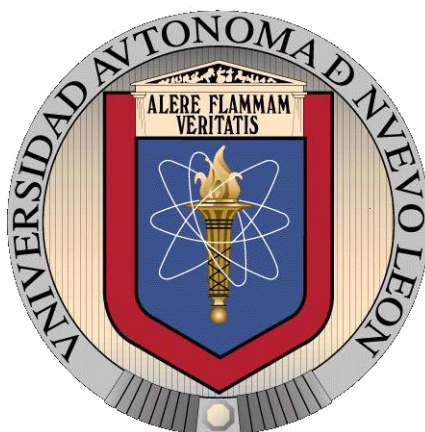


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA Y CITOTÓXICA DEL ACEITE ESENCIAL DE
***Citrus paradisi* CONTRA *Candida albicans* ATCC**

POR

AMEYALLI JOCELYN MARTINEZ DELGADO

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

NOVIEMBRE, 2018

TESIS
ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA Y CITOTÓXICA DEL ACEITE ESENCIAL DE
***Citrus paradisi* CONTRA *Candida albicans* ATCC**

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

POR
AMEYALLI JOCELYN MARTINEZ DELGADO

Dirección de Tesis

Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis
Directora

Dra. Sonia Martha López Villarreal
Co-Directora

Q.B.P. Vilma Rosa Suárez Martínez
Asesor de Laboratorio

TESIS

**ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA Y CITOTÓXICA DEL ACEITE ESENCIAL DE
Citrus paradisi CONTRA *Candida albicans* ATCC**

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA

Por

AMEYALLI JOCELYN MARTINEZ DELGADO

Dirección de Tesis

Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis

Directora

Dr. Juan Gabriel Báez González

Asesor Metodológico

Dr. Uziel Castillo Velázquez

Director Externo

TESIS

**ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA Y CITOTÓXICA DEL ACEITE ESENCIAL DE
Citrus paradisi CONTRA *Candida albicans* ATCC**

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA

Por

AMEYALLI JOCELYN MARTINEZ DELGADO

Comité de Examen de Tesis

Dr. Enrique Nieto Ramírez

Presidente

Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis

Secretario

Dr. Jaime Adrián Mendoza Tijerina

Vocal

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por bendecirme con una hermosa familia, permitirme lograr cada meta que me eh propuesto y siempre protegerme en cada momento, gracias por tantas bendiciones.

A mi mamá, **Maricela Delgado Álvarez**, por darme la vida, ser la mejor mamá del mundo, mi consejera, mi apoyo y mi mejor amiga. Gracias por cuidarme y escucharme siempre que lo necesito, ser para mí, una mujer admirable, una guerrera e inculcarme valores para ser una mejor persona día con día.

A mi papá, **Mario Martínez Torres**, por enseñarme a ser una persona responsable y cumplida y demostrarme que con trabajo y dedicación se puede lograr lo que deseas. Gracias por darme siempre todo lo mejor y apoyarme en cada decisión que eh tomado. Eres mi ejemplo a seguir.

A mi hermana, **Fernanda**, le doy gracias a Dios por bendecirme con una gran hermana como tú, que me apoyas en mis locuras, por confiar en mí y ayudarme cuando lo necesito, te quiero mucho Ferush.

A mi novio, **Jesus Luis Ortiz Ledezma**, por recorrer este camino conmigo, comprenderme cuando tenía mucho trabajo y poco tiempo y aun así, siempre apoyarme, darme ánimos y demostrarme tú apoyo incondicional, pero sobre todo, gracias por tu gran cariño.

A mi asesora, **Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis**, gracias por enseñarme el gusto por la investigación, creer en mí y confiar en mi trabajo. La admiro mucho.

A mi director externo, **Dr. Uziel Castillo Velázquez**, gracias por el apoyo, paciencia y conocimientos brindados.

Gracias **Q.B.P. Vilma Rosa Suárez Martínez**, por su conocimiento compartido y apoyo incondicional pero sobre todo por su gran calidez.

A la **Dra. Sonia Martha López Villarreal** y **Dra. Marcela Montes Villarreal** coordinadoras del posgrado durante mis dos años, gracias por su valioso apoyo, por las enseñanzas como profesionista y ser humano, gracias por enseñarme el amor por la Odontopediatría.

Al **Dr. Juan Gabriel Báez González**, por su apoyo en cada etapa de este proyecto.

A la **Dra. Hortencia Quintanilla Arreozola**, por su sincera amistad, consejos y por escucharme siempre.

A mis maestros del posgrado, por el aprendizaje transmitido a lo largo de mi carrera.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por impulsar el desarrollo de investigaciones.

A la Facultad de Odontología, Dra. María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda y Rosa Isela Sánchez Nájera, por su incondicional apoyo durante su administración, facilitando las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y la Facultad de Ciencias Biológicas por abrirnos sus puertas para la realización de este trabajo.

Al Posgrado de Odontopediatría, por permitirme vivir dos años de grandes experiencias, enseñanzas y convivencia.

Al Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP) 2017.

Al Programa de Apoyo de la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT-UANL 2018) CN 675-18.

DEDICATORIA

A mis padres, Maricela y Mario Gracias por su amor,
enseñanza, apoyo y comprensión ¡Los amo!

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	v
<i>AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES</i>	vii
<i>DEDICATORIA</i>	viii
<i>LISTA DE TABLAS</i>	xi
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	xii
<i>NOMENCLATURA</i>	xv
<i>RESUMEN</i>	xvi
<i>ABSTRACT</i>	xvii
1. <i>INTRODUCCIÓN</i>	1
2. <i>HIPÓTESIS</i>	2
3. <i>OBJETIVOS</i>	3
3.1 Objetivo general.....	3
3.2 Objetivos específicos	3
4. <i>ANTECEDENTES</i>	4
4.1 Microorganismos del género <i>Candida</i>	4
4.2 <i>Candida albicans</i>	4
4.2.1 Taxonomía	4
4.2.2 Formas celulares de <i>C. albicans</i>	5
4.2.3 Diagnóstico microbiológico.....	6
4.2 Candidiasis oral	6
4.2.1 Situaciones predisponentes	7
4.2.2 Clasificación	7

4.2.3 Tratamiento.....	8
4.2.4 Prevención	8
4.3 Colonización de <i>C. albicans</i> en aparatos de ortodoncia	9
4.4 Fitoterapia	10
4.4.1 Sustancias activas de las plantas.....	10
4.5 <i>Citrus paradisi</i> (Pomelo)	12
Las frutas cítricas que se consumen en todo el mundo son las naranjas, mandarinas, limones, limas y pomelos, estas tienen un sabor y aroma agradables, además son una rica fuente de vitamina C y tienen abundantes nutrientes como la fibra dietética, el azúcar y los minerales (Hung <i>et al</i> , 2017).	
4.5.1 Características.....	12
4.5.2 Componentes y usos	14
4.5.3 Aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i>	14
4.6 Métodos para evaluar <i>in vitro</i> la actividad antimicótica.....	14
4.6.2 Concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución.....	15
4.7 Citotoxicidad.....	16
4.7.1 Viabilidad celular.....	16
4.7.2 MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio).....	17
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
5.1 Tipo de estudio.	21
5.2 Obtención del aceite esencial.....	21
5.3 Caracterización fitoquímica parcial del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> mediante pruebas químicas.	21
5.4 Identificación de la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC.	23
5.4.1 Siembra por aislamiento	23
5.4.2 Tinción de Gram	24
5.4.3 Preparación del inóculo	26

5.5 Determinación del efecto antimicótico <i>in vitro</i> del aceite esencial contra <i>Candida albicans</i> ATCC.	26
5.6 Identificación de la concentración mínima inhibitoria <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> contra <i>Candida albicans</i> ATCC.	28
5.7 Identificación del efecto citotóxico <i>in vitro</i> del aceite esencial contra <i>Candida albicans</i>	29
5.8 Identificación del efecto citotóxico <i>in vitro</i> del aceite esencial sobre macrófagos J774, A1, células Vero E6 y Células MDBK.	30
6. RESULTADOS.....	32
6.1 Caracterización fitoquímica parcial.	32
6.2 Identificación de la cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC.	32
6.3 Efecto antimicótico <i>in vitro</i> del aceite esencial contra <i>Candida albicans</i> ATCC.	34
6.4 Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial contra <i>Candida albicans</i> ATCC.	36
6.5 Efecto citotóxico del aceite esencial <i>Citrus paradisi</i> contra <i>Candida albicans</i> ATCC.	36
6.6 Efecto citotóxico del aceite esencial <i>Citrus paradisi</i> sobre cultivos celulares.	37
Se observo que el aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> presenta citotóxicidad a altas concentraciones por lo cuál se descarta su uso en cavidad oral, sin embargo se pudiera considerar para uso extraoral.	37
7. DISCUSIÓN.....	38
8. CONCLUSIONES.....	40
LITERATURA CITADA	41

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Métodos químicos para la identificación de sustancias activas del aceite esencial de <i>C. paradisi</i>	22
Tabla 2. Identificación de sustancias activas del aceite esencial de <i>C. paradisi</i>	32
Tabla 3. Efecto antimicótico del aceite esencial de <i>C. paradisi</i> contra <i>C. albicans</i> ATCC, (24h de exposición).....	35
Tabla 4. Nivel de absorbancia mediante la técnica de microdilución	36

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. <i>Candida albicans</i>	4
Figura 2. Clamidosporas de <i>C. albicans</i>	5
Figura 3. Formas celulares de <i>C. albicans</i>	6
Figura 4. Partes de <i>C. paradisi</i> (Pomelo)	13
Figura 5. Corteza del fruto <i>C. paradisi</i>	14
Figura 6. Método de Kirby-Bauer.....	15
Figura 7. Método de microdilución	16
Figura 8. MTT (Sal de tetrazolio más empleado).....	18
Figura 9. Aceite esencial de <i>Citrus paradisi</i> (Pomelo).....	21
Figura 10. Métodos químicos en placa de porcelana.....	23
Figura 11. Métodos químicos en tubo de ensayo.....	23
Figura 12. Pasos de la técnica de aislamiento.....	24
Figura 13. Colocación del inóculo de <i>C. albicans</i>	24
Figura 14. Técnica de aislamiento	24
Figura 15. Tinción de Gram.....	25
Figura 16. Colocación de tinción sobre <i>C. albicans</i>	25
Figura 17. <i>C. albicans</i> teñida con Tinción de Gram	25
Figura 18. Procedimiento de la tinción de Gram	26
Figura 19. Turbidez de 0.5 de la escala de McFarland	26
Figura 20. Método de difusión en disco	27
Figura 21. Crecimiento en placa de 96 pozos	28
Figura 22. Medición de absorbancia (600 nm)	29
Figura 23. Siembra de <i>C. albicans</i> en microplaca	30
Figura 24. Aplicación de DMSO	30
Figura 25. Medición de absorbancia (520, 540, 570 nm)	30
Figura 26. Colonias de <i>C. albicans</i> en medio sólido.....	33
Figura 27. <i>C. albicans</i> observada a las 24 horas a(40x), b(100x).....	33

Figura 28. <i>C. albicans</i> observada a las 48 horas a(40x), b(100x).....	34
Figura 29. Inhibición de aceite esencial de <i>C. paradisi</i> sobre <i>C. albicans</i>	34
Figura 30. Inhibición de control positivo contra <i>C. albicans</i>	35
Figura 31. Crecimiento en agar de <i>C. albicans</i>	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico	Página
Gráfico 1. Efecto antimicótico y citotóxico del aceite esencial de <i>C. paradisi</i> contra <i>C. albicans</i>	37
Gráfico 2. Efecto citotóxico de aceite esencial <i>C. paradisi</i> sobre cultivos celulares	37

NOMENCLATURA

g	Gramos
mg	Miligramos
mm	Milímetros
mL	Mililitros
μL	Microlitros
μg	Microgramos
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
rpm	Revoluciones por minuto
CMI	Concentración mínima inhibitoria
HCl	Hidróxido de calcio
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)
DMSO	Dimetilsulfóxido
PBS	Buffer fosfato salino
CO₂	Dióxido de carbono
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
UFC	Unidades formadoras de colonias

Tesista: Ameyalli Jocelyn Martínez Delgado

Director de tesis: Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis

Co-Director: Dra. Sonia Martha López Villarreal

Universidad Autónoma de Nuevo León

ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA Y CITOTÓXICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Citrus paradisi* CONTRA *Candida albicans* ATCC

RESUMEN

Introducción: La candidiasis oral es la infección micótica de la cavidad oral más común en niños, causada por una levadura llamada *candida*, su incidencia es de 45% en neonatos, 65% en niños sanos. **Objetivo:** Evaluar la acción antimicótica y citotóxica del aceite esencial de *Citrus paradisi* contra *Candida albicans* ATCC. **Material y métodos:** Se realizó la caracterización fitoquímica del aceite esencial de *Citrus paradisi* por métodos químicos, posteriormente se evaluó el efecto antimicótico contra *Candida albicans* mediante el método Kirby-Bauer evaluándose concentraciones desde 20 - 0.75 mg/mL, se realizó por triplicado y se incubó a 37°C. Se dio lectura a las 24 horas y se comparó con los controles positivo (clorhexidina 2%, nistatina) y negativo. Se calculó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por microdilución en microplacas de 96 pozos y se dio lectura a las 18 horas (Gen5 de Epoch BioTek). Se determinó el efecto citotóxico sobre *Candida albicans* y cultivos celulares (Células J774A.1, Vero E6 y MDBK) por medio del método de Nitroazul de Tetrazolio (MTT). **Resultados:** El aceite respondió de manera positiva para la presencia de grupos químicos de esteroides, triterpenos, cumarinas, quinonas y sesquiterpenlactonas. Presentó una inhibición promedio desde 28.6 ± 3.06 a 6.6 ± 3.05 comparándolo con los controles positivo clorhexidina (0.2%) 26.6 ± 5.03 y nistatina 23 ± 2 . La concentración mínima inhibitoria correspondió a 2.5 mg/mL, en relación a la toxicidad se percibió que el aceite es citotóxico a altas concentraciones sobre cultivos celulares y sobre *C. albicans*. **Conclusiones:** Se determinó que el aceite esencial de *Citrus paradisi*, presenta actividad antifúngica sobre cepas de *Candida albicans*.

PALABRAS CLAVE: *citrus paradisi*, *candida albicans*, fitoterapia, candidiasis oral, supervivencia celular.

ABSTRACT

Introduction: Oral candidiasis is the fungal infection of the oral cavity most common in children, caused by a yeast called candida, its incidence is 45% in neonates, 65% in healthy children. **Objective:** To evaluate the antifungal and cytotoxic action of the essential oil of *Citrus paradisi* against *Candida albicans* ATCC. **Material and methods:** The characteristic of the chemistry of the essential oil of citrus fruits, paradisiacal, methods, the antifungal effect against *Candida albicans* was evaluated by means of the Kirby-Bauer method, it was evaluated from 20 - 0.75 mg / mL, it was carried out in triplicate and incubate at 37 ° C. The reading was read at 24 hours and compared with the positive controls (chlorhexidine 2%, nystatin) and negative. The minimum inhibitory concentration (MIC) was calculated by microdilution in 96-point microplates and read at 18 hours (Gen5 from Epoch BioTek). The cytotoxic effect on Cells and Cell Cultures (Cells J774A.1, Vero E6 and MDBK) was determined by means of the Tetrazolium Nitro Blue Method (MTT). **Results:** The positive response oil for the presence of chemical groups of sterol, triterpene, coumarin, quinone and sesquiterpenectone. Present an average inhibition from 28.6 ± 3.06 to 6.6 ± 3.05 comparing it with the controls positive chlorhexidine (0.2%) 26.6 ± 5.03 and nystatin 23 ± 2 . The minimum inhibitory concentration corresponds to 2.5 mg / mL, in relation to the toxicity observed The oil is cytotoxic. **Conclusions:** It was determined that the essential oil of *Citrus paradisi*, has antifungal activity on strains of *Candida albicans*.

KEY WORDS: *Citrus paradisi*, *Candida albicans*, phytotherapy, oral candidiasis, cell survival.

1. INTRODUCCIÓN

La OMS ha reportado que alrededor de 4 mil millones de personas emplean plantas medicinales para el cuidado de su salud. En México existe un gran número de especies de plantas de hasta 30,000 especies, de las cuales solamente 3,000 han sido estudiadas por sus propiedades medicinales.

La candidiasis oral es una enfermedad micótica oportunista muy frecuente en pacientes pediátricos debido a que su sistema inmunitario aún no es lo suficientemente maduro y diversos factores predisponentes, provocando irritabilidad, dolor y dificultad para comer, esta afección se puede prevenir mediante una higiene oral adecuada, de no ser así, la candidiasis oral puede llegar a generar dolor, ardor y disfagia, y para su tratamiento se administran fármacos antimicóticos, que según la literatura pueden generar efectos adversos como vomito, náuseas, diarrea y dolor abdominal, además de generar resistencia fúngica en pacientes pediátricos. Es por esto, que es de gran importancia buscar alternativas de tratamiento para dicha enfermedad; durante los últimos años, los aceites esenciales de plantas cítricas han alcanzado gran auge en la fitomedicina debido a sus actividades antimicrobiana, antioxidantes y presencia de sustancias activas, por lo que, se ha intensificado su uso como medicina alternativa y natural.

Se estima que con el paso de los años, la atención odontológica se convertirá en un grave problema de salud pública, por lo que, la odontología presenta importantes desafíos, entre los cuales destaca la necesidad de investigación para ofrecer soluciones terapéuticas a enfermedades dentales que aquejan a la población como lo es la candidiasis oral.

En base a lo anterior, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la acción antimicótica y citotóxica del aceite esencial de *Citrus paradisi* contra *Candida albicans* ATCC.

2. HIPÓTESIS

El aceite esencial de *Citrus paradisi* mostrará acción antimicótica y citotóxica contra *Candida albicans* ATCC.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la acción antimicótica y citotóxica del aceite esencial de *Citrus paradisi* contra *Candida albicans* ATCC.

3.2 Objetivos específicos

- a) Realizar la caracterización fotoquímica parcial del aceite esencial de *Citrus paradisi*.
- b) Determinar el efecto antimicótico *in vitro* del aceite esencial contra *Candida albicans* ATCC.
- c) Determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Citrus paradisi* contra *Candida albicans* ATCC.
- d) Identificar el efecto citotóxico *in vitro* del aceite esencial contra *Candida albicans* y cultivos celulares.

4. ANTECEDENTES

4.1 Microorganismos del género *Candida*

En el año de 1923 se propuso el género *Candida* en el trabajo de Berkhout (Pardi y Cardozo, 2002), este género comprende más de 150 especies, son considerados células eucariotas, dimórficos, presentan un crecimiento filamentoso a 25°C y levaduriforme a 37°C, pueden observarse al microscopio como blastoconidios o levaduras (células esféricas u ovoideas) o como pseudomicelios (levaduras alargadas).

Crecen en agar Sabouraud originando colonias cremosas, lisas o rugosas, se incuban a 24-37°C durante 24 a 48 horas presentando un olor a levadura de pan o cerveza (Liébana Ureña, 2002).

4.2 *Candida albicans*

Fue descrito por primera vez hace más de 150 años, en 1844 fue aislado del esputo de un paciente tuberculoso (Akpan y Morgan, 2002). En 1939 fue aceptado por el Congreso Internacional de Microbiología en Nueva York como especie *Candida albicans* (Pardi y Cardozo, 2002), actualmente es conocido como el microorganismo comensal y patógeno fúngico más prominente en los seres humanos (Noble *et al*, 2017), es un miembro de la microbiota normal que coloniza el tracto gastrointestinal, el tracto reproductivo, la cavidad oral y la piel de la mayoría de los humanos (Nobile y Johnson, 2015). Un 60% de las personas presentan *Candida* en la región orofaríngea dentro de su microflora normal.

4.2.1 Taxonomía

Reino: Hongo

Clase: *Blastomycetes*

Familia: *Cryptococcaceae*

Género: *Candida*

Especies: *albicans* (Figura 1)

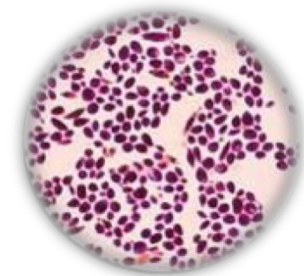


Figura 1. *Candida albicans*

Tiene la capacidad de existir en dos formas, una fase de levadura (blastospora) o en una fase de hifas, todas las levaduras son grampositivas, microscópicamente, presenta dimorfismo, el cual es una transformación de la forma ovoide de las levaduras a hifas (Pardi y Cardozo, 2002).

Este microorganismo se compone de un núcleo con presencia del cromosoma 7, una pared celular externa a la membrana plasmática que contiene grandes cantidades de esteroides como ergosterol, además, se han descrito estructuras fibrilares (fimbrias) que participan en la adhesión de dicha levadura (Akpan y Morgan, 2002; Kashem *et al*, 2015; Krol y Keels, 2007; Liébana Ureña, 2002), tiene la capacidad de formar esporas de pared gruesa, denominadas clamidiosporas (Figura 2), estas tienen un diámetro de 7 a 8 micras (Pardi y Cardozo, 2002).

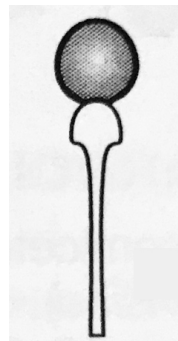


Figura 2. Clamidiosporas de *C. albicans*

4.2.2 Formas celulares de *C. albicans*

Los tipos de células de *C. albicans* son las levaduras, las hifas y las pseudohifas (Figura 3); las levaduras y las hifas son las más comunes, mientras que las pseudohifas y las clamidiosporas son menos conocidas, las levaduras tienen una morfología de células redondas a ovaladas y miden alrededor de 2 a 4 micras, mientras que las hifas son células delgadas con forma de tubo que se asemejan a segmentos de una manguera de jardín y miden de 3 a 5 micras y las pseudohifas tienen forma elipsoidal (Noble *et al*, 2017).

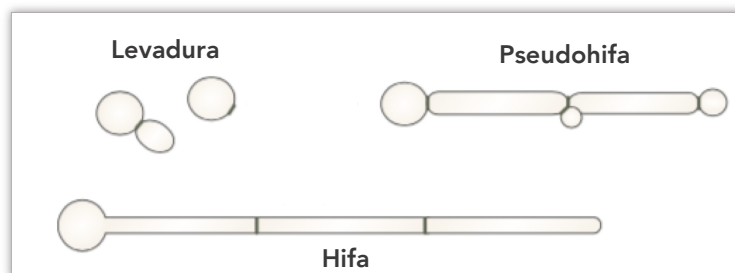


Figura 3. Formas celulares de *C. albicans*

4.2.3 Diagnóstico microbiológico

- Observación microscópica: se realiza con la tinción de Gram, las levaduras se tiñen de violeta o azul oscuro intenso.
- Cultivo: en agar Sabouraud las colonias se observan lisas, suaves, húmedas de color crema y tamaño que oscila entre 1.5 y 2 mm de diámetro con aspecto de levadura. Otros medios de cultivo que se utilizan son el Albicans ID (Biomérieux) donde las colonias son de color azul y CHROMagar Candida en donde las colonias de esta especie son de color verde y lisas (Liébana Ureña, 2002; Pardi y Cardozo, 2002).

4.2 Candidiasis oral

La candidiasis oral es la infección micótica de la cavidad oral más común en niños causada por una levadura llamada *Candida*, entre las más importantes destaca *C. albicans* siendo la más común y la base importante de este estudio, así mismo se encuentran *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. pseudotropicalis*, *C. guillierimondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsicosis* y *C. stellatoidea*. *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*, por otro lado, se ha reportado la alta colonización de *Candida* en la cavidad oral de los niños favorece la aparición de caries dental (Akpan y Morgan, 2002; Behzadi *et al*, 2014).

Su incidencia es de 45% en neonatos, 65% en niños sanos, 50-65% personas con algún tipo de prótesis removibles, 90% en pacientes con leucemia aguda sometidos a quimioterapia y un 95% en pacientes con VIH (Akpan y Morgan, 2002).

La candidiasis oral puede presentarse asintomática o sintomática como:

- Dolor
- Sensación de ardor en las membranas mucosas y la lengua
- Disfagia (Krol y Keels, 2007)

Es importante diferenciarla de otras lesiones que se manifiestan en manchas blancas como el liquen plano, carcinoma de células escamosas, reacción liquenoide y leucoplaquia (Akpan y Morgan, 2002).

4.2.1 Situaciones predisponentes

Las situaciones predisponentes a candidiasis oral en recién nacidos son bebés prematuros, bajo peso al nacer, biberones sucios, terapia medicamentosa (administración a largo plazo de antibióticos de amplio espectro, corticosteroides e inmunosupresores) y procedimientos de resucitación; además se encuentran la avitaminosis y la desnutrición (Kozinn *et al*, 1958; Lyu X *et al*, 2016), asimismo, pacientes con VIH, leucemia, pacientes con enfermedad terminal, anemia y quienes reciben radioterapia de cabeza y cuello también son considerados personas predisponentes a esta enfermedad (Akpan y Morgan, 2002; Behzadi *et al*, 2014). Otros factores de riesgo presentes en los niños son la xerostomía, mala higiene oral, aparatos de ortodoncia y respiración bucal (Jabra *et al*, 2007).

4.2.2 Clasificación

Se clasifica en candidiasis aguda y crónica.

a) Candidiasis aguda:

- Candidiasis pseudomembranosa

Es la candidiasis oral más común en niños, siendo más propensa en bebés con sistema inmune inmaduro. Se caracteriza por pseudomembranas blancas extensas que consisten en células epiteliales descamadas, fibrina e hifas fúngicas presentes en la mucosa bucal y labial, paladar duro y blando, lengua, tejidos periodontales y orofaringe; dichas

membranas se raspan con un hisopo exponiendo la mucosa eritematosa subyacente (Akpan y Morgan, 2002; Behzadi *et al*, 2014).

- Candidiasis atrófica aguda

Se presenta con sensación de ardor en la boca o en la lengua, observándose de color rojo brillante.

b) Candidiasis crónica:

- Candidiasis hiperplásica crónica

Se presenta en la mucosa bucal o en el borde lateral de la lengua como lesiones blancas moteadas u homogéneas causada principalmente por tabaquismo.

- Candidiasis atrófica crónica

Se presenta como eritema crónico localizado en los tejidos de la mucosa cubiertos por prótesis dentales, por lo que, el tratamiento indicado es un cambio de nuevas prótesis, higiene y revisión constante (Akpan y Morgan, 2002).

4.2.3 Tratamiento

El tratamiento de elección para la candidiasis oral en niños es el uso de antimicóticos como la nistatina, anfotericina B, ketoconazol y fluconazol, sin embargo, existen reportes en los cuales se han presentado eventos adversos en niños como vómitos, diarrea, náuseas, dolor abdominal, erupciones cutáneas y dolor de cabeza (Flynn *et al*, 1995; García Cuesta *et al*, 2014; Hoppe, 1997; Lyu *et al*, 2016)

4.2.4 Prevención

Las levaduras son microorganismos que forman parte de la microbiota humana normal y se consideran comensales inoocuos de la cavidad bucal. El dorso de la lengua, las superficies mucosas y la placa dental pueden albergar estos microorganismos, además se ha encontrado colonización de *Candida* en zonas subgingivales en individuos sistémicamente sanos. Cuando se producen cambios en los mecanismos de defensa del huésped y en el entorno oral, estas levaduras pueden inducir infecciones oportunistas de

la mucosa y periodontales, sobre todo en pacientes con VIH, inmunocomprometidos y sometidos a quimioterapia y radioterapia, por lo que, el uso de enjuague bucal con clorhexidina se ha utilizado para la profilaxis contra *Candida* debido a sus propiedades antifúngicas (Giuliana *et al*, 1997).

4.3 Colonización de *C. albicans* en aparatos de ortodoncia

Las biopelículas son el estado de crecimiento predominante de muchos microorganismos, *C. albicans* produce biopelículas altamente estructuradas compuestas de múltiples tipos de células como levadura y pseudohifas encerradas en una matriz extracelular.

Los catéteres urinarios y venosos centrales, marcapasos, válvulas cardíacas, prótesis articulares, lentes de contacto y las prótesis dentales son susceptibles a los biofilms de *C. albicans*, una vez hospedado el biofilm de *C. albicans* en un dispositivo médico, éste tiene la capacidad y el potencial de sembrar infecciones diseminadas en el torrente sanguíneo y provocar infecciones sistémicas invasivas de tejidos y órganos (Nobile y Johnson, 2015).

Candida albicans es la principal levadura presente en todo tipo de aparato protesico y ortodónico, provocando en ocasiones estomatitis (Torres López *et al*, 2017). Los aparatos de ortopedia ya sean fijos o removibles dificultan una higiene oral adecuada y modifican el entorno ecológico de la cavidad oral, favoreciendo la acumulación de biopelícula dental y un aumento en la colonización por *C. albicans* (Hernández Solis *et al*, 2016).

Otros aspectos a considerar son las superficies internas de los aparatos fabricados a base de acrílico que contactan con los tejidos blandos ya que estos funcionan como reservorios de microorganismos debido a que estas superficies tienen un acceso limitado para su limpieza mecánica, alteran el pH de la saliva y aumentan la acumulación de placa dental lo que favorece la formación de *C. albicans* (Nevzatoglu *et al*, 2011), llegando a provocar enfermedades como caries dental y gingivitis.

La adhesión de *Candida* en los aparatos de ortodoncia en niños por el acúmulo de placa se puede relacionar con el mal cumplimiento de las instrucciones de higiene oral debido a

que los pacientes son jóvenes y no realizan los métodos de higiene de manera adecuada (Arikan *et al*, 2015), por lo que, un aparato puede tener un efecto adverso en cuanto a la prevalencia de candidiasis y/o estomatitis en la boca de los niños, sin embargo con la higiene correcta de la cavidad oral y del aparato de ortodoncia se puede minimizar el riesgo de la colonización de agentes como *C. albicans* (Arendorf y Addy, 1985; Addy *et al*, 1982). Por lo que, se recomienda su desinfección del aparato por medio de inmersión en soluciones químicas como la clorhexidina que inactiva la levadura (Torres López *et al*, 2017), en lo que respecta a las biopelículas fúngicas se recomienda administrar un antimicótico, sin embargo, actualmente estas biopelículas han demostrado gran resistencia a estos medicamentos, por lo que, se están requiriendo altas dosis para eliminar la infección causada por levaduras y hongos (Nobile y Johnson, 2015).

4.4 Fitoterapia

Dentro de los reinos de la naturaleza que contribuyen en disminuir los síntomas y prevenir algunas enfermedades, destaca el reino vegetal. Las plantas, gracias a su maravilloso y complejo metabolismo, constituyen un verdadero arsenal químico. En la época del renacimiento, Paracelso, padre de la Farmacología Química, fue el primero en señalar que las propiedades medicinales de las plantas radican en sus principios activos aislables por técnicas alquímicas. La fitoterapia se define como el uso de plantas o extractos de plantas para usos medicinales. Su aceptación es debida a que los productos naturales no son tóxicos, tienen menos efectos secundarios y son fáciles de conseguir (Woong Kim, 2012).

4.4.1 Sustancias activas de las plantas

Se estima que hay entre 250.000 y 500.000 especies de plantas en la Tierra, de las cuales, algunas se utilizan para fines medicinales, ya que estas tienen una capacidad casi ilimitada para sintetizar sustancias que sirven como mecanismos de defensa contra la depredación por microorganismos (Cowan, 1999), llamadas sustancias activas, encargadas de lograr algún fin terapéutico, las cuales se obtienen por medio de algún disolvente o diversos medios (Ali *et al*, 2016), al menos 12.000 ya han sido aisladas (Cowan, 1999) y han sido utilizadas en la elaboración de fármacos o fitofármacos, ya que intervienen en la defensa contra patógenos (Hulla *et al*, 2015; Rojas *et al*, 2015;).

Algunos de los compuestos que se encuentran, son los de la familia fenólica (avonoides), terpénica (saponinas y aceites esenciales), alcaloidea (alcaloides), esteroidea (cardiotónicos y fitohormonas), y polímeros heterogéneos (gomas y mucílagos) (Roco, 1999). Prexisten compuestos de mediana o baja actividad capaces de ejercer toxicidad como fenólicos, polímeros heterogéneos y terpenos (Avello y Cisternas, 2010).

Existen diferentes tipos de sustancias activas presentes en cada planta, a continuación de presentan los más conocidos como:

- Alcaloides. Compuestos capaces de proveer nitrógeno, se subdividen en:
 - a) Alcaloides derivados de la ornitina y lisina
 - b) Alcaloides derivados de la tirosina y fenilalanina
 - c) Alcaloides derivados del triptófano
 - d) Alcaloides derivados del ácido nicotínico
 - e) Alcaloides derivados de la histidina

- Fenoles. Comprende aproximadamente 8000 compuestos incluyendo esterres, metilesterres y glucosidos, estos compuestos reducen el riesgo de enfermedades cardiovasculares, hipertensión, cáncer y diabetes. Entre los principales se encuentra:
 - a) Fenoles simples en forma de heterósidos
 - b) Ácidos fenólicos
 - c) Taninos
 - d) Cumarinas
 - e) Lignanos
 - f) Quinonas
 - g) Flavonoides

- Taninos. Son bioactivos como antioxidantes y antimicrobianos. También se utilizan como antisépticos y astringentes, se dividen en:
 - a) Galotaninos
 - b) Elagitaninos

- Flavonoides. Son sustancias con propiedades antialérgicas, antiulcéricas, antiinflamatorias, anti-agregantes plaquetarios además, brindan efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación. En los tipos de flavonoides se encuentran:

- a) Flavonas y flavonoles
- b) Flavanonas y los flavanoles
- c) Antocianos
- d) Isoflavonoides
- e) Isoflavonas
- f) Chalconas y dihidrochalconas
- g) Sulfatos de flavonoides
- h) Biflavonoides

- Saponinas. Ejercen una poderosa acción hemolítica porque interaccionan con el colesterol de la membrana de los eritrocitos (Rojas *et al*, 2015).

4.5 *Citrus paradisi* (Pomelo)

Las frutas cítricas que se consumen en todo el mundo son las naranjas, mandarinas, limones, limas y pomelos, estas tienen un sabor y aroma agradables, además son una rica fuente de vitamina C y tienen abundantes nutrientes como la fibra dietética, el azúcar y los minerales (Hung *et al*, 2017).

4.5.1 Características

Citrus paradisi (Pomelo) es el resultado de un cruce natural entre *Citrus maxima burm* (Pomelo dulce) con *Citrus sinensis* (Naranja dulce), este proceso ocurrió en la Isla de Barbados en el siglo XVIII.

C. paradisi es una planta eucariótica que pertenece a la familia *Rutaceae*, se localizan en regiones tropicales y subtropicales como el sureste de Asia, el centro de China, Filipinas y el archipiélago indomalayo hasta Nueva Guinea, sin embargo, el United States

Department of Agriculture (USDA, 2016) reportó que en el período 2015-2016, los países con mayor producción de pomelo fueron China, Estados Unidos, México, Sudáfrica, Turquía, Israel y la Unión Europea (Cristoval Luna *et al*, 2018; Torrenegra Alarcón *et al*, 2017; USDA, 2016)

Es un árbol subtropical de tamaño mediano de 5 a 6 metros de altura con hojas ovaladas, alternas y finamente dentadas de 7 a 15 cm de largo, así como flores blancas, su fruto es de aproximadamente 15 cm de diámetro de color amarillo claro protegido por una cáscara (corteza), que está formada por un epicarpo que corresponde a la epidermis e hipodermis, un mesocarpo pomposo de color blanco y un endocarpo que contiene de 11 a 14 carpelos con jugo blanco, rosa o rojo, cada uno esta rodeado por una membrana (septas) que contiene las semillas (Figura 4).

La cáscara (corteza) es la parte utilizada del pomelo para la obtención del aceite esencial (Figura 5), está constituida por un gran número de compuestos, entre ellos se encuentran los terpenos, hidrocarburos sesquiterpenos, alcoholes, aldehídos y ésteres (Churata Oroya *et al*, 2016; Cristoval Luna *et al*, 2018).

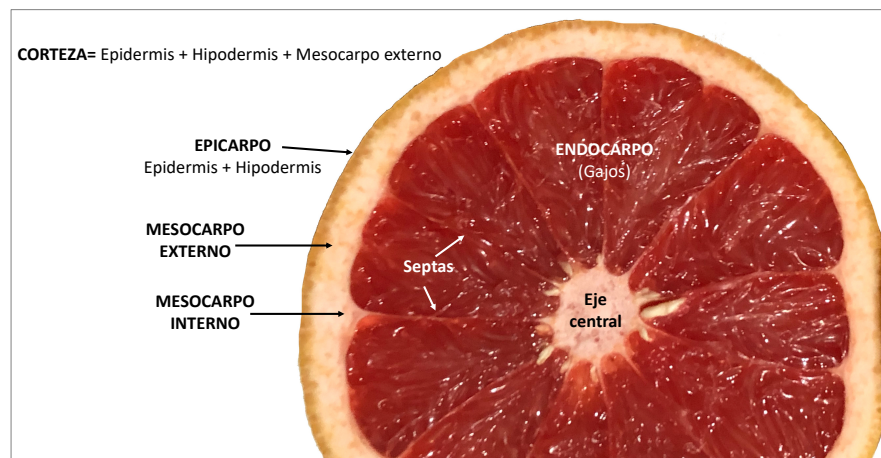


Figura 4. Partes de *C. paradisi* (Pomelo)



Figura 5. Corteza del fruto *C. paradisi*

4.5.2 Componentes y usos

Entre los metabolitos secundarios que posee el fruto del pomelo son los flavonoides, limonoides, cumarinas entre ellas las furanocumarinas, carotenoides y ácidos orgánicos. Estos metabolitos son los responsables de las actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y neuroprotectoras que promueve el fruto de *C. paradisi* (Hung *et al*, 2017).

4.5.3 Aceite esencial de *Citrus paradisi*

El aceite esencial de *Citrus paradisi* se define como una sustancia líquida volátil de carácter lipofílico, con propiedades aromáticas y presencia de sustancias activas extraído de la cascara del fruto del pomelo mediante métodos físicos como la hidrodestilación, su composición química consiste en una mezcla de sustancias orgánicas como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, etc. Actúa como agente antibacteriano, antiviral, antifúngico e insecticida, antioxidante, astringente, para regeneración celular y desintoxicación (Churata Oroya *et al*, 2016; Torrenegra Alarcón *et al*, 2017).

Por otro lado, se ha reportado el uso del aceite esencial de *C. paradisi* también para reducir la ansiedad, depresión y dolor del cáncer; por lo que, en los últimos años se han preponderado para investigarlos como agentes antifúngicos (Ou *et al*, 2015).

4.6 Métodos para evaluar *in vitro* la actividad antimicótica.

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a diferentes tipos de tratamientos implica además de medir los resultados, interpretarlos y darles el seguimiento necesario.

4.6.1 Método de difusión en disco (Método de Kirby-Bauer)

El método de difusión en disco de agar fue desarrollado en 1940, este procedimiento consiste en depositar en la superficie de una placa de agar previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes tratamiento, trascurrido el tiempo de inubación, se observan zona de inhibición de crecimiento del microorganismo sembrado (Figura 6).

Algunas de sus ventajas es que se considera un método sencillo, barato, de fácil control y estandarización, además tiene la capacidad de probar enormes cantidades de microorganismos y la facilidad para interpretar los resultados proporcionados (Balouiri *et al*, 2016; Taroco *et al*, 2006).

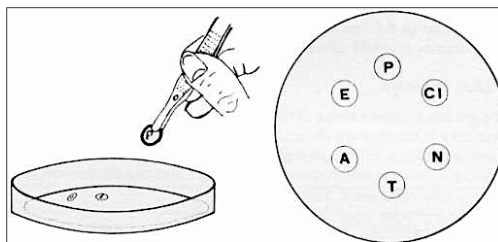


Figura 6. Método de Kirby-Bauer

4.6.2 Concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja del compuesto estudiado (tratamiento) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo analizado, se expresa en mg/mL o mg/L.

El método de microdilución es un procedimiento cuantitativo que se utiliza para determinar los valores de la CMI probado en medio de caldo. El procedimiento consiste en preparar diluciones dobles del agente en un medio de crecimiento líquido dispensado en tubos que contienen volúmenes pequeños utilizando una placa de microtitulación de 96 pocillos. Cada pocillo se inocula con un inóculo microbiano preparado en el mismo medio después de la dilución de una suspensión microbiana estandarizada ajustada a una escala de 0.5 McFarland, después se incuban los microorganismo de prueba y finalmente,

para determinar la CMI, se utilizan los dispositivos de visualización para el registro de los resultados (Figura 7).

La microdilución en caldo ha sido estandarizada por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para probar bacterias, levaduras y hongos filamentosos, entre sus principales ventajas de este método se pueden mencionar la reproducibilidad y la economía de los reactivos y el espacio que se produce debido a la miniaturización de la prueba (Balouiri *et al*, 2016).



Figura 7. Método de microdilución

4.7 Citotoxicidad

4.7.1 Viabilidad celular

Cuando las células son expuestas a sustancias biológicamente dañinas pueden llegar a sufrir cambios en su morfología, alterar su crecimiento celular así como causar muerte o desintegración celular, es por esto que, se lleva a cabo la verificación de la viabilidad celular en cada compuesto de interés farmacológico.

Existen diferentes métodos para evaluar la viabilidad celular y la citotoxicidad de los compuestos interesados, entre ellos se encuentran:

1. Medición de la actividad mitocondrial.
2. Análisis de la liberación de lactato deshidrogenasa o adenilato quinasa para la evaluación de la integridad de la membrana celular.

3. Determinación del contenido de células ATP y caspasa 3/7 actividad, como los indicadores de necrosis celular y apoptosis (Boncler *et al*, 2014).

Existen diversos ensayos colorimétricos, fluorimétricos y basados en luminiscencia de alto rendimiento que miden la viabilidad de las células directamente en formato de placa de 96 pocillos utilizando un espectrofotómetro de barrido de múltiples pozos (Stepanenko y Dmitrenko, 2015). La medición de la actividad mitocondrial es el estudio de investigación más popular, entre los procedimientos más utilizados, está el uso de MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) y resazurina (7-hidroxi-10-oxido fenoxazin-10-io-3-ona), sin embargo, el más utilizado es el MTT debido a que es más económico y se ha empleado en más estudios farmacológicos (Boncler *et al*, 2014).

4.7.2 MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio)

Las sales de tetrazolio se descubrieron por primera vez en 1894, éstas han sido por muchos años las candidatas más atractivas para medir las células vivas, ya que, permiten calcular la actividad de varias enzimas deshidrogenasas debido a que el anillo de tetrazolio se rompe en mitocondrias activas, ocurriendo solo la reacción en células vivas.

El término tetrazolio deriva de la estructura química de las sales, ya que son compuestos heterocíclicos con cuatro átomos (tetra) de nitrógeno (aza) en el anillo de tetrazol, que definen este grupo de sales orgánicas, el 1H o 2H adicional en la nomenclatura de la sal de tetrazolio describe la ubicación formal del átomo de hidrógeno. El cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio (TTC) fue el compuesto prototípico inicial que formó un formazán insoluble en agua después de la reducción, no obstante, el bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) se considera uno de las sales más utilizadas actualmente.

El MTT (Figura 8) está basado en la sal de tetrazolio y es definido como un ensayo colorimétrico que sirve para medir el número de células viables a partir de un espectrofotómetro de barrido de múltiples pocillos (lector de ELISA), este se basa en la reducción de la sal de tetrazolio por las deshidrogenasas succínicas mitocondriales en

células viables que producen cristales de formazán, por lo que, solo las células viables son capaces de reducir y convertir el compuesto de MTT relativamente sin color en formazán; se aplica ampliamente a líneas celulares de mamíferos, bacterias, hongos y levaduras; su principal ventaja es la velocidad con la que se pueden procesar las muestras, sin embargo, una desventaja es la pobre estabilidad a la luz del formazán.

El formazán es una sustancia de color púrpura oscuro y muy lipófila, su evaluación fotométrica de su concentración explica el número de células viables (Angius y Floris, 2015; Boncler *et al*, 2014; Grela *et al*, 2018; Mosmann, 1983)

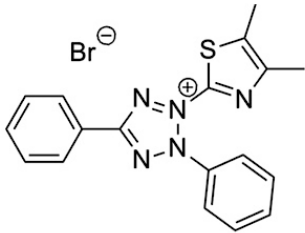
Sal de tetrazolio	Nombre completo y estructura	Características del formazan
MTT	Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio 	<ul style="list-style-type: none"> • púrpura • agua-insoluble

Figura 8. MTT (Sal de tetrazolio más empleado)

Mosmann en 1983 fue el primero en reportar la aplicación del MTT en la estimación de la viabilidad de las células vivas utilizando una línea celular de linfoma de ratón, además, describió la evaluación de la respuesta de líneas celulares de mamíferos a compuestos citotóxicos. Este reporte dio pie a otros investigadores para empezar a experimentar con células eucariotas y procariotas.

Ademas de la determinación de viabilidad de las celulas, existen otras aplicaciones para el empleo del MTT, entre ellas se encuentran:

- La determinación de bacterias resistentes a múltiples fármacos.
- Evaluación de la formación de biofilm.
- Cuantificación indirecta de compuestos antibacterianos (evaluación de concentración inhibitoria mínima).

- Método de determinación de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a múltiples fármacos.

Existen diferentes factores que pueden afectar los resultados finales del ensayo MTT, entre ellos se encuentran, la incubación prolongada, presencia de cepas farmacorresistentes, pH después de la disolución, pH del tampón de reacción, tipo de medio de reacción y características del microorganismo. Es importante eliminar el medio de crecimiento antes de la adición del solvente orgánico (MTT) y la lectura de absorbancia, ya que ciertos componentes del medio pueden perturbar la disolución de formazan.

Una vez agregado el MTT, éste se transporta a través de la membrana por endocitosis, por lo que, la carga positiva neta de éste facilita su captación celular, una vez en el citoplasma, el MTT se transporta y se acumula en el sitio de reducción aniónica (retículo endoplásmico), es aquí, donde la acumulación de sal de MTT no tiene efecto citotóxico a corto plazo y la tasa de reducción depende de la producción glucolítica de Nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), dicha sal amarilla se reduce a formazán púrpura insoluble en agua, esta reducción de MTT a un producto de formazan puede llevarse a cabo por tipos de células como, células T, células B y líneas de células tumorales similares a macrófagos (Grela *et al*, 2018; Mosmann, 1983).

En la etapa final del ensayo, se requiere la extracción de formazán, con un solvente orgánico de elección, como lo es, el Dimetilsulfóxido (DMSO) debido a que elimina las imprecisiones derivadas del pH y mejora la estabilidad en el tiempo de la solución, permite una disolución completa incluso dentro de 2 minutos, es importante mencionar que la solución mantenida en la oscuridad proporciona lecturas de absorbancia estables hasta en una hora (Grela *et al*, 2018).

Para llevar a cabo la lectura en el espectrofotómetro de barrido de múltiples pocillos, se debe de reducir el espectro de absorbancia, este puede variar según la presencia de los solventes, que va desde 512 a 587 nm, por ejemplo utilizando el isopropanol ácido se

aplica 570 nm y 540 nm utilizando DMSO, aunque, la literatura reporta que la longitud de onda de medición debe definirse para cada ensayo tomando en cuenta la línea celular, cepa microbiana o disolvente utilizado (Grela *et al*, 2015; Grela *et al*, 2018).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio.

Estudio comparativo, abierto, experimental, prospectivo y longitudinal.

5.2 Obtención del aceite esencial.

El aceite esencial de *Citrus paradisi* (Pomelo) fue donado por la compañía de Frutech International Corporation de México S.A. de C.V. (Figura 9).



Figura 9. Aceite esencial de *Citrus paradisi* (Pomelo)

5.3 Caracterización fitoquímica parcial del aceite esencial de *Citrus paradisi* mediante pruebas químicas.

Una vez recibido el aceite esencial, se procedió a su caracterización fotoquímica por métodos químicos de identificación de grupos funcionales (Domínguez *et al*, 1973), los cuales se describen en la Tabla 1. Las pruebas químicas de Liebermann Burchard, Hidroxido de sodio al 10%, Baljet y Ácido sulfúrico se realizaron en placa de porcelana con cavidades (Figura 10); las pruebas de Shinoda, Cloruro férrico, Molisch y Dragendorff se realizaron en tubo de ensayo (Figura 11).

Tabla 1. Métodos químicos para la identificación de sustancias activas del aceite esencial de *C. paradisi*

Prueba química	Metodología	Compuesto a identificar	Color prueba positiva
Liebermann Burchard	2 gotas del reactivo (una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1.0 mL de anhídrido acético y 1.0 mL de cloroformo)	Esteroles Triterpenos	Violeta-morado Rojiza
Shinoda	Limaduras de magnesio y unas gotas de ácido clorhídrico	Flavonoides Flavanonas y flavanoles	Rojo Verde-violeta
Baljet	Solución A: 1 g de ácido pícrico en 100mL de etanol) Solución B: 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua)	Sesquiterpenlactonas	Naranja-rojo oscuro
Ácido sulfúrico	2 gotas de ácido sulfúrico concentrado	Quinonas	Rojo
Cloruro férrico	2 gotas de la solución de cloruro férrico en agua al 2.5%;	Taninos	Oscuro
Molisch	3 gotas del reactivo (1g de alfa naftol en 100 mL de etanol al 95% y se agita, después se inclina el tubo y se depositan 2 mL de ácido sulfúrico concentrado por la pared.	Carbohidratos	Formación de anillo azul-verdoso en la interfase.
Hidroxido de sodio al 10%	2 gotas de una solución acuosa o alcohólica dando un color amarillo o anaranjado que desaparece al agregar 2 gotas de HCl al 10%	Cumarinas	-
Dragendorff	Solución A: 0.85g de nitrato de bismuto, 10 mL ácido acético glacial y 40 mL de agua. Solución B: 8 g de yoduro de potasio y 20 mL de agua.	Alcaloides	Rojo-naranja

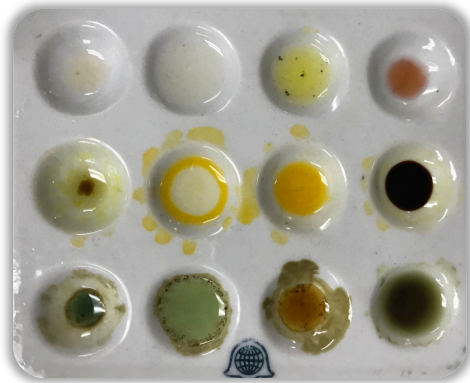


Figura 10. Métodos químicos en placa de porcelana

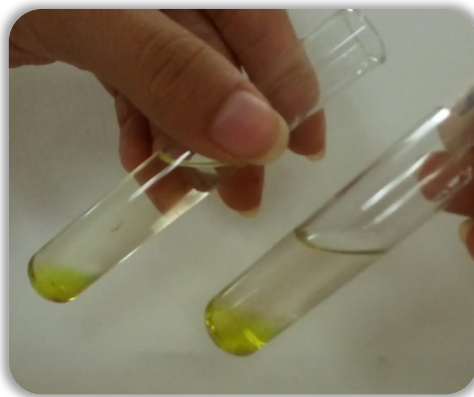


Figura 11. Métodos químicos en tubo de ensayo

5.4 Identificación de la cepa de *Candida albicans* ATCC.

Para los ensayos microbiológicos fue activada la cepa de *Candida albicans* 90029 ATCC proporcionadas por el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Odontología UANL. La activación de las cepas se realizó en la campana de flujo laminar, se inocularon 100 μ L de *Candida albicans* en un 1 mL de caldo Sabouraud colocarse en los tubos ependorff sellados con papel parafilm que fueron incubados a 37° durante 24 h.

5.4.1 Siembra por aislamiento

Posteriormente, se tomó una asada de inóculo de la cepa de *Candida albicans* 90029 ATCC previamente inoculada y se colocó en el agar Sabouraud para realizar la técnica de aislamiento; se dividió en tres zonas, esterilizando el asa entre cada una, una vez ejecutada la siembra, se incubó a 37°C durante 48 horas (Figura 12 a 14).

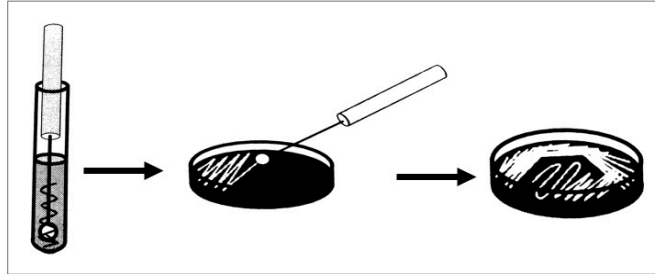


Figura 12. Pasos de la técnica de aislamiento



Figura 13. Colocación del inóculo de *C. albicans*

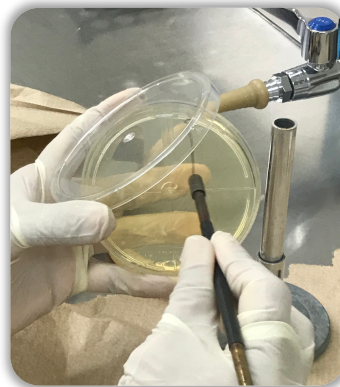


Figura 14. Técnica de aislamiento

5.4.2 Tinción de Gram

Se realizó la tinción de Gram (Figura 15) para identificar morfológicamente las cepas de *Candida albicans* 90029 ATCC; primeramente, con el asa estéril se tomo una colonia del agar Sabouraud anteriormente aislada y se colocó en una laminilla portaobjetos con agua destilada estéril para su diseminación, se pasó por el mechero para secar la cepa y fijarla, después se colocaron unas gotas de la primera tinción de Cristal-Violeta en el portaobjetos

por 1 minuto, posteriormente se lavo a chorro de agua y se colocó la segunda tinción de Yodo-Lugol por 1 minuto, se lavo y se coloco Alcohol-Acetona por 8 segundos, se lavo y se coloco la ultima tinción de Safranina por 1 minuto y se enjuago (Figura 16); con papel filtro Whatman nº1 se absorbieron los restos de agua para poder observar la laminilla portaobjetos con la cepa de *C. albicans* (Figura 17) al microscopio óptico (Figura 18) (Singh *et al*, 2014).



Figura 15. Tinción de Gram

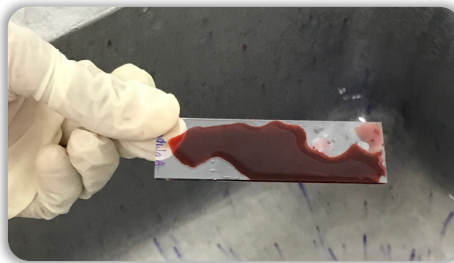


Figura 16. Colocación de tinción sobre *C. albicans*

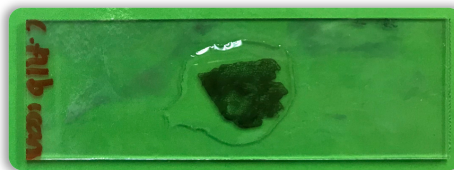


Figura 17. *C. albicans* teñida con Tinción de Gram



Figura 18. Procedimiento de la tinción de Gram

5.4.3 Preparación del inóculo

El número de colonias por mililitro (UFC), se logró estandarizar por método cualitativo, a partir del cultivo en agar con crecimiento de *C. albicans* activo, con un asa bacteriológica se tomaron colonias y se diluyeron en un tubo de ensayo con caldo Sabouraud ajustando el inóculo a una turbidez igual a la del tubo 0.5 de la escala de McFarland equivalente a 1×10^6 UFC/mL (Figura 19).

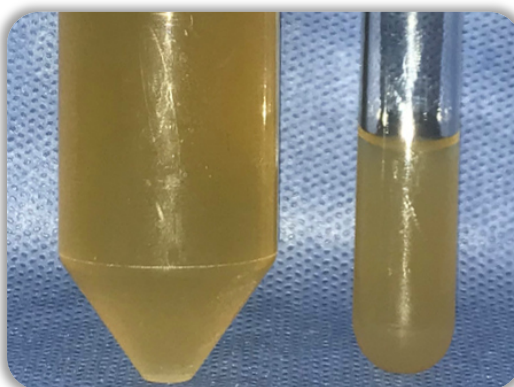


Figura 19. Turbidez de 0.5 de la escala de McFarland

5.5 Determinación del efecto antimicótico *in vitro* del aceite esencial contra *Candida albicans* ATCC.

Del inóculo de *C. albicans* estandarizado a una turbidez de 0.5 de McFarland, se depositaron 100 μ L del crecimiento fúngico en cajas de agar Sabouraud haciendo una

siembra por diseminación para obtener un crecimiento confluyente, se dejó secar de 3 a 5 minutos; después se realizó la difusión en disco (método Kirby-Bauer), en cada caja de agar se distribuyeron y se colocaron discos de papel Whatman nº1 de 6 mm de diámetro impregnados con las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Citrus paradisi* (20 µL, 10 µL, 5 µL, 2.5 µL, 1.25 µL, 0.75 µL), agua destilada como control negativo y 20 µL de clorhexidina al 2% y nistatina como controles positivos, los cuales fueron transportados con una pinza estéril (Figura 20), una vez colocados todos los discos, las cajas se dejaron secar por 30 minutos y finalmente se incubaron de manera invertida a 37° por 24 horas. Este procedimiento se realizó en una secuencia de seis (Bauer *et al*, 1966; Torrenegra Alarcón *et al*, 2017; Mohamadi y Motaghi, 2014). A las 24 horas se realizó la medición de los halos de inhibición del crecimiento de *C. albicans* para calcular la media y desviación estándar, además se calculó el porcentaje del efecto inhibitorio relativo (Ramírez y Díaz, 2007; Cruz Carrillo *et al*, 2010) con la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\bar{x} \text{ diámetro halo del aceite}}{\bar{x} \text{ diámetro halo del control positivo}} \times 100$$

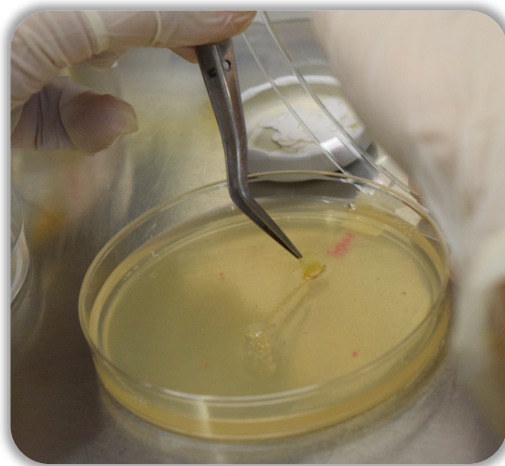


Figura 20. Método de difusión en disco

Todos los procesos realizados en el laboratorio se realizaron conforme los estándares reportados por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009; CLSI, 2017).

5.6 Identificación de la concentración mínima inhibitoria *in vitro* del aceite esencial de *Citrus paradisi* contra *Candida albicans* ATCC.

La concentración mínima inhibitoria se define como la concentración más baja del aceite esencial que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo (Zu *et al*, 2010). Esta fue determinada por el método de microdilución, el cual se llevo en microplacas estériles de poliestireno para Elisa Nunc de 96 pocillos; en cada pocillo se colocaron 100 μL de *Candida albicans* ATCC previamente activada a una escala de McFarland de 0.5, el primer pocillo se utilizo como control negativo sin agregar ningun activo, a partir del segundo pocillo se añadieron las concentraciones del aceite esencial de *Citrus paradisi*, 20 μL , 10 μL , 5 μL , 2.5 μL , 1.25 μL , 0.75 μL respectivamente, a partir del octavo pocillo se agregaron los controles positivos, 20 μL de clorhexidina al 2% y 10 μL de nistatina. Ese mismo procedimiento se realizo por triplicado y se incubó la microplaca a 37°C por 24 horas (Figura 21). Posteriormente, se procede a la lectura para medir la absorbancia a 600 nm con el programa Gen5 de Epoch BioTek (Figura 22), después en una caja de agar Sabouraud con cuatro divisiones etiquetadas, se tomaron 10 μL de cada pocillo y se colocaron en el agar y se dejaron secar por 6 horas para ser incubadas a 37°C por 24 horas. Finalmente, se procede a la lectura de las cajas de agar para determinar si existe crecimiento del microorganismo en conjunto con el nivel de absorbancia de dichos pocillos en los cuales se obtuvo la media entre el control negativo y positivo y así comparar con las concentraciones del aceite esencial y determinar la concentración minima inhibitoria (Balouiri *et al*, 2016; Ramirez y Castaño, 2009).

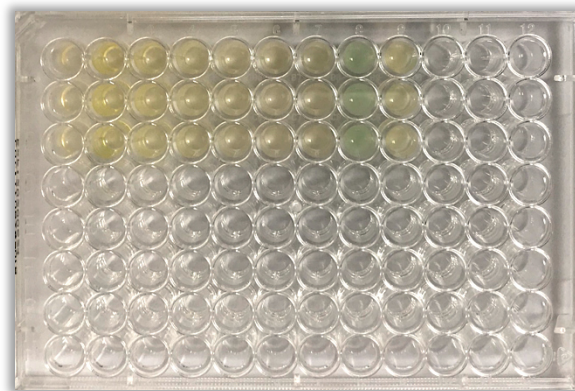


Figura 21. Crecimiento en placa de 96 pozos



Figura 22. Medición de absorbancia (600 nm)

5.7 Identificación del efecto citotóxico *in vitro* del aceite esencial contra *Candida albicans*.

Para la evaluación de la citotoxicidad, en cajas de 96 pozos se colocaron 100 μL de *Candida albicans* ATCC en presencia de diferentes concentraciones del aceite esencial de *Citrus paradisi* (20 μL , 10 μL , 5 μL , 2.5 μL , 1.25 μL , 0.75 μL), un control negativo sin activo y un control positivo (20 μL clorhexidina al 2%), el procedimiento se realizó por triplicado, y se incubó durante 24 horas a 37°C.

Posteriormente, se centrifugó la microplaca a 1700 rpm por 3 minutos para lograr acentuar las esporas, se retiró con una pipeta el sobrenadante de cada pocillo y se colocó en cada pozo 100 μL de MTT, se envolvió en papel aluminio la microplaca para evitar que le diera la luz y se volvió a incubarse a 37°C por 2 horas (Figura 23).

Transcurridas las dos horas, la microplaca se observaba de color violeta, a excepción del control positivo; se retiró el sobrenadante, para así dejar solamente los cristales formados por las esporas y se colocaron 100 μL de solución de Dimetilsulfóxido (DMSO) en cada pocillo, se colocó nuevamente el aluminio y se incubó a 37°C por 20 minutos (Figura 24).

Finalmente, empleando el programa Gen5 de Epoch (BioTek), en el cual se introduce la microplaca, se midió la absorbancia a 520, 540 y 570 nm (Figura 25) (Knight y Dancis, 2006; Jahn *et al*, 1995).

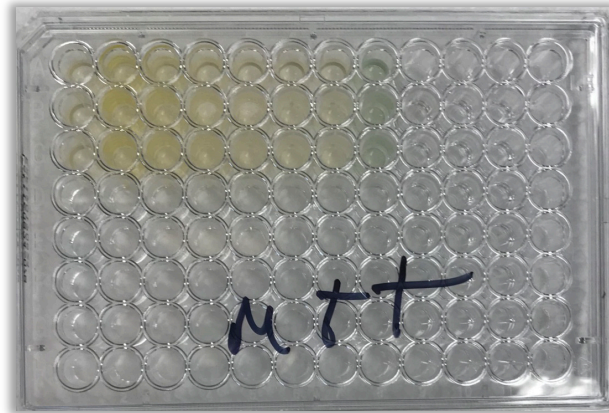


Figura 23. Siembra de *C. albicans* en microplaca



Figura 24. Aplicación de DMSO



Figura 25. Medición de absorbancia (520, 540, 570 nm)

5.8 Identificación del efecto citotóxico *in vitro* del aceite esencial sobre macrófagos J774, A1, células Vero E6 y Células MDBK.

Para la evaluación de la citotoxicidad se realizaron cultivos celulares en cajas de 96 pozos (costar 3595) en presencia de diferentes concentraciones de los aceites esencial de *Citrus paradisi* (Pomelo) (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) sobre células Vero E6, J774.A1 y Células MDBK (5×10^{-4}) el volumen final de cada pozo fue de 200 μL en medio de cultivo CRPMI 1640 Gibco pH=7, adicionado de 10% de suero bovino

fetal (Gibco) previamente inactivado, y antibiótico penicilina 5,000 U. I./mL – estreptomicina 5,000 µg/mL (Gibco) 10 mL por cada 500 mL de medio RPMI.

Se sembró una placa de 96 pocillos transparente con confluencia, con 5×10^4 células/pocillo, la misma se incubó durante 24 horas a 37 °C. Luego de este período, las células mostraron confluencia de un 70-80%. Se prepararon soluciones stock de los compuestos a ensayar con el disolvente adecuado (DMSO) a una concentración tal que en la placa el disolvente no supere el 0,5%. Luego se colocó medio de cultivo fresco en tubos eppendorf estériles y se realizaron las diluciones seriadas de los aceites esenciales. Se retiró el medio de cultivo de la placa y se adicionó el compuesto ya disuelto en medio de cultivo fresco (volumen final 200 µL). Se incubó durante 24 horas en incubadora a 37°C, 5% CO₂. Se realizaron los siguientes controles: células con disolvente (DMSO) y MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) células sin disolvente y con MTT, blanco de lectura: células con disolvente y sin MTT.

Luego del período de incubación se observaron las células en el microscopio y se realizaron anotaciones acerca del estado de las mismas. El medio de cultivo se retiró, se preparó la solución de MTT (0.1 mg/mL) en PBS estéril 0,2 % glucosa (200 mg, PBS 10 x 10 mL, agua milliQ 90 mL); y se adicionaron 100 µL de esta solución en cada pocillo. En el blanco de lectura se colocaron 100 µL de PBS estéril 0,2 % glucosa sin MTT. Posteriormente, se incubó durante 3 horas a 37°C. Luego de este procedimiento se retiró la solución de MTT y se adicionó en cada pocillo 180 µL de DMSO y 20 µL de solución amortiguadora glicina para MTT (glicina 0.1 M, NaCl 0.1M, EDTA 0.5 M). Se agitó la placa en shaker por lo menos durante un minuto y se realizó la lectura de absorbancia a 560 nm (Zu *et al*, 2010).

Se calculó el % citotoxicidad según la fórmula:

$$\% \text{ citotoxicidad} = 1 - [(\text{Absmuestra}/\text{Abscontrol con DMSO y MTT}) \times 100].$$

6. RESULTADOS

6.1 Caracterización fitoquímica parcial.

En la identificación de sustancias activas mediante pruebas coloridas, el aceite esencial respondió de manera positiva para esteroides, triterpenos, cumarinas, quinonas y sesquiterpenlactonas (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación de sustancias activas del aceite esencial de *C. paradisi*

Prueba química	Resultado	Sustancias activas
Liebermann Burchard	+	Esteroides Triterpenos
Shinoda	-	Flavonoides Flavanonas y flavanoles
Baljet	+	Sesquiterpenlactonas
Ácido sulfúrico	+	Quinonas
Cloruro férrico	-	Taninos
Molisch	-	Carbohidratos
Hidroxido de sodio al 10%	+	Cumarinas
Dragendorff	-	Alcaloides

Presencia de sustancias activas (+), prueba negativa (-).

6.2 Identificación de la cepa de *Candida albicans* ATCC.

Una vez aislado e incubado a 37°C por 24 horas el inóculo en agar Sabouraud, se observaron las colonias de *Candida albicans* de color crema, pastosas y tamaño de 1.5 mm de diámetro con aspecto de levadura (Figura 26).

Posteriormente, la laminilla portaobjetos con la cepa de *Candida albicans* se observó al microscopio óptico a 40x y 100x, se observa una coloración de color morado lo cual confirma que son grampositivas

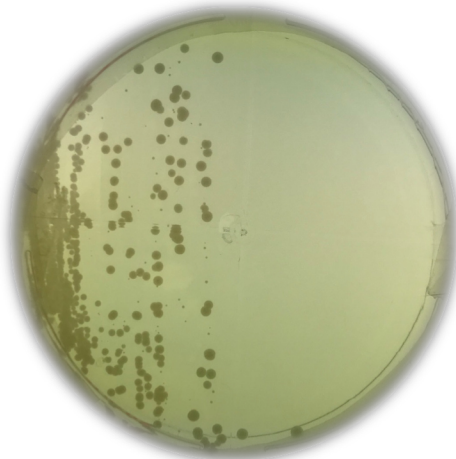


Figura 26. Colonias de *C. albicans* en medio sólido

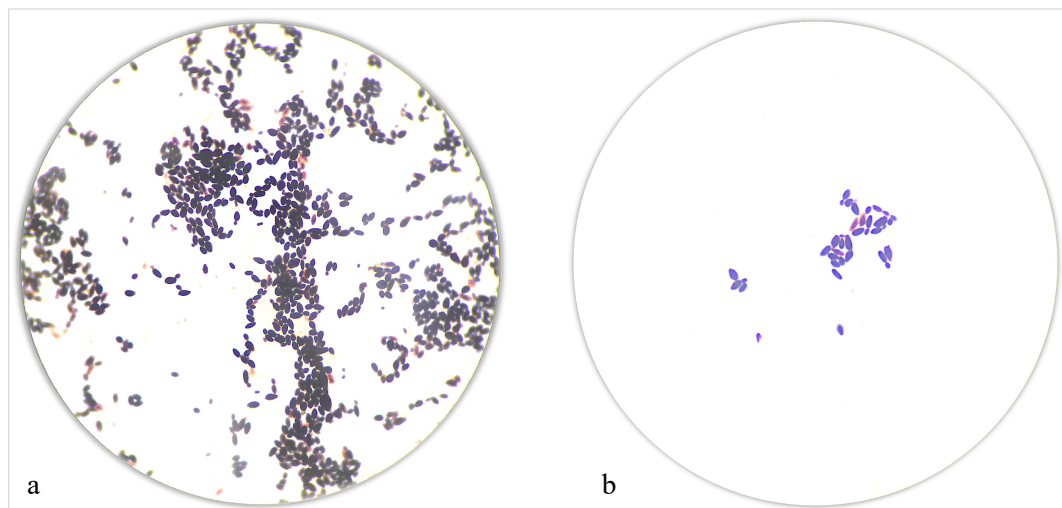


Figura 27. *C. albicans* observada a las 24 horas a(40x), b(100x)

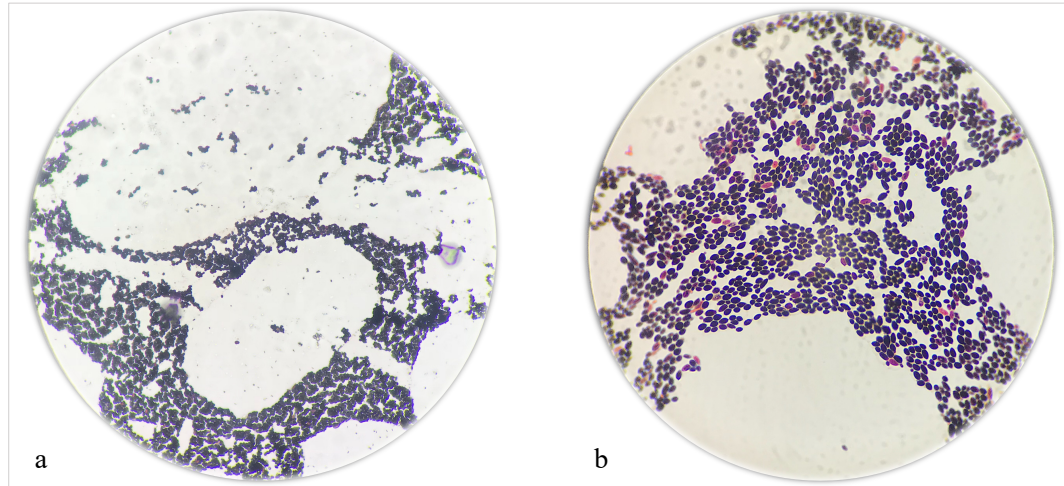


Figura 28. *C. albicans* observada a las 48 horas a(40x), b(100x)

6.3 Efecto antimicótico *in vitro* del aceite esencial contra *Candida albicans* ATCC.

Se realizó la lectura de los halo de inhibición del crecimiento de *Candida albicans*, se calculó la media y desviación estandar de cada tratamiento y posteriormente se determinó el porcentaje del efecto inhibitorio relativo. Se identificó actividad antifúngica para el aceite esencial, mostrando un efecto inhibitorio contra *Candida albicans* con un halo de inhibición promedio de 28.66 mm equivalente a la dilución de 20 μ L, seguida por la de 10 μ L con un diámetro promedio de 19 mm en comparación con los controles positivos de clohexidina al 2% con un promedio de 26.6 mm y nistatina de 21 mm (Tabla 3).

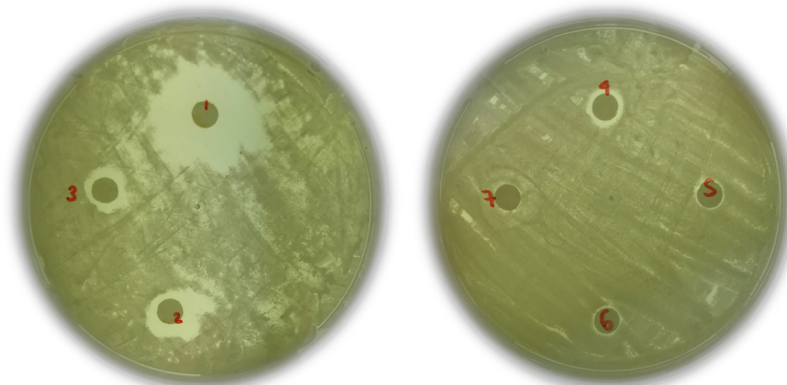


Figura 29. Inhibición de aceite esencial de *C. paradisi* sobre *C. albicans*

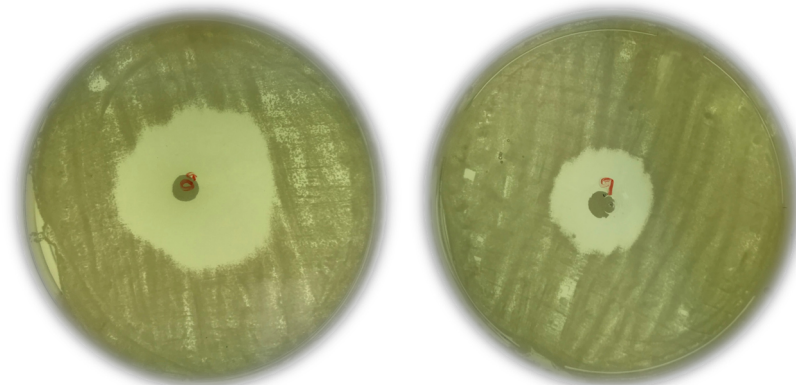


Figura 30. Inhibición de control positivo contra *C. albicans*

Tabla 3. Efecto antimicótico del aceite esencial de *C. paradisi* contra *C. albicans* ATCC, (24h de exposición).

Tratamiento	Promedio de inhibición de <i>Candida albicans</i> ATCC (mm)							$\bar{x} \pm s$	% inhibición
	1	2	3	4	5	6			
Aceite esencial de <i>C. paradisi</i> (mg)	20	26	26	24	24	25	25	25 ± 0.89	120.19
	10	15	14	15	14	14	14	14.3 ± 0.51	68.75
	5	12	12	10	10	10	11	10.8 ± 0.98	51.92
	2.5	10	8	8	9	8	9	8.6 ± 0.81	41.3
	1.25	0	0	0	0	0	0	0	0
	0.75	0	0	0	0	0	0	0	0
Control (+) 2%	32	32	32	34	36	38		34 ± 2.52	-
Control (+)	22	20	21	20	21	21		20.8 ± 0.75	-
Control (-)	0	0	0	0	0	0		0	-

Media de la muestra (\bar{x}); desviación estandar de la muestra (s).

6.4 Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial contra *Candida albicans* ATCC.

Se determinó como CMI del aceite esencial de *Citrus paradisi* contra *C. albicans* la concentración de 2.5 µg/mL, mostró un comportamiento fungicida al verificarse en el sembrado en agar y el nivel de absorbancia medido a 600 nm (Tabla 4 y Figura 31).

Tabla 4. Nivel de absorbancia mediante la técnica de microdilución

Tx Réplica	VI1	VI2	Concentraciones del aceite esencial						C (-)	C (+) 2%	C (+)
			20	10	5	2.5	1.25	0.75			
1	1.003	0.733	0.465	0.583	0.661	0.701	0.709	0.709	0.760	1.246	0.670
2	0.993	0.733	0.499	0.577	0.633	0.689	0.707	0.680	0.796	1.190	0.669
3	0.987	0.729	0.438	0.509	0.594	0.713	0.722	0.768	0.732	1.242	0.725
\bar{x}	0.994	0.731	0.467	0.556	0.629	0.701	0.713	0.719	0.763	1.226	0.688

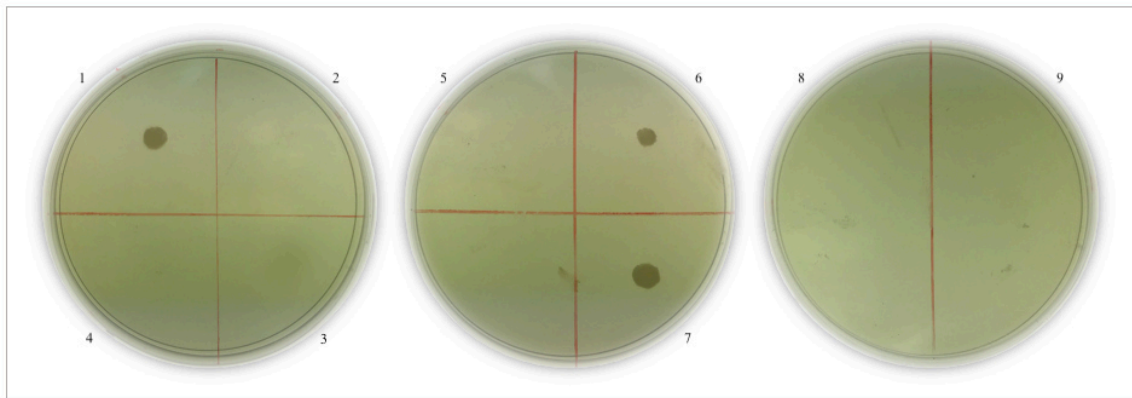


Figura 31. Crecimiento en agar de *C. albicans*

6.5 Efecto citotóxico del aceite esencial *Citrus paradisi* contra *Candida albicans* ATCC.

Se observó que a una concentración de 20 ng se mostró con efecto citotóxico sobre la cepa de *C. albicans*, sin embargo a una concentración de 5 ng muestra viabilidad sobre el microorganismo, por otro lado, el control positivo utilizado mostro ser muy citotóxico (Gráfico 1).

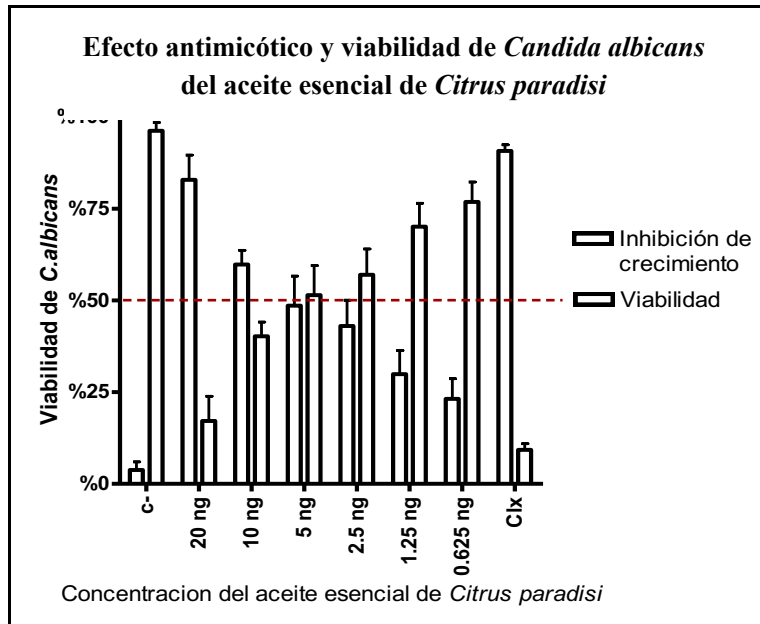


Gráfico 1. Efecto antimicótico y citotóxico del aceite esencial de *C. paradisi* contra *C. albicans*

6.6 Efecto citotóxico del aceite esencial *Citrus paradisi* sobre cultivos celulares.

Se observó que el aceite esencial de *Citrus paradisi* presenta citotoxicidad a altas concentraciones por lo cual se descarta su uso en cavidad oral, sin embargo se pudiera considerar para uso extraoral.

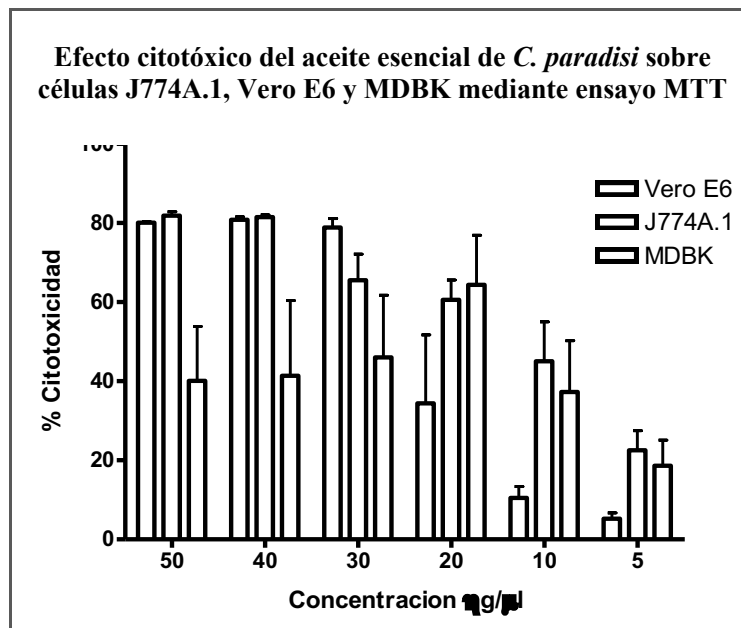


Gráfico 2. Efecto citotóxico de aceite esencial *C. paradisi* sobre cultivos celulares

7. DISCUSIÓN

Los aceites esenciales se han utilizado por más de 2000 años, estos son líquidos aromáticos extraídos de frutos cítricos que presentan defensas antibacterianas, antifúngicas, insecticidas y antivirales, se conocen más de 3000 aceites esenciales, solo 300 son utilizadas para fragancias, en los últimos 200 años se han empezado a investigar con propósitos medicinales debido a la gran resistencia de los microorganismos ante los medicamentos (Langeveld *et al*, 2014).

La literatura reporta la presencia de compuestos activos en el aceite esencial de *C. paradisi*, entre ellos se encuentra el sabineno, ocimenes, linalool y terpinen-4-ol, β -pineno, limoneno, myrcene y terpinen-4-ol (Paoli *et al*, 2016), por otro lado, Alcántara *et al* (2018) menciona la presencia de flavonoides, aminoácidos, fenólicos y vitaminas en el mesocarpo del fruto cítrico, igualmente se ha descrito la presencia de terpenos, α -pineno y sesquiterpeno vinílico (Ou *et al*, 2015), así mismo, Oikeh *et al* (2016) indica la presencia de compuestos como alcaloides, avonoides, esteroides, terpenoides, saponinas, glucósidos cardíacos y azúcares reductores, de igual manera, en este estudio se encontraron compuestos no antes reportados como la presencia de esteroides, triterpenos, quinonas, taninos, cumarias y sesquiterpenlactonas. La abundancia de estos compuestos en el fruto es lo que determina una amplia gama de beneficios antioxidantes, antiinflamatorios, antimicrobianos y antifúngicos (Oikeh *et al*, 2016).

Por otro lado, es primordial estudiar la actividad antimicótica del aceite esencial contra *C. albicans*, estudios han reportado la sensibilidad de levaduras a una concentración de 20mg/mL de los aceites esenciales con halos de inhibición promedio entre 12 y 70 mm para designarse como un resultado positivo (Scazzocchio *et al*, 2016). Se han reportado zonas de inhibición contra dicho microorganismo de 8 mm aproximadamente utilizando el método de difusión en pozo a una concentración de 200 μ g/mL (Oikeh *et al*, 2016), por lo contrario, Bona *et al* (2016), analizó la actividad antifúngica del mismo aceite esencial que se utilizó en este estudio contra *C. albicans* por medio del método de difusión de disco en agar, en este ensayo mencionan que el clotrimazol utilizado como control

positivo inhibió completamente el crecimiento de *C. albicans* y el aceite esencial de toronja inhibió significativamente el crecimiento del 35% del inóculo aislado interpretándose como más del doble de las zonas de inhibición que indujo el clotrimazol, por lo que, durante esta investigación se observaron halos de inhibición contra *C. albicans* de un promedio de 28.6 mm en una concentración de 20 mg/mL y la menor zona de inhibición fue de 6.6 mm a una concentración de 2.5 mg/mL. Por lo que, se esclarece que el efecto antimicótico que ha mostrado el aceite esencial de *Citrus paradisi* es relevante debido a que existe gran incidencia de infecciones por candidiasis en conjunto con la resistencia a fármacos antúngicos de las especies de *Candida* (Bardaweel et al. 2014).

Posteriormente, se evaluó la actividad antimicrobiana y se determinó la CMI del aceite esencial de *Citrus paradisi* en este estudio presentó actividad antifúngica importante contra *Candida albicans* a 2.5 µg/mL equiparable a las concentraciones reportadas por otros autores (Khan et al., 2009). Existen estudios que reportan para este mismo microorganismo una CMI de 25 µg/mL, así como para otros microorganismos orales los cuales también han sido sensibles al aceite esencial de *C. paradisi* donde ha mostrado ser activo a las concentraciones de 30 y 25 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* reportado por Nzeako and Lawati (2008), concordando con estudios realizados por otros autores (Rhayour, 2003; Ayoola et al., 2008).

8. CONCLUSIONES

En este estudio fue posible evaluar la acción antimicótica y citotóxica del aceite esencial de *Citrus paradisi* contra *Candida albicans* ATTC. Bajo las condiciones experimentales analizadas, el aceite esencial mostró gran inhibición sobre dicho microorganismo debido a la presencia del gran número de compuestos activos que presenta, sin embargo se considero tóxico sobre cultivos celulares, por lo que se descarta su utilización intraoral en pacientes pediátricos, por lo contrario, se propone someterlo a estudios para su utilización como antiséptico extraoral en pacientes pediátricos que utilicen algún tipo de aparato protésico u ortodóncico. Este tipo de estudios dan pie para futuras investigaciones sobre dicho material vegetal y sus posibles aplicaciones en el área de odontopediatría, siendo una opción más para uso medicinal basado en productos naturales.

LITERATURA CITADA

Addy M, Shaw WC, Hansford, P, Hopkins M. The effect of orthodontic appliances on the distribution of *Candida* and plaque in adolescents. *Br J Orthod*. 1982;9(3):158-163.

Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002;78(922):455-459.

Alcantara YM, Tejada AE, Ros GB. Effect of different concentrations of pulverized mesocarp of *Citrus paradisi* Macf. on the bromatological characteristics of spray-dried lemon juice powder. *Food Sci Nutr*. 2018;6(5):1261-1268.

Ali A, Zafar H, Zia M, Ul Haq I, Phull AR, Ali JS, Hussain A. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl*. 2016;19(9):49-67.

Angius F, Floris A. Liposomes and MTT cell viability assay: an incompatible affair. *Toxicol In Vitro*. 2015;29(2):314-319.

Arendorf T, Addy M. Candidal carriage and plaque distribution before, during and after removable orthodontic appliance therapy. *J Clin Periodontol*. 1985;12(5):360-368.

Arikan V, Kizilci E, Ozalp N, Ozcelik B. Effects of fixed and removable space maintainers on plaque accumulation, periodontal health, candidal and *Enterococcus faecalis* carriage. *Med Princ Pract*. 2015;24(4):311-317.

Avello LM, Cisternas FI. Origins and situation of phytotherapy in Chile. *Rev Med Chil*. 2010;138(10):1288-93.

Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *JPA*. 2016;6(2):71-79.

Bardaweel SK, Tawaha KA, Hudaib MM. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of *Anthemis palestina* essential oil. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14(1):297-304.

Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45(4):493-496.

Behzadi P, Behzadi E, Ranjbar R. Pediatric oral thrush. *Revistă de Educație Medicală Continuă*. Anul X. 2014;(34):36-39.

Bona E, Cantamessa S, Pavan M, Novello G, Massa N, Rocchetti A, Gamalero E. Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents?. *J Appl Microbiol*. 2016;121(6):1530-1545.

Boncler M, Różalski M, Krajewska U, Podsędek A, Watala C. Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2014;69(1):9-16.

Churata Oroya, DE, Ramos Perfecto D, Moromi Nakata H, Martínez Cadillo E, Castro Luna A, Garcia de la Guarda R. Antifungal effect of citrus paradisi “grapefruit” on strains of *Candida albicans* isolated from patients with denture stomatitis. *Rev Estomatol Herediana*. 2016;26(2):78-84.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; Approved Guideline-Second edition M44-A2. CLSI. 2009;29(17): ISSN 0273-3099.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast; 4th ed. M27. CLSI. 2017;37(13): ISSN 2162-2914.

Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(4):564-582.

Cristóbal Luna JM, Álvarez González I, Madrigal Bujaidar E, Cevallos GC. Grapefruit and its biomedical, antigenotoxic and chemopreventive properties. *Food Chem Toxicol*. 2018;112:224-234.

Cruz Carrillo A, Rodríguez NN, Rodríguez CE. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 2010;13(2):117-124.

Domínguez XA, Balick MJ, Ciccio JF, Joel DM, Marbach I, Mayer AM, Hilton JJ. *Métodos de investigación fotoquímica*. México: Centro Regional de Ayuda Técnica. 1973.

Flynn PM, Cunningham CK, Kerkering T, San Jorge AR, Peters VB, Pitel PA, Robinson P. Oropharyngeal candidiasis in immunocompromised children: a randomized, multicenter study of orally administered fluconazole suspension versus nystatin. *J Pediatr*. 1995;127(2):322–328.

García Cuesta C, Sarrion Pérez MG, Bagán JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *J Clin Exp Dent*. 2014;6(5):e576-82.

Grela E, Ząbek A, Grabowiecka A. Interferences in the optimization of the MTT assay for viability estimation of *Proteus mirabilis*. *AJMB*. 2015;7(4):159–167.

Grela E, Kozłowska J, Grabowiecka A. Current methodology of MTT assay in bacteria—A review. *Acta Histochem*. 2018;120(4):303-311.

Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Musotto GC, Giangreco R. In vitro antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. *J Periodontol.* 1997;68(8):729-733.

Hernández Solis SE, Rueda Gordillo F, Flota Alcocer AD, Agullar Ayala FJ, Rodríguez Fernández MDS, Lama González EM. Influencia de la aparatología ortodóntica sobre la ocurrencia de *Candida* spp. en la cavidad oral. *Rev Chilena Infectol.* 2016;33(3):293-297.

Hoppe JE. Treatment of oropharyngeal candidiasis and candidal diaper dermatitis in neonates and infants: review and reappraisal. *Pediatr Infect Dis J.* 1997;16(9):885–894.

Hulla JE, Sahu SC, Hayes AW. Nanotechnology History and future. *Hum Exp Toxicol.* 2015;34(12):1318-1321.

Hung WL, Suh JH, Wang Y. Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit. *J Food Drug Anal.* 2017;25(1):71-83.

Jabra Rizk MA1, Torres SR, Rambob I, Meiller TF, Grossman LK, Minah G. Prevalence of oral *Candida* species in a North American pediatric population. *J Clin Pediatr Dent.* 2007;31(4):260-3.

Jahn B, Martin E, Stueben A, Bhakdi S. Susceptibility testing of *Candida albicans* and *Aspergillus* species by a simple microtiter menadione-augmented 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay. *J Clin Microbiol.* 1995;33(3):661-667.

Kashem SW, Igyarto BZ, Gerami-Nejad M, Kumamoto Y, Mohammed JA, 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.

Knight SA, Dancis A. Reduction of 2, 3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT) is dependent on CaFRE10 ferric reductase for *Candida albicans* grown in unbuffered media. *Microbiology*. 2006;152(8):2301-2308.

Kozinn PJ, Taschdjian CL, Wiener H. Incidence and pathogenesis of neonatal candidiasis. *Pediatrics*. 1958;21(3):421-429.

Krol DM, Keels MA. Oral conditions. *Pediatrics in Review*. 2007;28(1):15-22.

Langeveld WT, Veldhuizen EJ, Burt SA. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit Rev Microbiol*. 2014;40(1):76-94.

Liébana Ureña J. *Microbiología oral*. 2ª ed. España: McGraw-Hill Interamericana. 2002.

Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:1161-1171.

Mohamadi J, Motaghi M. Anti-fungal resistance in *Candida* isolated from oral and diaper rash candidiasis in neonates. *Bioinformation*. 2014;10(11):667-70.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.

Mosquera OM, González LM, Cortés YJ, Camargo JC. Caracterización Fitoquímica, Determinación del Contenido de Lignina y la Actividad Antioxidante de los Culmos de *Guadua Angustifolia* Kunth. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*. 2016;11(2):124-135.

Nevzatoglu S, Küçükkeles N, Kadir T. Frecuencia de la *Candida albicans* en niños que utilizan aparatos de ortodoncia removible. *Rev Esp Ortod*. 2011;41:49-53.

Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69:71-92.

Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(2):96-108.

Paoli M, de Rocca Serra D, Tomi F, Luro F, Bighelli A. Chemical composition of the leaf essential oil of grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) in relation with the genetic origin. *J Essent Oil Res.* 2016;28(4):265-271.

Pardi G, Cardozo EI. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontol Venez.* 2002;40(1):9-17.

Oikeh EI, Omoregie ES, Oviasogie FE, Oriakhi K. Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates. *Food Sci Nutr.* 2016;4(1):103-109.

Ou MC, Liu YH, Sun YW, Chan CF. The composition, antioxidant and antibacterial activities of cold-pressed and distilled essential oils of *Citrus paradisi* and *Citrus grandis* (L.) Osbeck. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2015;2015:1-9.

Ramírez LC, Castañeda AC, Vargas AM. Evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *NOVA.* 2013;11(19):51-63.

Ramirez LS, Castaño DM. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica.* 2009;2(42):263-268.

Ramirez LS, Diaz HE. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et Technica.* 2007;1(33):397-400.

Roco MC. Nanoparticles and nanotechnology research. *J. Nanopart. Res.* 1999;1(1):1-6.

Rojas A, Jaramillo J, Lemus B. Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas. 1ª ed. Ecuador: UTMACH. 2015.

Scazzocchio F, Garzoli S, Conti C, Leone C, Renaioli C, Pepi F, Angiolella L. Properties and limits of some essential oils: chemical characterisation, antimicrobial activity, interaction with antibiotics and cytotoxicity. *Nat Prod Res.* 2016;30(17):1909-1918.

Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: An overview. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2014;18(Suppl 1);S81–S85.

Stepanenko AA, Dmitrenko VV. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene.* 2015;574(2):193-203.

Taroco R, Seija V, Vignoli, R. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 2ª ed. Uruguay: FEFMUR. 2006.

Torrenegra Alarcón ME, Pájaro NP, Méndez GL. Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de diferentes especies del género Citrus. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2017;46(2):160-175.

Torres López MC, Díaz Álvarez M, Acosta Morales A. La clorhexidina, bases estructurales y aplicaciones en la estomatología. *GME.* 2017;11(1):8-15.

United States Department of Agriculture (USDA). Agricultural Research Service, National Nutrient Database for Standard Reference. Release 28. 2015.

Woong Kim S. Phytotherapy: emerging therapeutic option in urologic disease. *Transl Androl Urol.* 2012;1(3):181-191.

Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T, Liu X, Wu N. Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules*. 2010;15(5):3200-3210.