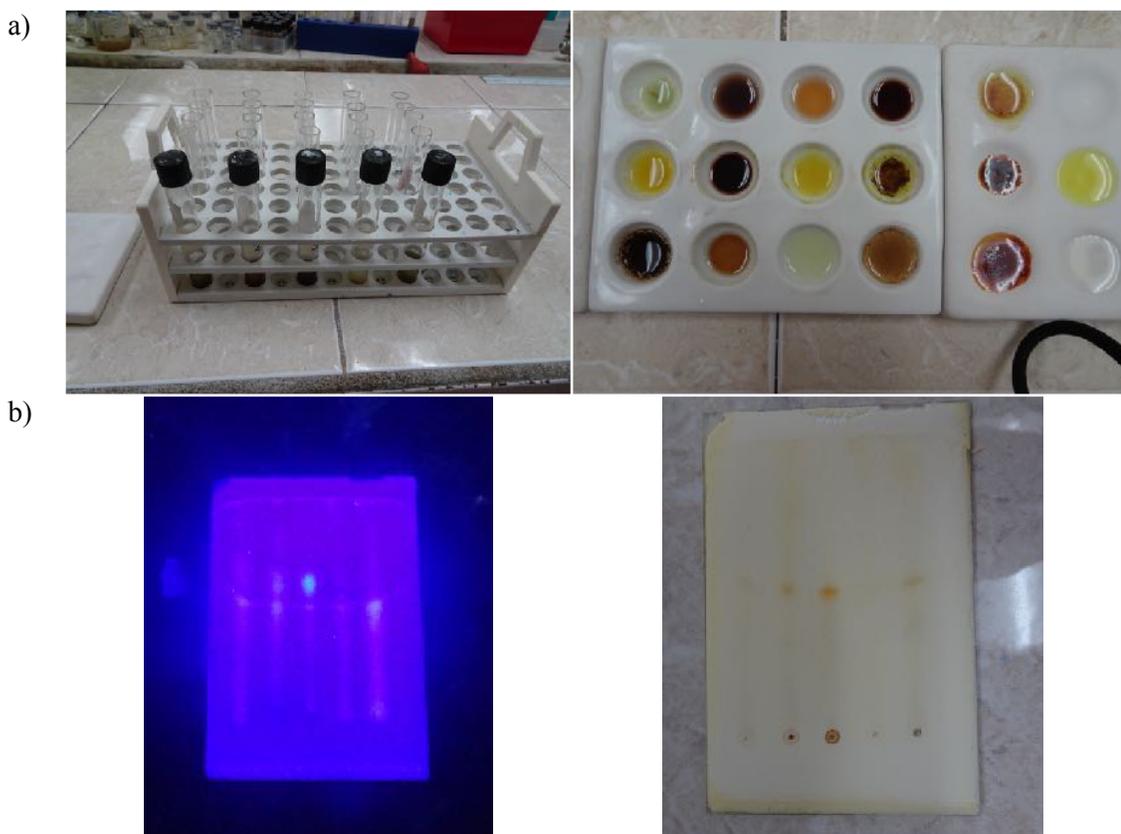


Figura 24. Pruebas químicas realizadas.

- a) Pruebas colorimétricas positivas a grupos carbohidratos, carbonilos y cumarinas,
b) Cromatografía de Capa delgada con fracciones de tonalidad rojiza y verdosa, que corresponde a los grupos identificados

Tabla 5. Pruebas químicas realizadas para los extractos.

Pruebas Químicas	<i>Eryngium carlinae</i>	<i>Illicium verum</i>	<i>Hippocratea excelsa</i>	<i>Coriandrum sativum</i>	<i>Elettaria cardamomum</i>	<i>Arctostaphylos pungens</i>
KMnO₄ (Insaturación)	-	+	+	+	+	+
2-4 DNFH (Grupos carbonilos)	-	+	+	-	+	-
Lieberman Burchard (Triterpenos y esteroides)	+	+	+	-	+	+
NaOH 10% + HCl (Cumarinas)	+	-	-	+	+	+
Baljet (Sesquiterpenlactonas)	-	-	-	-	-	+
H₂SO₄ (Quinonas)	-	+	+	-	+	-
NaHCO₃ (Carboxilo)	+	+	+	+	+	+
FeCl₃ en OH fenólico 5% (Taninos)	+	+	+	-	-	+
Shinoda (Flavonoides)	+	+	-	-	-	+
Antrona (Carbohidratos)	+	+	+	+	+	-
Saponinas	-	-	+	-	-	+
Dragendorff (Alcaloides)	-	-	+	-	-	-

Reacción positiva a presencia de grupo analizado = (+), Reacción negativa a presencia de grupo analizado = (-).

Obtención de los extractos acetónicos de Hippocratea excelsa, Eryngium carlinae, Coriandrum sativum, Illicium verum y Elettaria cardamomum y metanólico de Arctostaphylos pungens mediante maceración.

De 100 gramos de cada planta se obtuvieron los extractos acetónicos de *Eryngium carlinae*, *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Coriandrum sativum* y *Elettaria cardamomum* y extracto metanólico de *Arctostaphylos pungens*, en el cual *Hippocratea excelsa* fue el de mayor rendimiento (Tabla 6).

Tabla 6. Rendimiento del material vegetal.

Nombre científico	Gramos de material vegetal (g)	Rendimiento (%)
<i>Eryngium carlinae</i>	100.119	11.7
<i>Illicium verum</i>	100.102	17.8
<i>Hippocratea excelsa</i>	100.017	22.6
<i>Coriandrum sativum</i>	100.045	12.6
<i>Elettaria cardamomum</i>	100.006	13.2
<i>Arctostaphylos pungens</i>	90.475	21.0

gramos = (g), porcentaje = (%)

Determinación de la actividad antifúngica de los extractos esenciales contra aislados clínicos de C. albicans (ATCC 90029)

Se determinó que todos los extractos presentaron buena solubilidad con los solventes empleados, teniendo mayor respuesta con DMSO y acetona (tabla 7).

Tabla 7. Solubilidad de los extractos en Acetona, Etanol y DMSO.

Nombre científico	Acetona	Etanol	DMSO
<i>Eryngium carlinae</i>	+	-	+
<i>Illicium verum</i>	+	+	+
<i>Hippocratea excelsa</i>	+	+	+
<i>Coriandrum sativum</i>	+	-	+
<i>Elettaria cardamomum</i>	+	-	+
<i>Arctostaphylos pungens</i>	+	+	+

Solubilidad positiva al solvente = (+), Solubilidad negativa al solvente = (-).

Prueba contra C. albicans (ATCC 90029) en pozo

Todos los extractos inhibieron a *Candida albicans*, con mayor inhibición para *Elettaria cardamomum*, *Hippocratea excelsa*, *Arctostaphylos pungens* e *Illicium verum*, presentaron halos de inhibición promedio de 26, 19, 18 y 14mm respectivamente (Figura 25), como se muestra en la Tabla 8.



Figura 25. Halos de inhibición

Tabla 8. Halos de inhibición contra *Candida albicans* (ATCC 900-29)

Nombre científico	Medida del halo (mm)
<i>Illicium verum</i>	14
<i>Hippocratea excelsa</i>	19
<i>Elettaria cardamomum</i>	26
<i>Arctostaphylos pungens</i>	18

mm= milímetros

Obtención de aislados clínicos de muestras de saliva de pacientes infantiles

Se tomaron 15 muestras de pacientes entre los 6 y 10 años que acudieron a consulta en la clínica de Odontología infantil pregrado, de los cuales 10 fueron pacientes masculinos y 5 femeninos (Figura 26). El promedio de edad fue de 7.53 años.

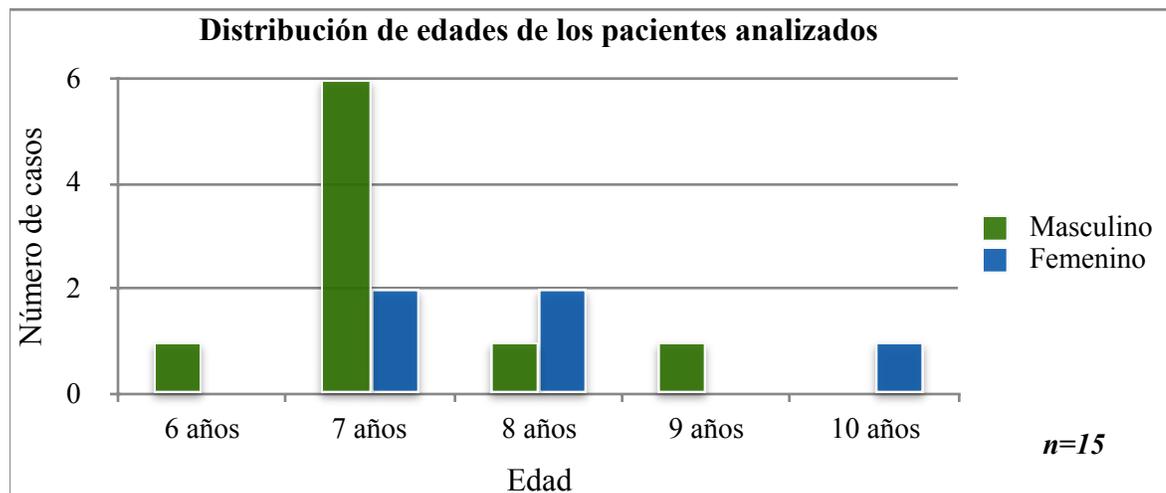


Figura 26. Distribución de muestras de acuerdo a edad y género (n=15)

ChromAgar para diferenciar la cepa de Candida presente

De las muestras I, las muestras 8, 13 y 15 mostraron crecimiento de cepas de *Candida albicans* y *Candida Krusei* (Figura 27). De acuerdo a la edad y género, las 3 muestras positivas correspondieron a pacientes de masculinos de 7 años de edad (Tabla 9), lo cual representa que el 20% de la población tuvo presencia del hongo (Figura 28).

Tabla 9. Relación de muestras I positivas con la especie encontrada

N° de muestra	Edad	Género	Color	Especie de <i>Candida</i>
8	7	M	Verde	<i>C. albicans</i>
13	7	M	Rosa	<i>C. krusei</i>
15	7	M	Rosa	<i>C. krusei</i>



Figura 27. Muestras I positivas sembradas en ChromAgar



Figura 28. Relación de muestras Negativas (*Sanos*) y Positivas (*Presencia de especie de Candida*) (*n=15*)

Frotis y tinción de las muestras de aislados clínicos

Se realizó un frotis con cada una de las muestras positivas para analizarlos al microscopio (Figura 29).

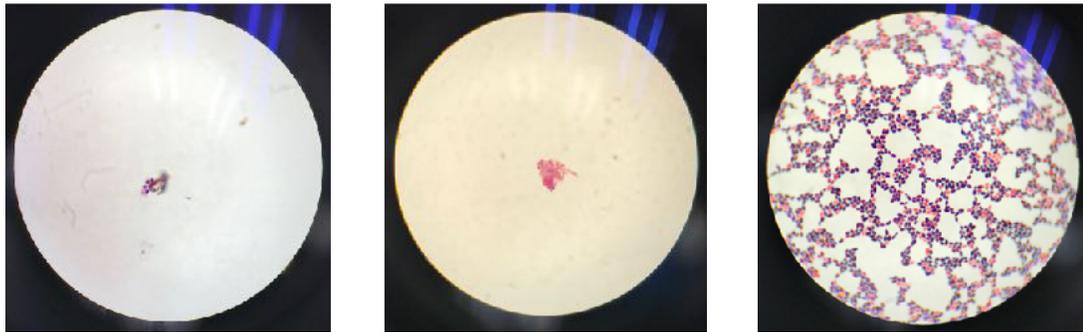


Figura 29. Muestras I positivas vistas al microscopio

Obtención de muestras II

Se tomaron 15 muestras de pacientes entre los 3 y 9 años alumnos del Colegio “Gregorio Torres Quintero” ubicado en el municipio de Cadereyta Jiménez, Nuevo León, de los cuales 8 fueron pacientes masculinos y 7 femeninos (Figura 30). El promedio de edad fue de 5.53 años.

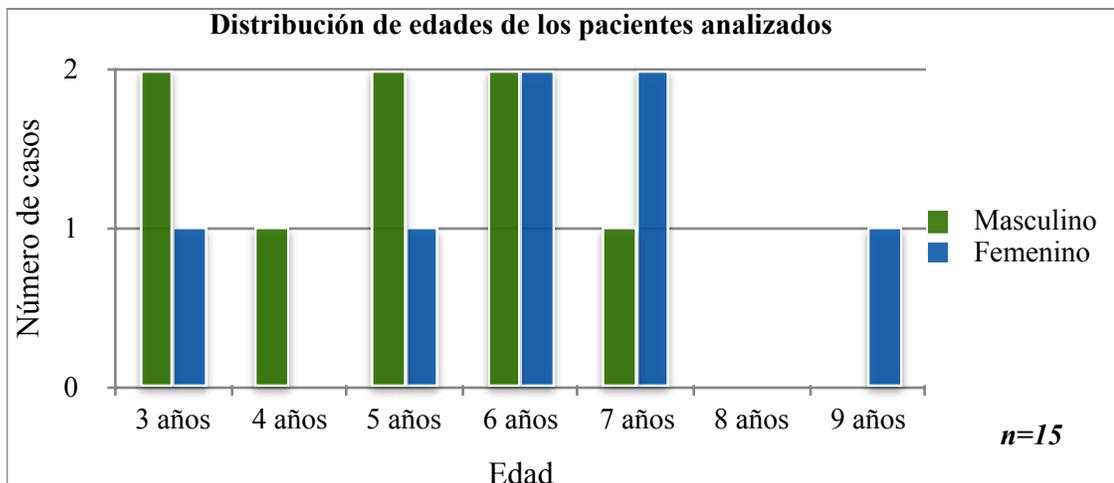


Figura 30. Distribución de muestras de acuerdo a edad y género (n=15)

ChromAgar para diferenciar la cepa de Candida presente

De las muestras II, Las muestras 3, 4, 8, 10 y 14 mostraron crecimiento de cepas de *Candida albicans*, *Candida Krusei*, así como de “otras especies de *Candida*” como se muestra en la tabla 12 (Figura 31). De acuerdo a la edad y género, las 3 muestras positivas correspondieron a 4 pacientes masculinos de 3 a 7 (Promedio de 5 años de edad) y a un paciente femenino de 6 años de edad (Tabla 10), lo cual representa que el 33% de la población tuvo presencia del hongo (Figura 32).

Tabla 10. Relación de muestras II positivas con la especie encontrada

Nº de muestra	Edad	Género	Color	Especie de <i>Candida</i>
3	6	F	Blanco	Otras especies
4	6	M	Verde	<i>C. albicans</i>
8	7	M	Rosa	<i>C. krusei</i>
10	4	M	Verde	<i>C. albicans</i>
14	3	M	Rosa	<i>C. krusei</i>

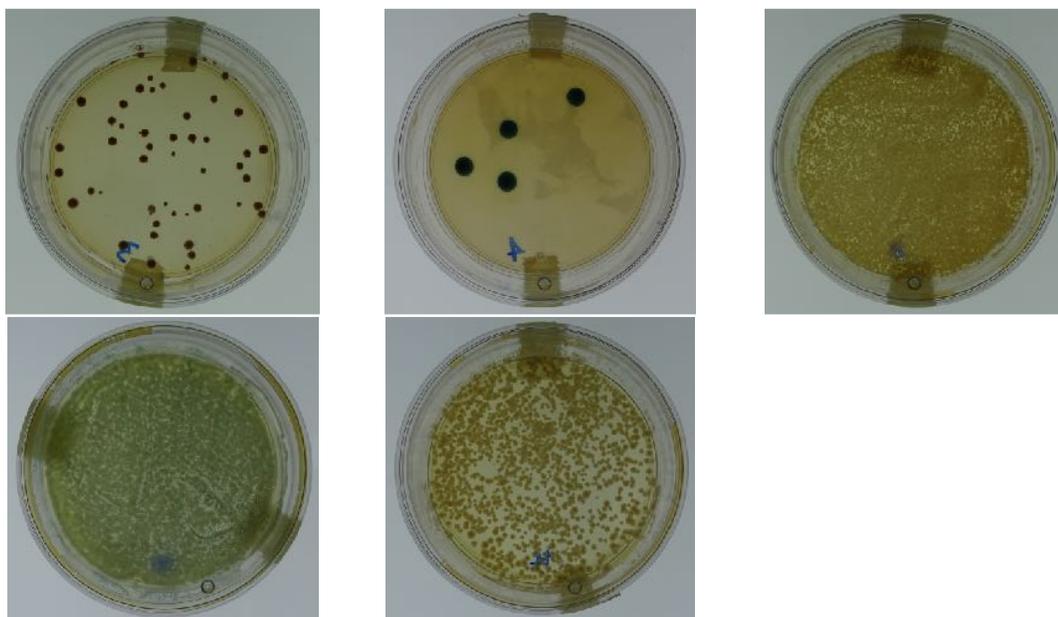


Figura 31. Muestras II positivas sembradas en ChromAgar



Figura 32. Relación de muestras Negativas (Sanos) y Positivas (Presencia de especie de *Candida*) (n=15)

Frotis y tinción de las muestras de aislados clínicos

Se realizó un frotis con cada una de las muestras II positivas para analizarlos al microscopio (Figura 33).

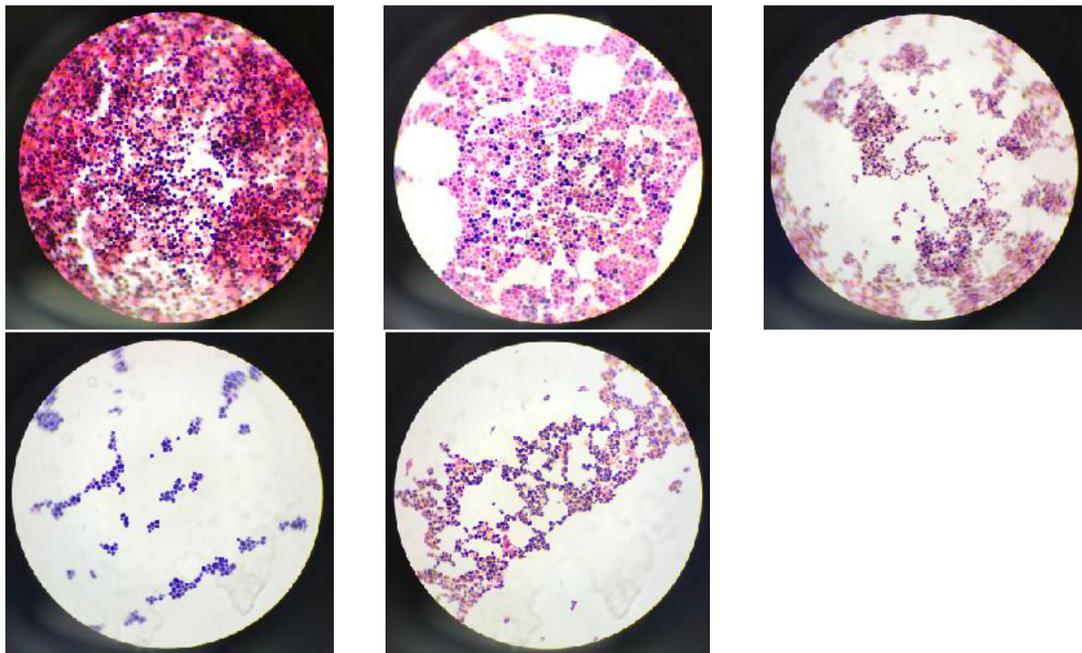


Figura 33. Muestras II positivas vistas al microscopio

Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de Eryngium carlinae, Coriandrum sativum, Illicium verum, Hippocratea excelsa, Elettaria cardamomum y Arcostaphylos pungens contra asilados clínicos de Candida

El extracto que presentó mayor efecto inhibitorio fue el de *Elettaria cardamomum*, seguido de *Arcostaphylos pungens*, *Hippocratea excelsa* y por último *Illicium verum*. Los extractos presentaron actividad antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida Krusei* y contra otras especies de *Candida*, con un halo de inhibición promedio de 30.66mm para *Elettaria cardamomum*, 20.57mm para *Arcostaphylos pungens*, 20.15mm para *Hippocratea excelsa* y 18.55mm para *Illicium verum* siendo cercanas a los de la nistatina, control positivo empleado con 29.06mm. Todas las muestras mostraron inhibición sustanciosa, como se puede notar en la tabla 11 y la figura 34.

Tabla 11. Relación especies de Candida/Extractos empleados

Extracto/ Inhibición (mm)	Especie A Otras especies				Especie B <i>C. albicans</i>				Especie C <i>C. krusei</i>				ATCC 900-29
	1	2	3	X	1	2	3	X	1	2	3	X	
<i>Illicium verum</i>	18	22	22	20.6	20	20	19	19.6	21	20	19	20	14
<i>Hippocratea excelsa</i>	16	18	18	17.3	25	26	24	25	20	19	19	19.3	19
<i>Elettaria cardamomum</i>	25	30	31	28.6	25	30	31	28.6	30	35	42	35.6	26
<i>Arcostaphylos pungens</i>	24	23	31	26	14	15	16	15	28	20	22	23.3	18
Control positivo (Nistatina)	40	45	44	43	30	29	30	29.6	44	40	44	42.6	40
Control negativo (Agua destilada)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Milímetros = mm, Promedio de inhibición = X

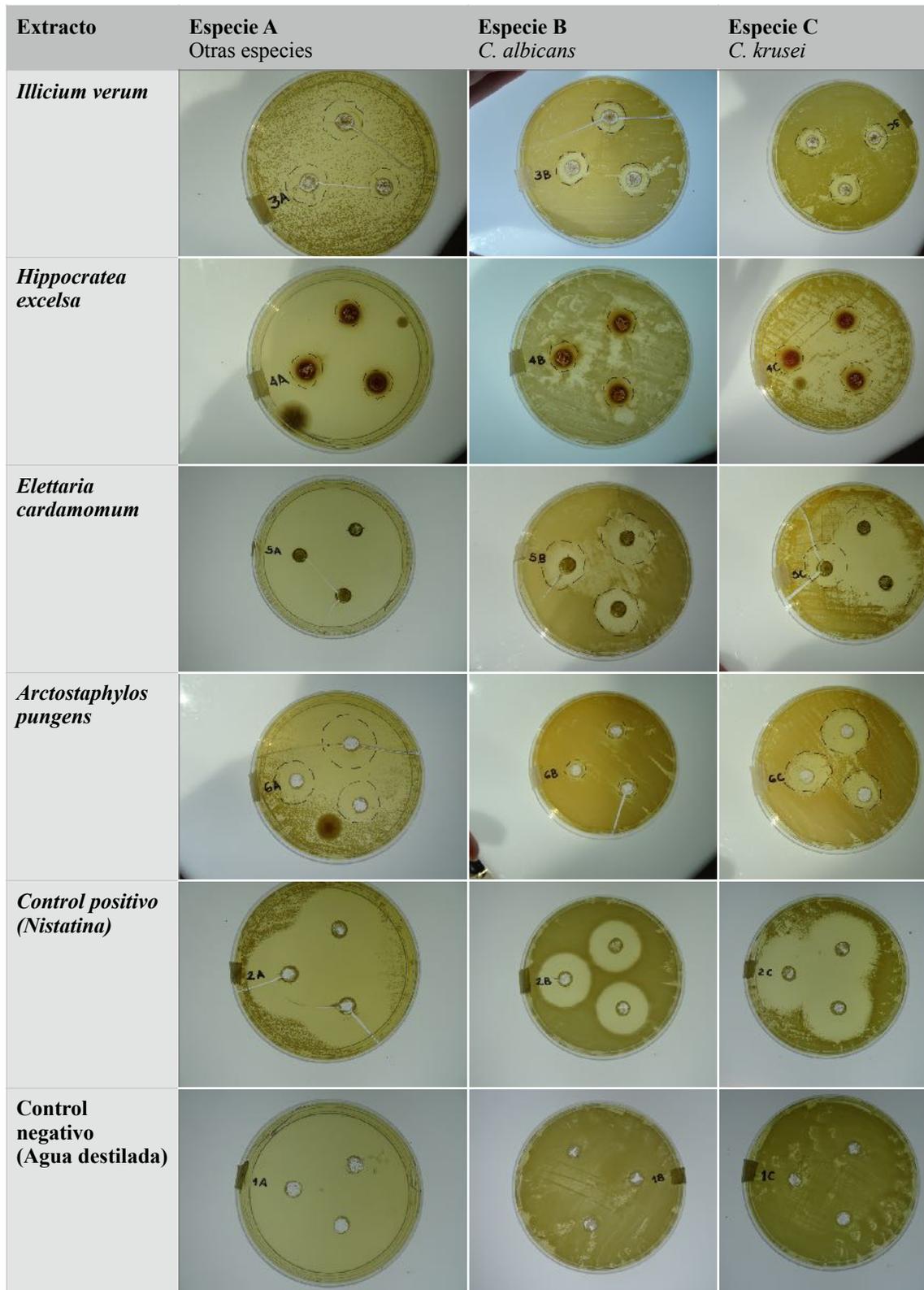


Figura 34. Actividad antifúngica de los extractos, control positivo y negativo contra los tres tipos de especies encontradas

Determinación de la actividad antifúngica de los extractos empleando ensayos de viabilidad celular XTT

Para poder indagar sobre la posible actividad antifúngica de *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y *Arctostaphylos pungens* empleamos el ensayo de viabilidad celular basado en la reducción del XTT. Los resultados obtenidos con *Candida krusei* (Figura. 35) indican que en la dilución 1:2 mostraron un 95% de efectividad, mostrando un efecto dosis dependiente en todas las demás diluciones. El ensayo con *Candida albicans* (Figura 36), los extractos mostraron un efecto similar de un 95% de efectividad antimicótica de todos los extractos excepto de *Arctostaphylos pungens* que tuvo un 81% de actividad en la dilución 1:2. De la misma forma se parecía un efecto dosis dependiente. Los datos obtenidos fueron comparados la AmB a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (control positivo) y sobre el crecimiento de *Candida krusei* (control negativo). Estos resultados sugieren fuertemente que los extractos de *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y *Arctostaphylos pungens* poseen una alta actividad antifúngica.

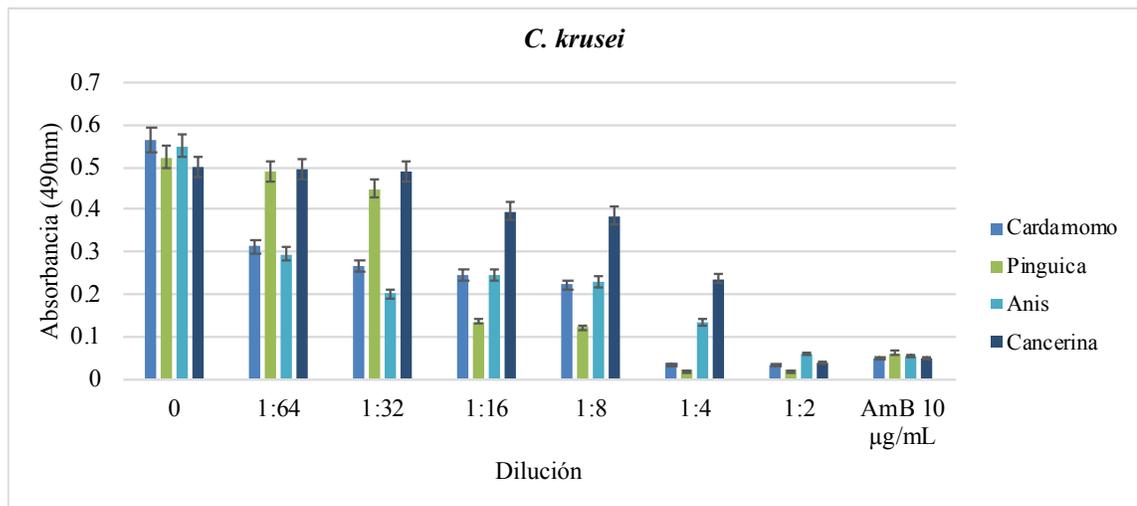


Figura 35. Ensayo de viabilidad celular XTT contra *C. Krusei*

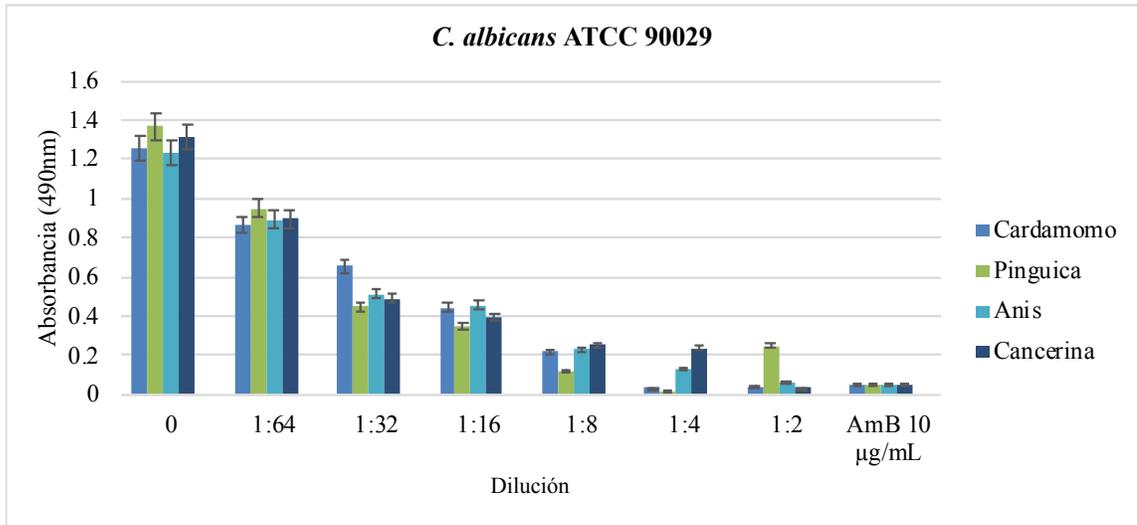


Figura 36. Ensayo de viabilidad celular XTT contra *C. albicans* (ATCC 90029)

DISCUSIÓN

Actualmente existe un alto índice de resistencia a los antifúngicos debido al uso indiscriminado de los mismos, así como de la mutación de los microorganismos causantes de enfermedades. Dentro del medicamento utilizado para tratar la candidiasis se encuentran la anfotericina B, la Nistatina y el Ketoconazol, sin embargo se han indagado nuevos productos que sustituyan su uso y sean una alternativa para el tratamiento de dichas afecciones.

Al poco tiempo de la introducción del Fluconazol en la práctica clínica (primeros años de la década de los 1990s), se empezaron a comunicar casos de candidiasis orofaríngea que no respondían al tratamiento en pacientes VIH+ que habían recibido fluconazol de forma prolongada o reiterada. La gran mayoría de los casos resistentes al tratamiento se han observado en pacientes que han recibido un tratamiento prolongado con Flucoanzol existiendo cierta controversia entre si lo que favorece la aparición de resistencia es la terapia continua o intermitente, lo cual concuerda con lo encontrado por Ceballos *et al* (1999).

Existen factores que probablemente pudieron influir sobre el rendimiento de los extractos como son: los métodos de cultivo y las condiciones geobotánicas: clima, altitud, tipo de suelo, luminosidad, pluviosidad, temperatura; método de extracción del aceite, época de recolección y edad de las plantas (Torrenegra, 2015), por lo cual puede existir una variación entre este y otros estudios.

Los resultados encontrados para la actividad antifúngica de *Illicium verum* son similares a los encontrados por Yazdani *et al* (2009), en los cuales también se probó el extracto contra *Candida albicans*.

Para el extracto acetónico de *Elettaria cardamomum* se obtuvo un halo promedio de 26mm contra *Candida albicans*, siendo mayor al estudio realizado por Aneja & Radhika (2009), quienes para la misma especie obtuvieron halos de 13.31mm

El ensayo de viabilidad celular XTT se ha usado extensivamente para la evaluación de la actividad metabólica de biofilms, incluyendo los bacterianos y los de levaduras. La

estimación metabólica utilizando XTT ofrece muchas ventajas como son el tiempo rápido de medida, la formación del formazan soluble en agua, además de ser un método no costoso que se puede efectuar en la mayoría de los laboratorios, por lo que se empleó este método obteniendo resultados similares a Wady *et al* (2012) y Buozi *et al* (2016). Se ha encontrado que el ensayo XTT es el método mas reproducible, exacto y eficiente para medir el biofilm con cepas de *Candida albicans* como mencionan Taff *et al* (2012), de tal manera se utilizó dicho método en el ensayo.

CONCLUSIÓN

Se obtuvieron exitosamente los extractos de acetónicos de *Eryngium carlinae*, *Coriandrum sativum*, *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y metanólico *Arctostaphylos pungens* mediante maceración, obteniendo resultados favorables.

La caracterización fitoquímica de los extractos correspondió con la literatura encontrada de los mismos.

Todos los extractos mostraron una excelente actividad antifúngica contra aislados clínicos de *C. albicans* (ATCC 90029), así como contra los aislados clínicos de pacientes infantiles, los cuales presentaban cepas de *C. albicans*, *C. krusei* y contra otras especies de *Candida*.

El Chromagar fue muy efectivo para identificar el tipo de cepa encontrada en los aislados clínicos de los paciente infantiles.

En cuanto al ensayo de viabilidad celular XTT se encontró que los extractos de *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Elettaria cardamomum* y *Arctostaphylos pungens* poseen una alta actividad antifúngica.

Dicho lo anterior, se aprueba la hipótesis ya que los extractos acetónicos de *Eryngium carlinae*, *Illicium verum*, *Hippocratea excelsa*, *Coriandrum sativum* y *Elettaria cardamomum* y el extracto metanólico de *Arctostaphylos pungens*, muestran propiedades favorables para atacar infecciones fúngicas causadas por especies de *Candida* por lo que se podrían utilizar como alternativa en el tratamiento de dichas afecciones.

LITERATURA CITADA

Aguado J, Ruiz I, Muñoz P, Mensa J, Almirante B, Vázquez L, Rovira M, Martín P, Moreno A, Álvarez F, León C, Madero L, Ruiz J, Fortún J, Cuenca M. Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011;29(05):345-361

Al-Sohaibani S, Murugan K, Lakshimi G, & Anandraj K. Xerophilic aflatoxigenic black tea fungi and their inhibition by *Elettaria cardamomum* and *Syzygium aromaticum* extracts. *Saudi J Biol Sci*. 2001;18(4):387-94

Alanís A, Calzada F, Cervantes J, Torres J, & Ceballos G. Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol*. 2005;100(1-2):153-7

Aneja k & Radhika J. Antimicrobial Activity of *Amomum subulatum* and *Elettaria cardamomum* Against Dental Caries Causing Microorganisms. *Ethnobotanical Leaflets* 2009;13:840-49

Bellón S, Aldama Y & Mursuli M. Tratamiento de la candidiasis oral en pacientes infectados con VIH. *Gaceta médica espiritual*. 2004;(6)3-7

Bhai N, Tendolkar U, Baradkar V, Mathur M, & Kulkarni M. Paediatric oropharyngeal and cutaneous candidiasis with special reference to *Candida dubliniensis*. *Journal of medical microbiology*, 2014;63(4),518-521

Bogavac M, Karaman M, Janjušević L, Sudji J, Radovanović B, Novaković Z, & Božin B. Alternative treatment of vaginal infections—in vitro antimicrobial and toxic effects of *Coriandrum sativum* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Journal of applied microbiology*, 2015;119(3),697-710

Brandstrup A, Vázquez P, Serrano O, Castro P, Panadero E, Rodríguez R. Anís estrellado, ¿es realmente inocuo? *Acta Pediatra (Esp)* 2002;60(1):42-44

Buozi E, Izumida F, Mussi M, Siqueira W, Habib J & Giampaolo E. Interaction between XTT assay and *Candida albicans* or *Streptococcus mutans* viability. *J Oral Health* 2016;8(1):12-16

Ceballos A, Gaitán L, Orihuela F, Lea D, Ceballos L & Quindós G. Resistencia in vitro a los antifúngicos en *Candida albicans* de pacientes infectados por el VIH con y sin candidosis oral. *Rev Iberoam Micol* 1999;16,194-197

Chamba LP. Efecto antifúngico del aceite esencial del *origanum vulgare* (orégano) y *cymbopogon citratus* (hierba luisa), sobre cepas de *Candida albicans* en comparación con la nistatina estudio invitro (Bachelor's thesis, Quito: UCE). 2015

Chávez, MGC. (2007). *Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización* (Doctoral dissertation, Tese)

Chilaca G, & Cava C. Valoración in vitro de la actividad antimicótica del extracto de *SteviaRebaudiana* contra la *Candida Albicans*, sucre 2011-2012. In *Tópicos Selectos de Química* ECORFAN 2014;368-403

Crespo M, del Pozo P, & García R. Epidemiología de la patología de la mucosa oral más frecuente en niños Epidemiology of the most common oral mucosal diseases in children. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2005;10,376-87

De Almeida I, Murata R, Furletti V, Sartoratto A, de Alencar S, Figueira G, & Rosalen P. Coriandrum sativum L.(coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on Candida spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. 2014;5;9(6):e99086

De la Torre V, Martínez M, & Resendíz J. Factores de riesgo y epidemiología de la candidemia en el Hospital Juárez de México. *Med Int Mex*, 2014;30:121-132

Dima C, Pătrașcu L, Cantaragiu A, Alexe P, & Dima Ș. The kinetics of the swelling process and the release mechanisms of Coriandrum sativum L essential oil from chitosan/alginate/inulin microcapsules. *Food Chemistry*. 2015;195:39-48

Esquivel E, Noriega R, Saavedra A, & Salgado R. Plants used in Mexican folk medicine with antidiabetic and antihypertensive properties. *Pharmacology Online*, 2013;2,15-23

Febré N, Silva V, Medeiros E, Wey S, Colombo A, & Fischman O. Microbiological characteristics of yeasts isolated from urinary tracts of intensive care unit patients undergoing urinary catheterization. *Journal of clinical microbiology*, 1999;37(5),1584-86

Gaitán L, Sánchez L, Pavia N, Muñoz R, Villegas J, & Caballos A. Candida bucal en niños mexicanos con VIH/sida, desnutrición o marginación social. *Rev Panam Salud Pública*, 2012;31(1),48-53

García A & Pérez E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*. 2009;2(3),119-145

Gutiérrez R, & Solís R. γ -Lactone isolated from methanol extract of the leaves of *Eryngium carlinae* and their antispasmodic effect on rat ileum. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2006;5(3),51-56.

González C. Lesiones frecuentes de la mucosa bucal en niños y adolescentes. *Revista ADM*, 2011;68(1),17-24

Hernández J, Ramos D, Moreno Á, Restrepo L, Giraldo B, & de Bedout C. Candidiasis oral en el recién nacido y el lactante. *Revista Colombiana Salud Libre*, 2015;10(1),45

Honraet K, Goetghebeur E & Nelis H. Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *J Microbiol Methods* 2005;63(3):287-95

Infante R, Rodriguez D, Sanabria M, Ulacio D, & Valera R. Efecto del tiempo y la temperatura de almacenamiento en la actividad de extractos etanólicos de *Lantana cámara L.* y *Heliotropium indicum L.* sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Agron*, 2015;64(4), 363-367

Ize-Ludlow D, Ragone S & Bernstein JN. Chemical composition of Chinese star anise (*Illicium verum*) and neurotoxicity in infants. *JAMA* 2004;291:562-563

León G, Fortich O, del Rosario M & Martínez SR. Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis L.* *Revista Cubana de Farmacia*, 2015;49(4),0-0

Kashem SW, Igyárto BZ, Gerami-Nejad M, Kumamoto Y, Mohammed J, Jarrett E, Drummond RA, Zurawski SM, Zurawski G, Berman J, Iwasaki A, Brown GD & Kaplan DH. *Candida albicans* Morphology and Dendritic Cell Subsets Determine T Helper Cell Differentiation. *Immunity*, 2015;42(2), 356-366

Kumari S, & Dutta A. Protective effect of *Eleteria cardamomum* (L.) Maton against Pan masala induced damage in lung of male Swiss mice. *Asian Pac J Trop Med*. 2013;6(7): 525-31

Mayer FL, Wilson D & Hube B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128

Milían P. *Calendula officinalis* L. en el tratamiento tópico de la candidiasis vaginal recurrente. *BLCPMA*, 2011;9(5)

Morales Y, Moncada D, Arroyo S, Sánchez M, Manzano P, & Arenas R. Candidemias en un hospital general de la Ciudad de México: estudio de sensibilidad a atinfungicos con el método de microplaca colorimétrica y microdilución en caldo. *Dermatol Rev Mex* 2013;57:155-158

Moravský L, Klas M, Machová E, Pisklová K & Matejcik S. Influence of a plasma jet on the viability of *Candida albicans*. *Open Chemistry*. 2015;13: 257-262

Moreno O, Groenewald JZ & Crous PW. Follicolous fungi from *Arctostaphylos pungens* in Mexico. *IMA Fungus*. 2014;5(1):7-15

Moreno O, Marmolejo GJ, Sánchez G, Díaz R, Luna JJ, Sosa J, Pérez KJ & Moreno CE. Hongos asociados con el declinamiento de la manzanita *Arctostaphylos pungens* HBK en la Sierra Fría de Aguascalientes, México. *Polibotánica*. 2015;(40)59-77

Monteserín M, García B, Cerero R & Esparza G. Síndrome de Sjögren. Revisión e implicaciones en el ámbito de la salud oral. *Cient Dent* 2014;11,49-54.

Muzyka B, & Epifanio R. Update on oral fungal infections. *Dental Clinics of North America*, 2013;57(4),561-581

Naranjo, J. F., & Chávez, A. Análisis comparativo entre dos métodos de extracción de aceites esenciales. *Boletín Semillas Ambientales*, 2015;9(2)

Navarrete A, Trejo J, & Reyes L. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrateaceae) with gastroprotective activity. *J Ethnopharmacol*. 2002;79(3): 383-8

Nitasha G, Nayak N, Vinodraj K, Chandralekha N, Mathai P, & Cherian J. Comparison of the efficacy of cardamom (*Elettaria cardamomum*) with pioglitazone on dexamethasone-induced hepatic steatosis, dyslipidemia, and hyperglycemia in albino rats. *J Adv Pharm Technol Res*. 2015;6(3):136-40

Noriega R, Ortiz O, Esquivel E, Clemente M, Manzo S, Salgado R, & Saavedra A. Hypolipidemic Activity of *Eryngium carlinae* on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Biochemistry research international*. 2012:603501

Novo R, Viglianco A, & Nassetta M. Actividad repelente de diferentes extractos vegetales sobre *Tribolium castaneum* (Herbst). *Agriscientia*, 1997;14:31-36

Odds F, & Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. *Journal of clinical microbiology*, 1994;32(8),1923-1929

Pappas P, Kauffman C, Andes D, Benjamin D, Calandra T, Edwards J, Filler S, Fisher J, Kullberg B, Ostrosky L, Reboli A, Rex J, Walsh T, & Sobel J. Guías de práctica clínica para el manejo de la candidiasis: actualización del 2009, de la Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*, 2009;48(5), 503-537

Pardo A, Arenas J, Gómez M, Lora F, & Gómez J. Determinación de la actividad antifúngica de extractos de Lantana camara frente a Candida spp. *Infectio*, 2011;15(4),235-242

Pérez R, Pérez S, Zavala M, & Salazar M. Anti-inflammatory activity of the bark of Hippocratea excelsa. *J Ethnopharmacol*. 1995;47(2):85-90

Pérez R, Rodríguez C, Lara J, Montes R & Ramírez G. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana* 2004,20(1):141-152.

Ramakrishna Y, Goda H, Baliga M, & Munshi A. Decreasing cariogenic bacteria with a natural, alternative prevention therapy utilizing phytochemistry (plant extracts). *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 2011;36(1),55-64

Rangel D, García I, Velasco J, Buitrago D, & Velazco E. (Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nítida* (Ruiz et Pavon) Pers. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 2001;42,43-46

Reyes A, Castro H, Rodríguez L, Quijano C, & Parada F. Obtención de extractos de jengibre (*Zingiber officinale*) empleando CO₂ supercrítico. *Rev. acad. colomb. cienc. exact. fis. nat.*, 2011;35(136),381-385

Rodriguez L, García M, Guerra D, Sánchez M, & Saavedra D. Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de extractos de *Bryophyllum pinnata*. *Revista Química Viva*, 2011;10(1),1138-43

Rodríguez R, González G, Verde M, Morales M, Rivas C, Oranday A, & Treviño J. Bioprospección de la actividad antimicótica de extractos metanólicos de *ariocarpus kotschoubeyanus* y *ariocarpus retusus*. *Polibotánica*, 2011.(31)143-155

Rueda F, Hernández S, Ordoñez W, Villamil J, & Godoy C. Portadores de *Candida* oral en pacientes atendidos en una clínica dental de Tabasco, México. *Rev Odontol La noam*, 2011;3(2),45-8

Saavedra M, Salazar M, Medina J, Quiñonez B, Salas E, & Paredes L. Evaluación in vitro del efecto de extractos de *Aloe Vera* sobre *Streptococcus Mutans*. *Acta Bioclínica*, 2014;4(8),3-19

Shekar B, Nagarajappa R, Suma S, & Thakur R. Herbal extracts in oral health care-A review of the current scenario and its future needs. *Pharmacognosy reviews*, 2015;9(18),87

Silva V, Díaz M, Febré N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. *Revista chilena de infectología*, 2002;19,149-156

Sourmaghi M, Kiaee G, Golfakhrabadi F, Jamalifar H, & Khanavi M. Comparison of essential oil composition and antimicrobial activity of *Coriandrum sativum* L. extracted by

hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation. *Journal of food science and technology*, 2015;52(4),2452-2457

Taff H, Nett J & Andes D. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. *Medical Mycology*. 2012;50(2):214-218

Torrenegra M, Granados C, Osorio M, & León, G. Comparación de la Hidro-destilación Asistida por Radiación de Microondas (MWHD) con Hidro-destilación Convencional (HD) en la Extracción de Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. *Información tecnológica*, 2015;26(1),117-122

Villanueva J, & Arenas R. Candidiasis mucocutánea. Una revisión. *Rev Mex Micol* 2007;25,91-104

Wady A, Machado A, Zucolotto V, Zamperini C, Berni E & Vergani C. Evaluation of *Candida albicans* adhesion and biofilm formation on a denture base acrylic resin containing silver nanoparticles. *J Appl Microbiol* 2012;112(6):1163-72

Wen L, Haddad M, Fernández I, Espinoza G, Ruiz C, Neyra E, Bustamante E, & Rojas R. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana: aislamiento de 3'-formil-2', 4', 6'-trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 2011;77(3),199-204

Yang J, Yang C, Chang H, Yang C, Wang S, Hsieh M, & Chuang L. Chemical Composition and Antibacterial Activities of *Illicium verum* Against Antibiotic-Resistant Pathogens. *J Med Food*, 2010;13(5):1254-1262

Yazdani D, Rezazadeh S, Amin G, Zainal M, Shahnazi S & Jamalifar H. Antifungal Activity of Dried Extracts of Anise (*Pimpinella anisum* L.) and Star anise (*Illicium verum* Hook. f.) Against Dermatophyte and Saprophyte Fungi. *J Med Plants*, 2009;8(5):24-29

Zheljazkov V, Astatkie T, & Schlegel V. Hydrodistillation Extraction Time Effect on Essential Oil Yield, Composition, and Bioactivity of Coriander Oil. *Journal of oleo science*, 2014;63(9),857-865

ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento informado a padres

Estimado señor/señora:

La Dra. Martha Elizabeth Galindo Hernández, egresada del Posgrado de Odontopediatria de la UANL, se encuentra realizando un proyecto de investigación titulado “Obtención y caracterización fitoquímica de extractos y aceites esenciales y su evaluación microbiológica contra aislados de candidiasis oral”. El objetivo del estudio es determinar la efectividad de algunos extractos de plantas contra una enfermedad llamada candidiasis, coloquialmente conocida como algodoncillo.

Procedimiento:

Si usted acepta que su hijo(a) participe sucederá lo siguiente:

- Se examinará su cavidad oral
- Se frotará un hisopo de algodón estéril en su lengua

Beneficios:

No se recibe un beneficio directo por su participación en el estudio, sin embargo si usted decide que su hijo(a) participe estará colaborando con la Facultad de Odontología de la UANL para obtener nuevas opciones de tratamiento.

Riesgos:

Los riesgos potenciales que implican su participación en el estudio son nulos.

Participación:

La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted está en plena libertad de negarse a participar o de retirar su participación del mismo en cualquier momento.

Consentimiento del padre/madre/tutor para la participación de su hijo(a)

Su firma indica su aceptación para que su hijo(a) participe voluntariamente en este estudio.

_____	_____
Nombre del padre/madre/tutor	Firma
_____	_____
Fecha	Relación con el menor
_____	_____
Nombre completo del menor participante	Edad
_____	_____
Nombre de la persona que obtiene el consentimiento	Fecha

Anexo 2: Hoja de captura de datos

N° de muestra	Fecha	Nombre del paciente	Género	Edad	Enfermedades sistémicas
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					

PRODUCTOS GENERADOS

Participación en Congreso de la 13^o Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales organizado por la Asociación Mexicana de Investigación en Productos Naturales (AMIPRONAT).



Morelia, Michoacán, a 10 de abril de 2017.

Asunto: Carta de aceptación.

Estimados Colegas:

Martha E. Galindo-Hernández, Sonia M. López-Villarreal, René Hernández-Delgadillo, Casiano del Ángel-Mosqueda, Claudio Cabral-Romero, Osvelia E. Rodríguez-Luis.

Por este conducto nos complace informarles que su trabajo intitulado:

Efecto de extractos acetónicos contra *Cándida albicans* para su uso en la terapia odontológica.

Ha sido aprobado por el Comité Científico para su presentación en la 13a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales dedicada al Dr. Juan Diego Hernández Hernández. La reunión se realizará del 17 al 20 de mayo del año en curso en Morelia, Michoacán, México. Al término de la recepción y evaluación de los trabajos se le informará el día y hora de su presentación. Le recordamos que por esta ocasión todos los trabajos han sido considerados en la modalidad de cartel.

Aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo y los invitamos a visitar la dirección electrónica de la Reunión, www.13ariipn.umich.mx.

Atentamente

Dra. Rosa Eiva Norma del Río Torres
Presidente del Comité Organizador de la 13a RIIPN