

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICÓTICO Y DE CITOTOXICIDAD DE
Pelargonium zonale CONTRA *Candida albicans* ATCC

Por

MARIANA GARZA GARZA

Como requisito parcial para obtener el Grado de

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

Julio, 2023

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

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICÓTICO Y DE CITOTOXICIDAD DE
Pelargonium zonale CONTRA *Candida albicans* ATCC

POR

MARIANA GARZA GARZA

Cómite de examen de tesis

Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis

Secretario

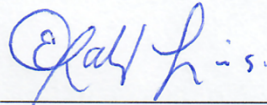
Vocal

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

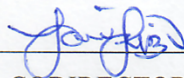
EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICÓTICO Y DE CITOTOXICIDAD DE
Pelargonium zonale CONTRA *Candida albicans* ATCC

**TESISTA
MARIANA GARZA GARZA**

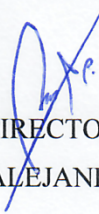
Dirección de Tesis



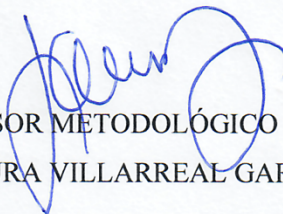
**DIRECTOR DE TESIS
DRA. OSVELIA ESMERALDA RODRÍGUEZ LUIS**



**CODIRECTOR DE TESIS
DRA. SONIA MARTHA LÓPEZ VILLARREAL**



**DIRECTOR EXTERNO
RAYMUNDO ALEJANDRO PÉREZ HERNANDEZ**



**ASESOR METODOLÓGICO
DRA. LAURA VILLARREAL GARCÍA**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, **Arnulfo Garza** y **Araceli Garza**, por darme siempre lo mejor, por apoyarme y ayudarme a cumplir mis sueños. Somos odontopediatras, este logro es para ustedes, gracias por siempre creer en mi. Son mi ejemplo a seguir, espero algún día ser igual de trabajadora y bondadosa como ustedes.

A **Dios**, por todas las bendiciones que derrama sobre mi para que yo pueda cumplir mis metas.

A mis hermanas, **Cynthia Garza** y **Janeth Garza** por siempre estar presentes y alegrarse por mis logros.

A mi prometido, **Gabriel Villarreal**, porque desde el día uno confiaste en mi y me acompañaste en este camino, gracias porque nunca me faltaste, por tu apoyo y por tus palabras de aliento. Eres mi mejor amigo, a tu lado si me aviento unas veinte tesis más.

A mi asesora, **Dra. Osvelia Esmeralda Rodríguez Luis**, por confiar en mi trabajo y por su apoyo brindado durante estos dos años de maestría.

A mi director externo, **Dr. Raymundo Alejandro Pérez Hernández**, por su apoyo, paciencia y conocimiento brindado para que esta investigación pudiera culminar.

A mis maestros y coordinadoras del posgrado, por el aprendizaje transmitido a lo largo de estos dos años y por su apoyo.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT)** por el apoyo brindado a través de la beca # 1150902 para que se pudiera concluir de manera satisfactoria esta investigación.

A la **Facultad de Odontología** por el apoyo brindado, facilitando el laboratorio de microbiología oral.

A la **Facultad de Ciencias Biológicas** por abrirnos sus puertas y por su estupenda atención para la realización de este trabajo.

Al **posgrado de Odontopediatría** por su apoyo y por permitirme experimentar dos años llenos de aprendizaje y experiencias.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	v
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	vi
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xiii
NOMENCLATURA.....	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
3. JUSTIFICACIÓN.....	4
4. HIPÓTESIS.....	5
5. OBJETIVOS.....	6
5.1 Objetivo general.....	6
5.2 Objetivos específicos.....	6
6. ANTECEDENTES	6
6.1 <i>Candida albicans</i>	7
6.1.2 Taxonomía <i>Candida albicans</i>	7
6.2 Factores predisponentes.....	7
6.3 <i>Candida</i> en la cavidad oral.....	8
6.4 Candidiasis en odontopediatría.....	9
6.5 Formación de biopelícula.....	9
6.6 Tratamientos actuales antimicóticos.....	10
6.7 Medicina tradicional en odontología.....	11
6.8 <i>Pelargonium</i>	11
6.9 <i>Pelargonium zonale</i>	12
6.9.1 Grupos químicos presentes en <i>Pelargonium zonale</i>	13
6.9.2 Beneficios de <i>Pelargonium zonale</i>	13
6.9.3 Estudios sobre efectos antimicóticos con plantas.....	14
7.0 Métodos para evaluar <i>in vitro</i> la actividad antimicótica.....	14

7.1 Kirby-Bauer.....	14
8.0 Estudios sobre efectos citotóxicos de las plantas.....	15
7. MATERIAL Y MÉTODOS	18
7.1 Material Vegetal.....	18
7.1.1 Obtención del material vegetal	18
7.1.2 Preparación del material vegetal.....	18
7.1.3 Obtención del extracto	19
7.1.4 Tamizaje fitoquímico preliminar.....	20
7.1.5 Solubilidad del extracto.....	21
7.2 Material biológico... ..	24
7.2.1 Obtención del material microbiológico	24
7.2.2 Identificación y activación de las cepas	24
7.2.3 Siembra por aislamiento.....	24
7.2.4 Tinción de gram.....	24
7.2.5 Activación de las cepas.....	25
7.2.6 Evaluación de la actividad antimicótica.....	26
7.2.7 Evaluación citotóxica.....	26
8. RESULTADOS	28
8.1 Rendimiento del extracto.....	28
8.2 Tamizaje fitoquímico parcial.	28
8.3 Solubilidad del extracto.....	29
8.4 Identificación de la cepa <i>Candida albicans</i>	29
8.5 Efecto antimicótico in vitro.....	29
8.6 Evaluación citotóxica.....	30
9. DISCUSIÓN.....	31
10. CONCLUSIONES	33
11. PERSPECTIVAS A FUTURO.....	34
12. LITERATURA CITADA	35

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
<i>I.</i> Métodos químicos para la identificación de sustancias activas del extracto de <i>P. zonale</i>	21
<i>II.</i> Identificación de sustancias activas del extracto de <i>P. zonale</i>	28
<i>III.</i> Solubilidad del extracto.....	29
<i>IV.</i> Efecto antimicótico del extraco de <i>P. zonale</i> contra <i>C. abicans</i> ATCC.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>Candida albicans</i>	7
2. Método de Kirby-Bauer.....	15
3. Planta <i>P. zonale</i>	18
4. Planta triturada.....	19
5. Planta seca.....	19
6. Método de realización de la extracción por Soxhlet.....	20
7. Muestras en tubo de ensayo.....	21
8. Pruebas de solubilidad.....	24
9. Procedimiento de la tinción de gram.....	25
10. <i>C. albicans</i> observada posterior a la tinción de gram a 40x en microscopio óptico	25
11. Método de la técnica de hemólisis sobre eritrocitos humanos.....	27
12. <i>C. albicans</i> observada a las 24 horas.....	29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfica	Página
1. Efecto citotóxico de extracto <i>P. zonale</i> sobre eritrocitos humanos.....	30

NOMENCLATURA

g	Gramos
mm	Milímetros
ml	Mililitros
mg	Miligramos
μL	Microlitros
mg	Microgramos
rpm	Revoluciones por minuto
nm	Nanometro
KmnO₄	Permanganato de potasio
FeCl₃	Cloruro de hierro
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
NaOH	Hidróxido de sodio
Bi(NO₃)₃	Nitrato de bismuto
NaHCO	Bicarbonato de sodio
CH₂O	Formaldehído
TNF-α	Factor de necrosis tumoral

TESISTA: MARIANA GARZA GARZA
DIRECTOR DE TESIS: OSVELIA ESMERALDA RODRÍGUEZ LUIS
CODIRECTOR DE TESIS: SONIA MARTHA LÓPEZ VILLARREAL
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICÓTICO Y DE CITOTOXICIDAD DE
Pelargonium zonale CONTRA *Candida albicans* ATCC

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Candida albicans* es un microorganismo responsable de micosis orales en el 44.4% de pacientes pediátricos inmunosuprimidos. En odontopediatria las infecciones por éste microorganismo son muy frecuentes, ocasionando molestias en mucosa oral, está asociada a caries, y trastornos sistémicos. Es un microorganismo que ha desarrollado resistencia a los agentes terapéuticos convencionales. Las plantas medicinales pueden contener compuestos con actividad antifúngica y sin efectos adversos asociados a los fármacos. **OBJETIVO:** Evaluar el efecto antimicótico del extracto de *Pelargonium zonale* contra *Candida albicans* ATCC y su efecto citotóxico sobre eritrocitos humanos. **METODOLOGÍA:** Se realizó el extracto metanólico mediante el método Soxhlet. Se realizó la caracterización fitoquímica preliminar mediante pruebas colorimétricas. Se analizó el efecto antimicótico contra *Candida albicans* ATCC mediante la técnica de difusión en disco desde 15-100 µg/mL, identificando el halo de inhibición, comparándolo con los controles, realizado por triplicado. Posteriormente se determinó la actividad citotóxica del extracto mediante la técnica de inhibición de hemólisis en eritrocitos humanos. **RESULTADOS:** El rendimiento obtenido del extracto metanólico de *Pelargonium zonale* fue de 6.5g, en la caracterización fitoquímica parcial fue positivo a instauraciones, carbonilo, taninos, esteroides, terpenos, saponinas, flavonoides y alcaloides. En el ensayo de susceptibilidad bacteriana el extracto no presentó inhibición del crecimiento de *C. albicans* ATCC bajo las condiciones experimentales analizadas, y se estudió además la actividad hemolítica mediante la técnica de hemólisis en eritrocitos humanos y el extracto no indujo hemólisis, por lo tanto no fue tóxico sobre eritrocitos humanos. **CONCLUSIONES:** El extracto no presentó acción antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC y no mostró efecto de toxicidad sobre eritrocitos humanos.

PALABRAS CLAVE: *Candida albicans*, *Pelargonium zonale*, citotoxicidad, odontopediatria, antimicótico.

TESISTA: MARIANA GARZA GARZA

DIRECTOR DE TESIS: OSVELIA ESMERALDA RODRÍGUEZ LUIS

CODIRECTOR DE TESIS: SONIA MARTHA LÓPEZ VILLARREAL

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICÓTICO Y DE CITOTOXICIDAD DE

Pelargonium zonale CONTRA *Candida albicans* ATCC

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Candida albicans* is a microorganism responsible for oral mycoses in 44.4% of immunosuppressed pediatric patients. In pediatric dentistry, infections by this microorganism are very frequent, causing discomfort in the oral mucosa, it is associated with caries, and systemic disorders. It is a microorganism that has developed resistance to conventional therapeutic agents. Medicinal plants may contain compounds with antifungal activity and no adverse drug-associated effects. **OBJECTIVE:** To evaluate the antifungal effect of *Pelargonium zonale* extract against *Candida albicans* ATCC and its cytotoxic effect on human erythrocytes. **METHODOLOGY:** The methanolic extract was made using the Soxhlet method. The preliminary phytochemical characterization was carried out by means of colorimetric tests. The antifungal effect against *Candida albicans* ATCC was analyzed using the disk diffusion technique from 15-100 µg/mL, identifying the inhibition halo, comparing it with the controls, carried out in triplicate. Subsequently, the cytotoxic activity of the extract was determined using the hemolysis inhibition technique in human erythrocytes. **RESULTS:** The yield obtained from the methanolic extract of *Pelargonium zonale* was 6.5g, in the partial phytochemical characterization it was positive for saturations, carbonyl, tannins, steroids, terpenes, saponins, flavonoids and alkaloids. In the bacterial susceptibility assay, the extract did not present inhibition of the growth of *C. albicans* ATCC under the analyzed experimental conditions, and the hemolytic activity was also studied using the hemolysis technique in human erythrocytes and the extract did not induce hemolysis, therefore it did not it was toxic on human erythrocytes. **CONCLUSIONS:** The extract did not present antifungal action against *Candida albicans* ATCC and did not show a toxic effect on human erythrocytes.

KEY WORDS: *Candida albicans*, *Pelargonium zonale*, cytotoxicity, pediatric dentistry, antifungal.

1. INTRODUCCIÓN

Las terapias a base de hierbas se utilizan a nivel mundial para tratar problemas de salud. En México, generaciones han usado las hierbas para tratar gingivitis, periodontitis, infecciones bucales, dientes descoloridos (Cruz et al., 2017), halitosis, candidiasis, herpes simples, entre otras enfermedades (Taheri et al., 2011).

La candidiasis es la infección oportunista más usual de la mucosa oral. En la cavidad oral, las infecciones asociadas a *Candida* se denominan candidiasis orales, de las que existen cuatro presentaciones clínicas principales. Algunos factores locales y sistémicos pueden desencadenar esta enfermedad como el contenido y la cantidad de la saliva, los fármacos inmunosupresores, el uso de las prótesis dentales sin un buen control de higiene y el padecimiento de enfermedades metabólicas así como malnutrición, tabaquismo, higiene oral inadecuada, quimioterapia y radioterapia de la región maxilofacial y los aparatos ortodóncicos fijos.

En odontopediatría, estudios clínicos han demostrado una fuerte asociación de *Candida albicans* con la caries temprana de la infancia. Las infecciones por candidiasis son las más frecuentes, con un 44,4% en pacientes pediátricos inmunosuprimidos, y es un hongo común en la cavidad oral del 62% de los niños en edad preescolar y del 71% de los niños en edad escolar. Esta infección micótica tiene como consecuencia enfermedades micóticas como la queilitis angular o lesiones cremosas blancas pudiendo causar en el niño una sensación de ardor, falta de apetito, sangrado o inflamación. El tratamiento para este padecimiento consiste en fármacos antifúngicos, sin embargo, algunas cepas han desarrollado farmacoresistencia, es por eso que se propone evaluar con la fitoterapia el efecto sobre *C. albicans* en la búsqueda de una alternativa de tratamiento para la candidiasis oral complementaria.

El *pelargonio* (*geranio*) pertenece a la familia de las *geraniáceas* y se ha visto que tradicionalmente los extractos de estas especies tienen actividades antioxidantes y antimicrobianas, convirtiéndose en prometedores agentes naturales con potencial propósito medicinal.

Los fármacos antimicóticos que comúnmente se utilizan para tratar la candidiasis oral son el fluconazol, el itraconazol, el ketoconazol, la nistatina y el miconazol, pero estos pueden tener complicaciones y desventajas como toxicidad, reacciones alérgicas y resistencia. Las plantas medicinales pueden contener sustancias antifúngicas prometedoras debido a sus propiedades

seguras, estas se utilizan como terapia alternativa para tratar diversas afecciones orales, proporcionando un sustituto potencialmente seguro y rentable de los medicamentos sintéticos.

¿El extracto de *Pelargonium zonale* presenta efecto antimicótico contra la especie de *Candida albicans* ATCC en boca y baja citotoxicidad?

Debido a que la candidiasis oral es un padecimiento micótico muy frecuente en la población infantil, este proyecto pretende analizar la propiedad antimicótica de *Pelargonium zonale* para identificar su acción contra *Candida albicans* ATCC, y su efecto citotóxico debido a que no hay reportes científicos y con los resultados obtenidos se pretende dejar un precedente para valorar su posible aplicación como alternativa complementaria, accesible, de bajo costo que contribuya a disminuir la resistencia a los medicamentos convencionales en odontopediatría.

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto antimicótico del extracto de *Pelargonium zonale* contra *Candida albicans* ATCC y su efecto citotóxico sobre eritrocitos humanos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los fármacos antimicóticos que comúnmente se utilizan para tratar la candidiasis oral son el fluconazol, el itraconazol, el ketoconazol, la nistatina y el miconazol, pero estos pueden tener complicaciones y desventajas como toxicidad, reacciones alérgicas y resistencia. Las plantas medicinales pueden contener sustancias antifúngicas prometedoras debido a sus propiedades seguras, estas se utilizan como terapia alternativa para tratar diversas afecciones orales, proporcionando un sustituto potencialmente seguro y rentable de los medicamentos sintéticos.

¿El extracto de *Pelargonium zonale* presenta efecto antimicótico contra la especie de *Candida albicans* ATCC en boca y baja citotoxicidad?

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la candidiasis oral es un padecimiento micótico muy frecuente en la población infantil, este proyecto pretende analizar la propiedad antimicótica de *Pelargonium zonale* para identificar su acción contra *Candida albicans* ATCC, y su efecto citotóxico debido a que no hay reportes científicos y con los resultados obtenidos se pretende dejar un precedente para valorar su posible aplicación como alternativa complementaria, accesible, de bajo costo que contribuya a disminuir la resistencia a los medicamentos convencionales en odontopediatría.

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto antimicótico del extracto de *Pelargonium zonale* contra *Candida albicans* ATCC y su efecto citotóxico sobre eritrocitos humanos.

4. HIPÓTESIS

El extracto de *Pelargonium zonale* posee actividad antimicótica contra *Candida albicans* ATCC y no presenta citotoxicidad.

5. OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General

Evaluar *in vitro* el efecto antimicótico del extracto de *Pelargonium zonale* contra *Candida albicans* ATCC y su citotoxicidad sobre eritrocitos humanos.

3.2.- Objetivos Específicos

- a) Obtención del extracto de *Pelargonium zonale* mediante el método de Soxhlet.
- b) Realizar la caracterización cualitativa del extracto de *Pelargonium zonale* mediante tamizaje fitoquímico preliminar.
- c) Evaluar *in vitro* el efecto antimicótico del extracto de *Pelargonium zonale* contra *Candida albicans* ATCC mediante el método de Kirby-Bauer.
- d) Determinar *in vitro* la toxicidad del extracto de *Pelargonium zonale* por medio de el ensayo de hemólisis en eritrocitos humanos.

6. ANTECEDENTES

6.1 *Candida albicans*

Candida albicans es el patógeno fúngico humano mejor estudiado y más prevalente (Berman 2012) este hongo posee una serie de propiedades de virulencia que contribuyen significativamente a la patogenicidad, y a la capacidad de adherirse firmemente a las células huésped, secretar enzimas degradantes, formar biopelículas, evadir el sistema inmunitario y cambiar de fenotipo (Kadosh 2016), tiene la capacidad de formar biopelículas altamente estructuradas compuestas de distintos tipos de células como células redondas en forma de levadura en gemación, células ovales de pseudohifas y células de hifas alargadas contenidas en una matriz extracelular (Gulati, Nobile 2016), también es capaz de crecer vegetativamente *in vitro* e *in vivo* (Mukaremera et al., 2017), es una especie dimórfica que puede crecer como levadura o formas filamentosas, y es una de las dos únicas especies de *Candida* capaz de formar hifas verdaderas (McManus et al., 2014), su genoma consta de ocho pares de homólogos cromosómicos (Chibana et al., 2000).

6.1.2 Taxonomía *Candida albicans*.

Reino: Hongo

Clase: Blastomycetes

Familia: Cryptococcaceae

Género: *Candida*

Especies: *albicans* (figura 1)

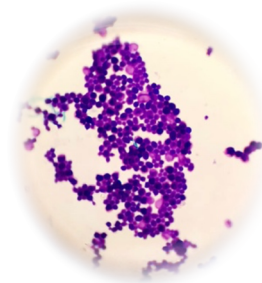


Figura 1. *Candida albicans*

6.2 Factores predisponentes

Candida albicans suele ser inofensivo, oportunista, y se mantiene en equilibrio con otros miembros de la microbiota local. Sin embargo, las alteraciones en la microbiota del huésped, los cambios en la respuesta inmunitaria del huésped, alteraciones en el entorno local (p. ej., cambios en el pH o el contenido nutricional) puede permitir que *C. albicans* se multiplique demasiado y cause infección, siendo graves en personas inmunocomprometidas y pacientes sanos con accesorios como los dispositivos médicos implantados (Nobile, Johnson 2015)(Wang 2015). La colonización patológica de esta especie está relacionada con una serie de factores que incluyen: edades avanzadas, desnutrición, enfermedades metabólicas, infecciones concurrentes, terapia

antibacteriana, condiciones de inmunocompromiso, radioterapia, pacientes trasplantados, hipofunción de las glándulas salivales y terapia de esteroides a largo plazo (Hellstein, Marek., 2019).

6.3 *Candida* en la cavidad oral

Se reporta que *C. albicans* y otras especies de *Candida* están presentes en la cavidad oral de hasta el 75% de la población, estas infecciones orales con especies de *Candida* se denominan “candidiasis oral”. Dichas infecciones son causadas predominantemente por *C. albicans* y pueden afectar la orofaringe y/o el esófago (Mayer et al., 2013).

La candidiasis es la infección oportunista más frecuente de la mucosa oral. Estudios anteriores han demostrado que la prevalencia oral de este organismo en individuos sanos es de entre 1.9 % y 62.3 % (Khozeimeh et al., 2014).

Cuatro distintas formas clínicas de la candidiasis oral son la candidiasis eritematosa crónica y aguda, candidiasis pseudomembranosa y candidiasis hiperplásica crónica (Morse et al., 2019).

La candidiasis eritematosa se caracteriza por la erupción de eritema (Sakaguchi, 2017), consistentemente dolorosas junto con atrofia papilar central de la lengua (R, Rafiq ., 2023) y en el borde lateral de la lengua (da Costa et al., 2022).

La candidiasis pseudomembranosa se distingue por la presencia de grumos o placas de color blanco amarillento de consistencia blanda o gelatinosa que crecen de forma centrífuga en Las cualquier parte de la mejilla o mucosa orofaríngea o lengua. (Gómez et al., 2021).

La candidosis hiperplásica crónica se considera un término clínico-patológico que alberga una lesión blanca intraoral generada por una infección fúngica persistente, comúnmente *Candida albicans*. Se han descrito dos presentaciones clínicas de esta entidad: una forma homogénea caracterizada por una placa blanca aislada, adherente y espesa y una forma nodular/moteada que surge con múltiples nódulos blancos sobre un fondo eritematoso. Esta lesión aparece comúnmente en la mucosa bucal poscomisural, la superficie superior de la lengua y el velo de los usuarios de prótesis dentales (Lorenzo et al., 2022).

Esta enfermedad se encuentra dominada por *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* y *C. krusei*, que son especies de *Candida* resistentes que pueden verse en la región oral y que contribuyen al proceso de la enfermedad (Özdal et al., 2021).

C. albicans y las bacterias orales han sido bien documentadas en caries dental, mucositis oral, enfermedades endodónticas y periodontales, infecciones relacionadas con implantes y cáncer oral, este hongo interactúa con las bacterias orales coexistentes a través de la unión física, las señales extracelulares y la alimentación cruzada metabólica (Du et al., 2022).

6.4 Candidiasis en odontopediatría

Las especies de *Candida* conforman la flora habitual de las mucosas del ser humano, estas residen como parte de la flora normal de la cavidad oral en aproximadamente el 66% de la población pediátrica conocida como portadora (Rafat et al., 2021).

La candidiasis es muy frecuente en la infancia, se ha observado que la candidiasis eritematosa crónica es la enfermedad fúngica oportunista más común que ocurre en la cavidad bucal y se ha estimado que al menos 5% de los recién nacidos pueden desarrollar esta enfermedad (Lyu et al., 2021), y alrededor del 37 % de los bebés recién nacidos pueden verse afectados por candidiasis durante los primeros tres meses de vida, al igual que los infantes que usan esteroides inhalados ya que ellos también tienen una mayor incidencia de candidiasis oral (R, Rafiq ,. 2023). Esta infección suele ocurrir en lactantes a través de senos colonizados del hongo durante la lactancia manifestándose en la boca del lactante como candidiasis pseudomembranosa aguda (Taylor et al., 2023).

Candida albicans es un hongo patógeno oportunista común presente en la cavidad oral del 62 % de los niños en edad preescolar y del 71 % de los niños en edad escolar. Estudios previos han demostrado que *C. albicans* tiene la capacidad de colonizar la dentina y el esmalte y funciona como un reservorio para la propagación del microorganismo (Yang et al., 2022).

Se ha demostrado una fuerte asociación de *C. albicans* con la caries temprana de la infancia, ya que se ha informado que los niños colonizados por *C. albicans* tienen un riesgo mayor de desarrollar caries temprana de la infancia que los que no están infectados. Además, es bien sabido que la coinfección con *Streptococcus mutans* y *C. albicans* está fuertemente asociada a la caries severa en niños (García et al., 2021).

6.5 Formación de biopelícula

Una biopelícula microbiana está conformada por comunidades de células que se unen a superficies sólidas o están presentes en las interfaces líquido-aire, estas biopelículas se

consideran el estado de desarrollo más común para muchas especies microbianas (Lohse et al., 2018).

En el caso de *C. albicans* el desarrollo de la biopelícula ocurre progresivamente y generalmente se clasifica en cuatro etapas; i) adsorción y adhesión de células de levadura *C. albicans* a un sustrato, ii) formación de microcolonias y producción de matriz extracelular, iii) maduración y iv) dispersión de células del biofilm maduro (Ponde et al., 2021).

Esta biopelícula complica el tratamiento de estas infecciones micóticas en un número cada vez mayor de pacientes (Wall et al., 2019).

6.6 Tratamientos antimicóticos actuales

Los tratamientos de la candidiasis bucal consisten de higiene bucal adecuada, agentes tópicos y medicamentos sistémicos (Millsop, Fazel., 2016).

El tratamiento tópico es la primera opción para los casos leves de candidiasis oral, que generalmente responden bien a este abordaje (nistatina o miconazol), si hay diseminación fúngica o resistencia al tratamiento tópico se debe considerar el tratamiento sistémico (Kessler et al., 2022)(Akpan, Morgan., 2002).

Actualmente se utilizan como tratamientos agentes antifúngicos dirigidos a la membrana celular, la pared celular o los ácidos nucleicos, teniendo complicaciones como toxicidad, reacciones alérgicas y resistencia (Mardani, Kamrani 2021), los medicamentos que suelen recomendarse son la nistatina, miconazol, fluconazol y ketoconazol. Sin embargo, el uso de estos fármacos por sí solos puede ser insuficiente para especies de *Candida* resistentes (Özdal et al., 2021).

El término resistencia se puede definir como una cepa que tiene una concentración inhibitoria mínima (MIC) para un antifúngico particular superior a los puntos de corte clínicos específicos; la resistencia también se puede usar de manera más amplia para indicar una cepa con un aumento en la MIC a un fármaco antimicótico en relación con una cepa de control o de referencia (Lee et al., 2021).

La resistencia a los antifúngicos es particularmente problemática ya que hay pocos fármacos antifúngicos disponibles (Cannon *et al.*, 2007) y el uso prolongado de fármacos antifúngicos por parte de los pacientes da lugar a la aparición de cepas de *C. albicans* resistentes, lo que las hace

menos susceptibles a los fármacos (Pereira et al., 2021) y actualmente se ha visto que las infecciones causadas por especies de *Candida* que se han tratado con azoles, la familia más grande de medicamentos antimicóticos, la resistencia a los azoles ha aumentado en las especies de *Candida*, tanto en entornos clínicos como *in vitro* (Pristov, Ghannoum., 2019).

6.7 Medicina tradicional en odontología

La medicina tradicional según la OMS se enfoca a prácticas y creencias sanitarias diversas que integran medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales para conservar el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades; los extractos de plantas o sus componentes activos se utilizan como medicina popular en terapias tradicionales por el 80% de la población mundial (OMS, 2013).

Desde tiempos inmemoriales, diferentes poblaciones alrededor del mundo han practicado medidas de higiene a base de hierbas. Se ha reportado el uso de extractos a base de plantas para el tratamiento de diversos trastornos y para mantener una buena salud a través de las experiencias de la cotidianidad de la vida. Esta medida de higiene, se practica en el resto del mundo como medicina alternativa o complementaria y aparte de esto, debido a la ausencia de alcohol y/o azúcar, los enjuagues bucales a base de hierbas pueden ser preferibles en los niños del grupo de alto riesgo de caries (Mishra et al., 2016).

Los aceites esenciales, extractos y otros derivados vegetales se encuentran entre las alternativas más evaluadas, siendo una opción atractiva ya que brindan la posibilidad de lograr mejores efectos terapéuticos con menor toxicidad y por sus múltiples posibilidades de uso: sistémico, tópico y como antiséptico en superficies abióticas (Loaiza et al., 2022).

Las plantas medicinales y los nutracéuticos como el ajo, el té verde, el propóleo, la curcumina, la raíz de regaliz, la canela, el resveratrol, el jengibre y la berberina son beneficiosos en el tratamiento de *C. albicans* en la candidiasis oral y se han considerado como una opción de gestión segura, accesible y económica en un intento de prevenir y tratar las enfermedades orales (Gharibpour et al., 2021).

6.8 *Pelargonium*

El valor de las plantas del género *Pelargonium* en la medicina tradicional está bien documentada (Hamed et al., 2015). Se han hecho investigaciones clínicas *in vitro* que sugieren que el extracto

de raíz de la especie *Pelargonium* tiene actividades antivirales e inmunomoduladoras, que minimizan la gravedad de los síntomas y la duración de la enfermedad causada por infecciones con varios virus de las vías respiratorias superiores (Papies et al., 2021). Por ejemplo, la planta *Pelargonium sidoides* se ha utilizado contra los trastornos gastrointestinales e infecciones del tracto respiratorio como bronquitis aguda, asma, sinusitis y faringoamigdalitis (Moyo, Van Staden., 2014), *Pelargonium graveolens* ha demostrado tener efectos antibacterianos, antioxidantes, antidiabéticos, antiinflamatorios y dermatoprotectores (Al-Mijalli et al., 2022), en el caso de *Pelargonium peltatum* se ha descrito actividad biológica frente a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus tanguinis* (Alonso et al., 2022).

6.9 *Pelargonium zonale*

La especie de *Pelargonium*, miembro de la familia Geraniaceae, comprenden alrededor de 750 especies de las cuales aproximadamente el 80% del género es autóctono de Sudáfrica (Cumaoglu et al., 2018).

P. zonale pertenece a la familia Geraniaceae. A menudo se le llama "geranio", "geranio zonale" o "pelargonium zonale". Las hojas de *Pelargonium* tienen un agradable aroma a limón que se usa ampliamente como agente aromatizante en formulaciones de jabones, postres de frutas, helados, pasteles y jaleas. El extracto de *P. zonale* tiene varias ventajas como actividad antioxidante, propiedades antimicrobianas e inhibición del crecimiento bacteriano (Alqahtani et al., 2022) (Şöhretoğlu et al., 2011).

Los extractos de las especies de geranio basándose en el alto contenido de polifenoles y las pronunciadas actividades antioxidantes y antimicrobianas, son prometedores agentes naturales con potencial propósito medicinal (Ilić et al., 2021).

Se ha visto que el extracto de tallo de *P. Zonale* tiene actividad contra *C. albicans* manifestada por una disminución de la actividad metabólica y cambios en la morfología celular, también actividad antitumoral manifestada por un efecto citopático en las células HeLa siendo un material prometedor para obtener un compuesto con acción antifúngica y para el aislamiento de compuestos antifúngicos y anticancerígenos (Lewtak et al., 2014).

6.9.1 Grupos químicos presentes en *Pelargonium zonale*

Los remedios a base de hierbas fueron las primeras medicinas utilizadas por los humanos debido a los metabolitos secundarios activos producidos por las plantas (Buyel, 2018), de hecho, son estos metabolitos los que forman la base de muchos fármacos comerciales, así como de remedios herbales derivados de plantas medicinales (Li et al., 2020). El metabolismo secundario de las plantas se define como un término para las vías y los productos del metabolismo de moléculas pequeñas que no son esenciales para la supervivencia del organismo. En la naturaleza, una variedad de vías de metabolismo secundario provocaron una variedad de compuestos defensivos de las plantas llamados metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios de las plantas generalmente se clasifican según su estructura química. Varios grupos de moléculas grandes, incluidos ácidos fenólicos y flavonoides, terpenoides y esteroides, y alcaloides, han sido implicados en la activación y refuerzo de los mecanismos de defensa en las plantas (Yang et al., 2018).

Existen tres grupos principales de metabolitos secundarios en las plantas: compuestos que contienen nitrógeno (glucósidos, alcaloides y glucosinolatos cianogénicos), compuestos fenólicos (flavonoides y fenilpropanoides) y terpenos (isoprenoides), saponinas, alcaloides, lignina, fitoesteroles y taninos (Li et al., 2020).

El pelargonio en sus hojas contiene taninos, flavonoides, sesquiterpenos, ácido fenólico, ácido cinámico, cumarina y monoterpenos (Fardsadeh et al., 2019), el extracto de las raíces contiene compuestos secundarios, como derivados de la cumarina, ácido gálico y sus ésteres, flavonoides, flavan-3-aceites (catequinas) y fitoesteroles (Ciprandi et al., 2021), y en sus hojas también se ha visto la presencia de lignanos (Alqahtani et al., 2022).

6.9.2 Beneficios de *Pelargonium Zonale*

Entre los beneficios que podemos obtener de esta planta se ha reportado que acorta el tiempo de hemorragia, pudiéndose utilizar como agente hemostático natural tópico, que probablemente no sea tóxico, económico y fácilmente disponible (Páez, Hernández 2003).

También se ha reportado el uso de algunas especies de la familia de las geraniáceas en la medicina herbolaria como antiinflamatorio, analgésico, ansiolítico, para el tratamiento de problemas viliares, cutáneos, cardiovasculares, gastrointestinales, respiratorios y problemas bucales

(Sharma *et al.*, 2017). Otro beneficio es que la liberación de TNF- α y óxidos nítricos, estimula el interferón- β e incrementa la actividad de las células asesinas naturales (Ciprandi *et al.*, 2021). En un estudio, el extracto metanólico de *P. zonale* tuvo en su composición derivados de cianidol y quercetol, todos conocidos como fuertes agentes protectores celulares, así como capacidad antioxidante por la gran presencia de polifenoles que obtuvo (Iancu *et al.*, 2016).

6.9.3 Estudios sobre acción antimicótica con plantas

En un estudio se evaluó la actividad antifúngica del ajo, la canela, hierba limón y el tulsi en polvo y en aceite a diferentes concentraciones sobre *Candida albicans*. La zona de inhibición máxima fue de 42 mm a concentraciones del 50% para el aceite de hierba de limón y la canela de 40 mm. El aceite de limoncillo y canela muestran un buen efecto antifúngico contra *C. albicans* (Prajapati *et al.*, 2021).

Se compararon los efectos de diferentes aceites esenciales contra aislados resistentes y susceptibles a los azoles, para lo cual se evaluaron 20 cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol y 20 susceptibles obtenidas de tejidos orales, vaginales y cutáneos de pacientes con candidiasis. La eficacia y las concentraciones inhibitorias mínimas de los aceites esenciales de *Zataria multiflora* y *Allium heamanthoides* contra *C. albicans* fueron más eficaces que *Geranium herbarum*, *Artemisia sieberi*, *Lavendula officinalis*, *Cuminum*, *cuminum* (Katirae *et al.*, 2017). Mediante la técnica de difusión en disco Karkouri *et al.*, demostraron la actividad antifúngica del aceite esencial de *Cistus ladanifer* contra cepas de hongos diferentes de *Candida*. En relación con la actividad del aceite esencial, *C. tropicalis* y *C. neoformans* fueron las más sensibles con una zona de inhibición de 13 mm, y luego *C. dubliniensis* y *C. glabrata* con zonas de inhibición de 11 mm (El Karkouri *et al.*, 2021).

Se ha demostrado que *Pelargonium roseum* tiene efecto antimicótico contra *Candida albicans* debido a que se observó la inhibición del desarrollo de este (Carmen *et al.*, 2014), al igual que *Pelargonium graveolens* (Guwca *et al.*, 2018) (Sabzghabae *et al.*, 2011).

7.0 Método para evaluar *in vitro* la actividad antimicótica

7.1 Kirby-Bauer

La prueba de susceptibilidad de difusión en disco de Kirby-Bauer se usa comúnmente en las aulas de biología para ilustrar las diferencias en la susceptibilidad a los antibióticos entre especies

bacterianas basadas en estructuras celulares distintas, así como el desarrollo de resistencia a los antibióticos en las bacterias, una de las amenazas actuales más graves para la salud (Schiller et al., 2022), este método es económico y práctico (Yang et al., 2019) y el protocolo implica inocular microorganismos de prueba en placas de agar, luego colocar discos de papel filtro (de aproximadamente 6 mm de diámetro) en la superficie del agar que contiene la concentración deseada de compuestos de prueba e incubar las placas de Petri en condiciones apropiadas. Normalmente, el agente antimicrobiano se difunde en el agar e inhibe la germinación y el crecimiento del microorganismo de prueba, y luego se mide el diámetro de la zona de crecimiento inhibido (Balouiri et al., 2016).

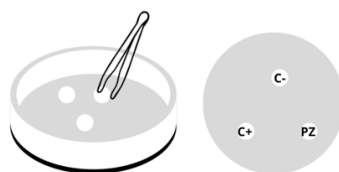


Figura 2. Método de Kirby-Bauer

8.0 Estudios sobre efectos citotóxicos de las plantas

La determinación *in vitro* de las propiedades hemolíticas es un método común e importante para la evaluación preliminar de la citotoxicidad de productos químicos, fármacos o cualquier dispositivo o material médico que entre en contacto con la sangre (Sæbø et al., 2023).

El análisis de citotoxicidad utilizando eritrocitos se basa en la observación de los efectos hemolíticos producidos por la exposición de los eritrocitos a un desafío osmótico capaz de provocar la lisis celular (Figueirêdo., *et al.* 2019), estos ensayos de hemólisis se utilizan habitualmente para probar la toxicidad de concentraciones relativamente bajas de extractos (Elizondo et al., 2020), y tiene las ventajas de ser barato, accesible y sencillo de realizar (Sæbø et al., 2023). Para realizar este protocolo se extrae sangre de un ser humano o de un animal y, a continuación, los eritrocitos lavados se incuban junto con el compuesto o material que se está investigando. Si el compuesto causa hemólisis, la hemoglobina (junto con otros constituyentes celulares) se liberará en el sobrenadante. Como la hemoglobina tiene un espectro de absorbancia distinto, el grado de hemólisis se puede medir en solución utilizando un espectrofotómetro estándar o un lector de placas para proporcionar valores de densidad óptica. Finalmente, los valores obtenidos de las muestras tratadas con el compuesto de prueba se normalizan con respecto

a las muestras de control positivas (100% de lisis) y negativas (sin tratar) para dar la relación de hemólisis mediante una ecuación (Sæbø et al., 2023) (Sadhasivam et al., 2014) (Liaqat et al., 2022).

La hemólisis de los eritrocitos consiste en la liberación del contenido de la membrana al medio circundante, esta debe implicar en última instancia un agujero en la membrana celular más grande que este (Dourmashkin et al., 1966). Si una membrana no es igualmente permeable a todos los solutos, entonces se observará una diferencia en el movimiento del agua que no se explica únicamente por la osmolaridad y, por tanto, se requiere un término adicional, tonicidad. Las soluciones hipotónicas provocan inflamación celular y eventual ruptura o lisis si el movimiento osmótico resultante del agua es lo suficientemente grande. En el caso de los glóbulos rojos, esto se denomina hemólisis (Goodhead et al., 2017).

En una investigación con extractos etanólicos y acuosos de *Nauclea latifolia* en la prueba de hemólisis con eritrocitos humanos mostraron una inhibición dependiente de la dosis de la hemólisis de la membrana eritrocitaria inducida por la solución hipotónica, ya que la inhibición de la hemólisis potenciada por los extractos de *N. latifolia* fue significativamente ($p < 0,05$) inferior a la del ibuprofeno en todas las dosis (Melchor et al., 2021).

El análisis *in vitro* del extracto metanólico de las hojas de *Bryophyllum pinnatum* indican que los extractos secados de forma diferente de *Bryophyllum pinnatum* poseen propiedades antiinflamatorias a través de la estabilización de la membrana de los glóbulos rojos, la inhibición de la hemólisis inducida por el calor y la desnaturalización de la albúmina (Omojokun et al., 2021).

Se probó que el extracto etanólico de *Byrsonima gardneriana* tuvo actividad fungistática contra cepas de referencia de *Candida* spp. (albicans y no albicans spp.) y aislados clínicos. El extracto mostró una baja actividad hemolítica en eritrocitos humanos de todos los tipos de sangre y protegió a estas células de las especies reactivas del oxígeno, sin mostrar actividad oxidante (Souza-Melo et al., 2021).

Se ha observado que la planta *Pelargonium peltatum* tiene baja citotoxicidad a altas concentraciones (Coronado et al., 2018).

Además, la planta *Pelargonium quercetorum* tiene propiedades anticancerígenas intrínsecas y ha mostrado una toxicidad prometedora contra la línea celular MCF-7 (línea celular de cáncer de mama) por lo tanto, estos resultados arrojan luz sobre los estudios sobre su uso como posible agente antimicrobiano y anticancerígeno (Dumlupinar et al., 2021), mientras que la planta *Pelargonium graveolens*, mostró propiedad citotóxica e inhibidora de la COX-1 por lo que se propone investigar el uso de esta planta como un nuevo agente terapéutico con propiedades funcionales para productos farmacéuticos (Jaradat et al., 2022). En cuanto a *Pelargonium endlicherianum* en un estudio, sus extractos etanólicos y metanólicos no causaron algún efecto citotóxico (Cumaoglu et al., 2018).

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material Vegetal

La información respecto al material vegetal utilizado en este estudio se presenta a continuación: Se empleó la planta *Pelargonium zonale* conocida comúnmente como geranio, para realizar el estudio se utilizó la parte área de la planta, así como su tallo.

<u>Nombre común</u>	<u>Nombre científico</u>	<u>Parte empleada</u>
Geranio	<i>Pelargonium zonale</i>	Hoja, tallo, flor



Figura 3. Planta *P. zonale*

7.1.1 Obtención del material vegetal

El material vegetal se adquirió en viveros de la localidad, comprándose 6 plantas en total de un tamaño de 40 cm aproximadamente.

7.1.2 Preparación del material vegetal

Se cortó el tallo, hoja y flor de la planta en pequeños trozos (fig. 4) y se realizó el secado de la planta en presencia de iluminación durante siete días; posteriormente fueron trituradas en un molino manual para obtener el polvo de la planta(fig. 5).



Figura 4. Planta triturada



Figura 5. Planta seca

7.1.3 Obtención del extracto

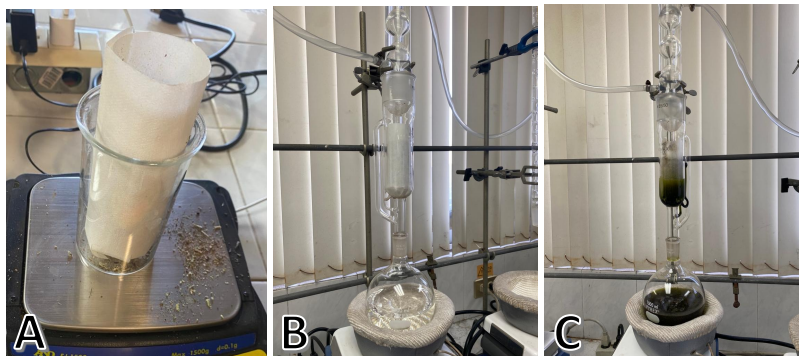
La obtención del extracto se realizó por el método de extracción Soxhlet (Valasi et al., 2023), para lo cual se colocaron 20 g de material vegetal en un matraz (Fig.6 A) con 500 mL de metanol como disolvente durante 48 horas, una vez transcurrido el tiempo, se procedió a filtrar el extracto obtenido con un papel filtro de 110 mm (Whatman) (Fig.6 D y E) y finalmente se eliminó el disolvente mediante presión reducida utilizando un Rotavapor (R-3000) a 40° centígrados durante 40 horas (Fig.6 F) y se pesó. Una vez retirado el solvente en su totalidad, se obtuvo el rendimiento del extracto utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento} \left(\% \frac{p}{p} \right) = \frac{PE}{PI} \times 100$$

Donde:

PE = Peso obtenido después de la extracción

PI = Peso inicial del material vegetal a extraer



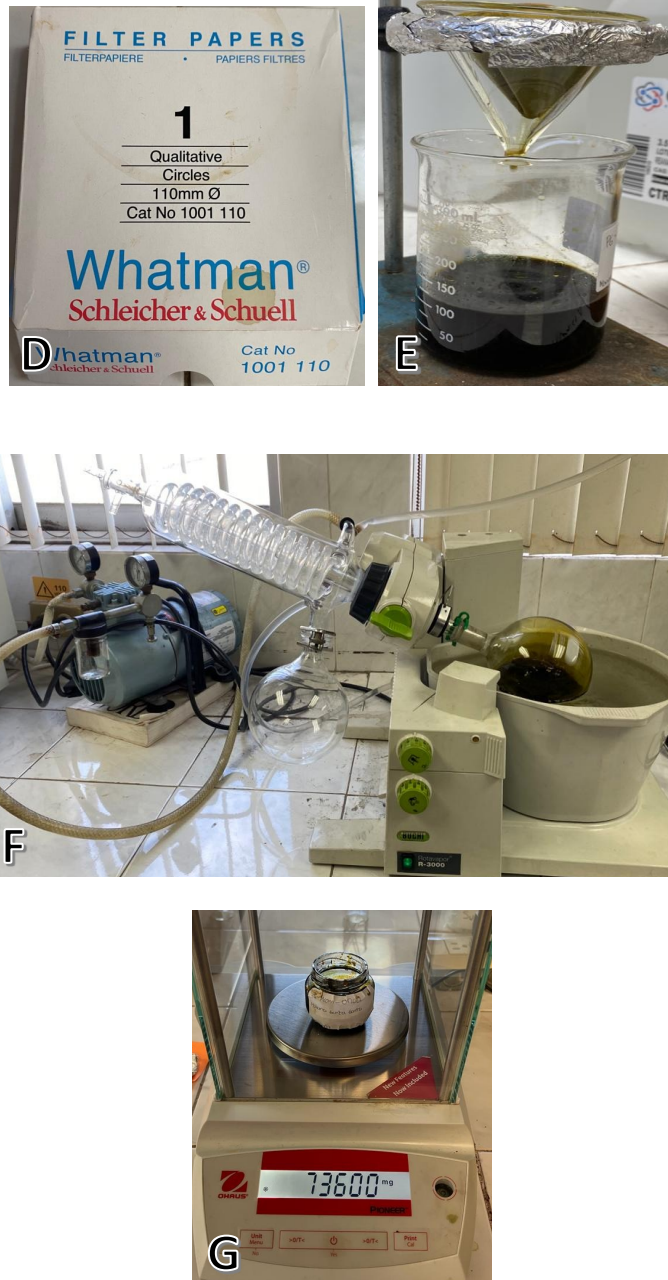


Figura 6. Método de realización de la extracción por Soxhlet. A) 32gr de material vegetal. B) y C) Extracción mediante el método Soxhlet. D) Papel filtro Whatman. E) Filtración del extracto. F) Eliminación del solvente utilizando Rotavapor. G) Peso obtenido después de la extracción.

7.1.4 Tamizaje fitoquímico preliminar

Una vez obtenido el extracto, para realizar este proceso, se llevó a cabo el tamizaje fitoquímico parcial, mediante reacciones colorimétricas y de precipitación empleando métodos químicos de identificación de grupos funcionales (Thouri et al., 2017)(tabla 1). Dichas pruebas químicas se

realizaron con una muestra del extracto obtenido, colocada en tubos de ensayo (Figura 7). Los resultados se presentaron correlacionando cualitativamente la intensidad de la respuesta observada con la presencia de compuestos vegetales.

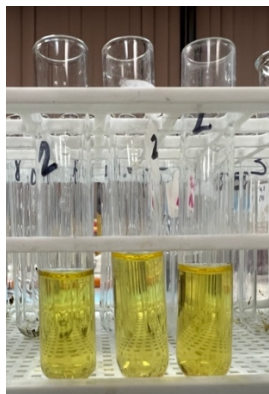


Figura 7. Muestras en tubo de ensayo

Tabla 1. Métodos químicos para la identificación de sustancias activas del extracto de *P. zonale*

Prueba química	Metodología	Compuesto identificar	a Color positiva prueba
Prueba del $KMnO_4$	Se diluyeron 1-2 mg de los extractos en 1ml de agua, metanol y se adicionaron gota a gota a una solución $KMnO_4$ al 2% en agua	Instauraciones	Café
Prueba de la 2-4 dinitrofenilhidracina	Se tomó una muestra de 5mg del extracto se diluyó en 1ml de etanol y se le agregó 1ml de una solución saturada de 2-4 dinitrofenilhidracina en HCl 6N	Carbonilo	Amarillo o naranja
Prueba del $FeCl_3$	Se diluyeron 1-2 mg del extracto en 1ml de agua o etanol y después se añadieron gotas de $FeCl_3$ al 2.5% en agua	Taninos y oxidrilos fenólicos	Precipitado rojo, azul-violeta o verde
Prueba de Salwoski	Se diluyó 1-2 mg de cada extracto en 1ml de cloroformo y posteriormente se le agregó 1ml de H_2SO_4	Esteroles, metilesteroles, terpenos	Anillo rojo-marrón en la interfase

Prueba de Salwoski	Se disolvieron 1-2mg del extracto en 1ml de cloroformo y se les añadió 1ml de H ₂ SO ₄	Saponinas	Rojo
Prueba de Molish	A 1-2 mg del extracto, se le incorporó gota a gota el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1 % en etanol), luego, 1 ml de H ₂ SO ₄ por las paredes del tubo	Carbohidratos	Anillo color púrpura en la interfase
Prueba de las cumarinas	Se diluyeron 1-2 mg del extracto en etanol y se le agregó gota a gota el reactivo NaOH al 10 %	Cumarinas	Amarilla
Prueba de las lactonas	Se disolvieron de 1-2 mg del extracto y se agregó 1 ml de una solución alcohólica de NaOH al 10 %	Lactonas	Amarillo o naranja
Prueba de Baljet	A 2-3 mg del extracto disueltos en etanol, se le agregaron 3-4 gotas de la solución mezcla	Sesquiterpenlactonas	Naranja o rojo oscuro
Prueba del HaSOA	Una pequeña cantidad del extracto se disolvió en H ₂ SO ₄	Flavonoides, flavonas, chaconas, quinonas.	Amarilla-flavonoides Naranja-flavonas Rojo, azulado-chaconas Rojo, púrpura-quinonas
Prueba de Dragendorff	Se prepararon dos soluciones, la solución A con 0.85 g de Bi(NO ₃) ₃ , los cuales se combinaron con 10 ml de CH ₃ COOH y 40 ml de agua y Solución B con 8 g de KI disuelto en 20 ml de agua. El reactivo se elaboró incorporando 5 ml de	Alcaloides	Rojo-naranja por 24 horas

	"A". 4 ml de "B" y 100 ml de agua		
Prueba del NaHCO	La sal se preparó al 10 % en agua. Se disolvieron de 1-2 mg del extracto en agua o etanol y se le adicionaron de 2-3 gotas de H ₂ SO ₄ concentrado. Se agitó ligeramente, y se agregaron 2-3 gotas de la solución de NaHCO	Saponinas	Aparición de burbujas por mas de 1 minuto
Prueba del HaSO₄-CH₂O	Se elaboró una mezcla de 1 ml de H ₂ SO ₄ concentrado con una gota de CH ₂ O (formaldehído). Se disolvieron de 1-5 mg del extracto disuelto en un disolvente no aromático (etanol) y se adicionaron unas gotas de la mezcla anterior	Aromaticidad	Rojo-violeta

7.1.5 Solubilidad del extracto

Se colocó 1mL de diversos disolventes en un tubo de ensayo a los cuales se les añadió 1.006 gramos de extracto de *P. zonale* (Figura 8). Las pruebas se hicieron a temperatura ambiente y en agua a 50°C durante 1 minuto y medio, posteriormente en un vortex se mezclaron para determinar la solubilidad, caracterizándose como soluble si el extracto se puede disolver al mezclarse con un líquido, parcialmente soluble si solo una parte del extracto se disuelve e insoluble si el extracto no se diluyó.

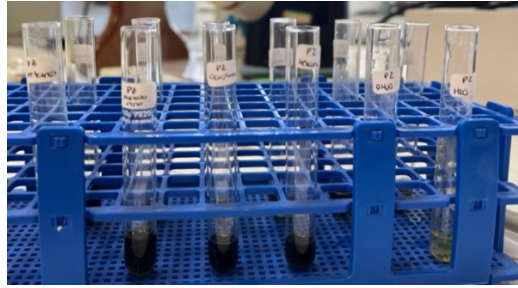


Figura 8. Pruebas de solubilidad

7.2 Material biológico

7.2.1 Obtención del material microbiológico

El microorganismo *Candida albicans* ATCC se obtuvo en el laboratorio de química analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

7.2.2 Identificación y activación de las cepas

Se activó la cepa de *Candida albicans* ATCC en la campana de flujo laminar, se inocularon 100 μ L de *Candida albicans* en un 1 mL de caldo Sabouraud, después se colocó el caldo con el microorganismo en tubos eppendorf sellados con papel parafilm y fueron incubados a 37° durante 24 h.

7.2.3 Siembra por aislamiento

Posteriormente, se tomó una asada de *Candida albicans* ATCC preinoculada y se colocó en el agar Sabouraud para llevar a cabo la técnica de difusión; se dividió en tres zonas, esterilizando el asa entre cada una, una vez ejecutada la siembra, se incubó a 37°C durante 48 horas.

7.2.4 Tinción de Gram

Se realizó la tinción de Gram (Figura 9), para la identificación morfológica de cepas de *Candida albicans*; primero, utilizando un asa estéril, se tomó una colonia del microorganismo previamente aislado y se colocó en una laminilla portaobjetos con agua destilada estéril para su diseminación, la cepa se secó y fijó con un mechero, luego se colocaron unas gotas de la tinción cristal violeta en el portaobjetos durante 1 minuto, luego se enjuagó a chorro de agua, y se colocó la segunda tinción de yodo lugol durante 1 minuto, se enjuagó y se colocó en alcohol acetona durante 8 segundos, se enjuagó y se colocó la tinción final de safranina durante 1 minuto y se enjuagó con agua. Después con papel filtro Whatman No. 1 el resto del agua se absorbió para

poder observar la laminilla portaobjetos con la cepa de *Candida albicans* al microscopio óptico(Figura 10)(Tripathi et al., 2023).

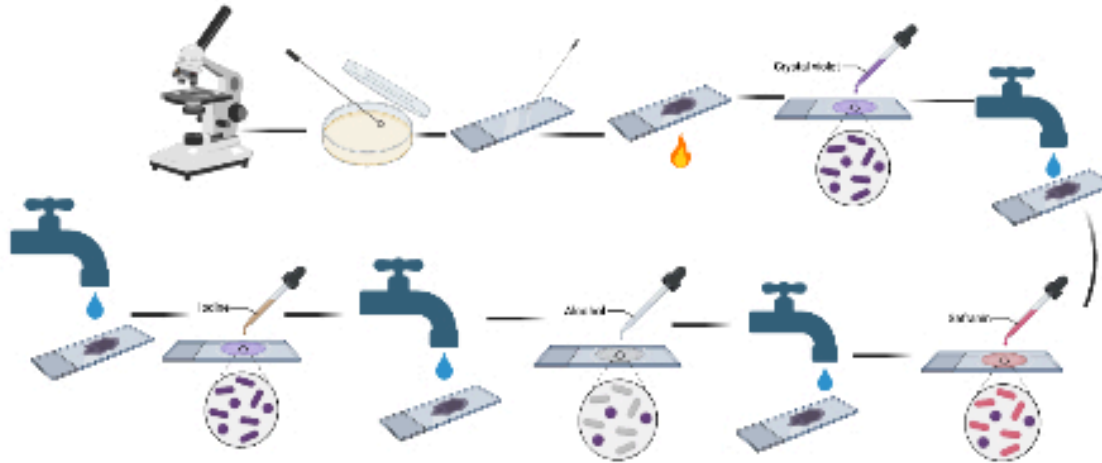


Figura 9. Procedimiento de la tinción de gram

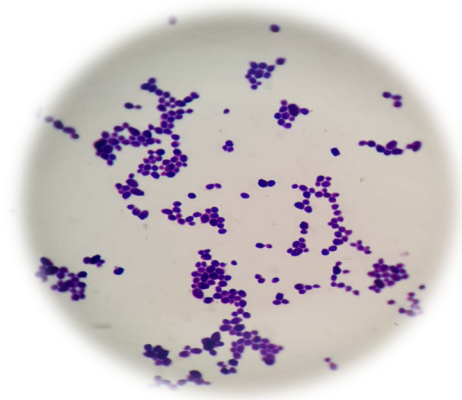


Figura 10. *C. albicans* observada posterior a la tinción de gram a 40x en microscopio óptico

7.2.5 Activación de las cepas

Se tomó una cepa de *C. albicans* y posteriormente se inoculó en un tubo de eppendorf con medio de cultivo dextrosa Saboraud, se dejó en incubadora durante 48 horas y después se tomaron 100 μ L del cultivo y mediante la técnica de estría se diseminó en una caja petri con agar dextrosa Saboraud y se incubó por 48 horas.

7.2.6 Evaluación de la actividad antimicótica

Del inóculo de *C. albicans*, se depositaron 100 µL del crecimiento fúngico en cajas de agar Sabouraud haciendo una siembra por diseminación para obtener un crecimiento del hongo, se dejó secar de 3 a 5 minutos y después se llevo a cabo el método Kirby-Bauer. En distintas cajas de agar se colocaron discos de papel Whatman n°1 de 6 mm de diámetro impregnados con las diferentes concentraciones del extracto (15, 20, 30, 50, 100 µg/mL), se empleó agua destilada como control negativo y 20 µg/ml de nistatina como control positivo, los cuales fueron transportados con una pinza estéril, una vez colocados todos los discos, las cajas se dejaron secar por 30 minutos y se incubaron a 37° por 24 horas. Este método se realizó 6 veces y a las 24 horas se efectuó la medición de los halos de inhibición del crecimiento de *C. albicans* para calcular la media, desviación estándar y el porcentaje del efecto inhibitorio relativo con la fórmula:

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

7.2.7 Evaluación citotóxica

Se realizó la evaluación de la capacidad hemolítica mediante el método espectrofotométrico utilizando la técnica de hemólisis sobre eritrocitos humanos (Lin et al., 2018) (Figura 11), para lo cual, utilizando tubos con EDTA se consiguieron 4 mL de sangre de un voluntario sano siguiendo el protocolo de Sharma y cols. 2001. Posterior a la toma de la muestra, se procedió a retirar el plasma de la sangre centrifugandola a 3000 rpm durante 10 minutos a 25°C. Se llevaron a cabo por triplicado lavados de la sangre utilizando amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.4), después de los lavados se preparó una suspensión de eritrocitos a una concentración aproximada del 5 % en PBS. A continuación se evaluaron los tratamientos a las concentraciones de 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/mL del extracto estos se incubaron a 37±0.5°C por 30 min. Pasado el tiempo, se centrifugaron a 12000 rpm por 5 min a 4°C, se recuperaron los sobrenadantes y 250 µL de estos, se colocaron en una microplaca de 96 pocillos. El sobrenadante fue leído a una densidad óptica (DO) de 540 nm (longitud de onda donde reacciona la hemoglobina) en un lector de microplacas. La actividad hemolítica fue reportada en porcentaje de hemólisis utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ de hemolisis} = \frac{(\text{Abs Muestra} - \text{Abs Control negativo})}{(\text{Abs Control positivo} - \text{Abs control negativo})} \times 100$$

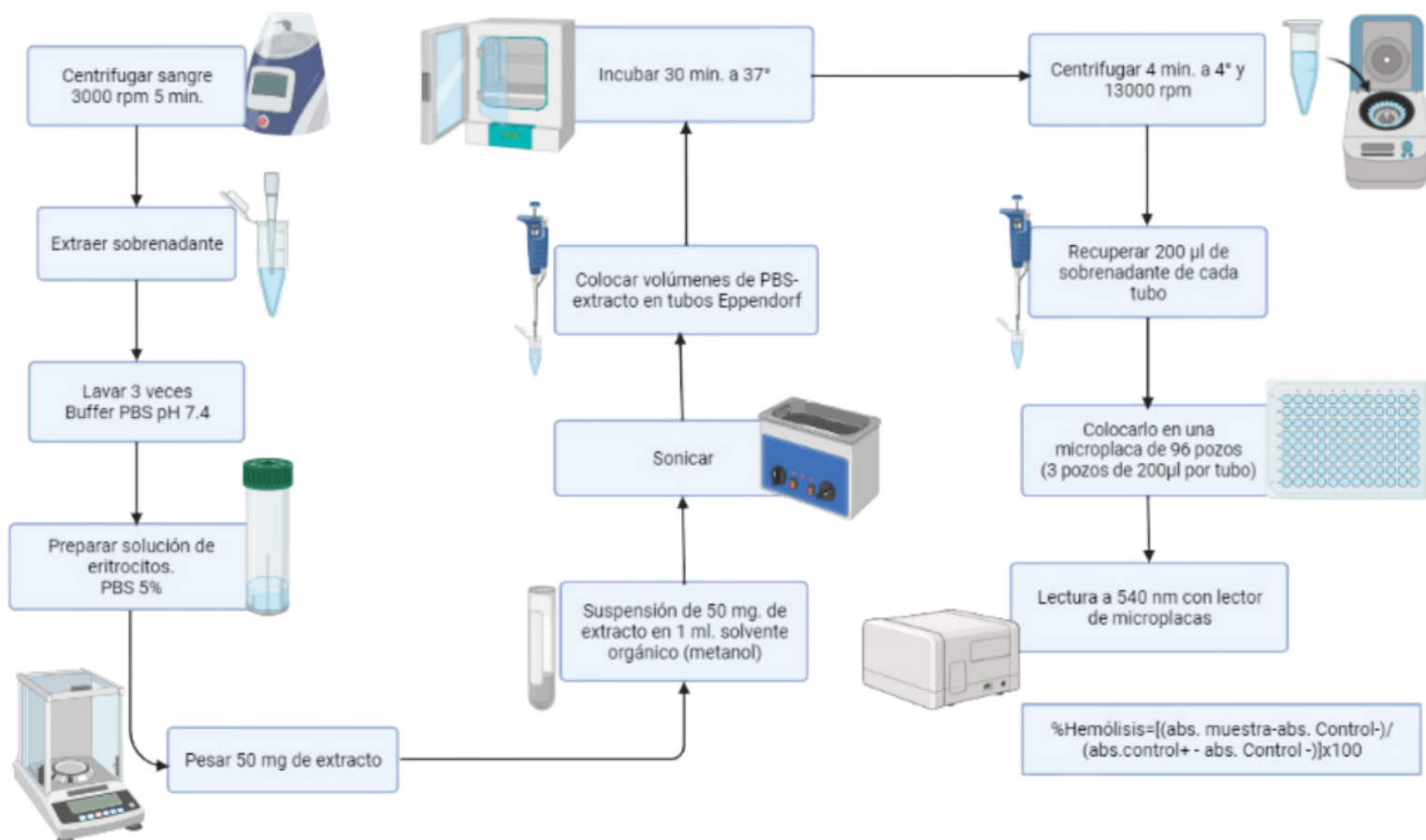


Figura 11. Método de la técnica de hemólisis sobre eritrocitos humanos

8. RESULTADOS

8.1 Rendimiento del extracto

Se obtuvo un rendimiento de 6.5 gramos del extracto de *P. zonale* realizando la siguiente ecuación.

$$\text{Rendimiento} \left(\% \frac{p}{p} \right) = \frac{PE}{PI} \times 100$$

Donde:

PE = Peso obtenido después de la extracción = 1.3 g

PI = Peso inicial del material vegetal a extraer = 20 g

8.2 Tamizaje fitoquímico parcial

En la identificación de los grupos químicos presentes mediante pruebas colorimétricas, el extracto respondió de manera positiva para insaturaciones, grupo de carbonilo, oxidrilos fenólicos (taninos), esteroides y terpenos, saponinas, flavonoides y alcaloides.

Tabla 2. Identificación de sustancias activas del extracto de *P. zonale*

Prueba química	Resultado	Sustancias activas
Prueba del KMnO ₄	+	Insaturaciones
Prueba de la 2-4 dinitrofenilhidracina	+	Carbonilo
Prueba del FeCl ₃	+	Taninos
Prueba de Salwoski	+	Esteroides y terpenos
Prueba de Salwoski	+	Saponinas
Prueba de Molish	-	Carbohidratos
Prueba de las cumarinas	-	Cumarinas
Prueba de las lactonas	-	Lactonas
Prueba de Baljet	-	Sesquiterpenlactonas
Prueba del HaSOA	+	Flavonoides
Prueba de Dragendorff	+	Alcaloides
Prueba del NaHCO	-	Saponinas
Prueba del HaSO ₄ -CH ₂ O	-	Aromaticidad

8.3 Solubilidad del extracto

Tabla 3. Solubilidad del extracto

Solventes	H2O	DMSO	Hexano	Cloroformo	Etanol	Metanol
Temperatura ambiente	-	+++	++	++	++	++
Temperatura a 50°C	-	+++	++	++	++	+++

8.4 Identificación de la cepa *Candida albicans*

Se observaron las colonias de *C. albicans* después del aislamiento del inóculo y la incubación en agar Sabouraud durante 24 horas a 37°C.

Posteriormente, la laminilla portaobjetos con la cepa de *Candida albicans* ATCC se observó al microscopio óptico a 40x y 100x, y se presentó una tonalidad de color morado lo cual asegura que son grampositivas (Figura 12).

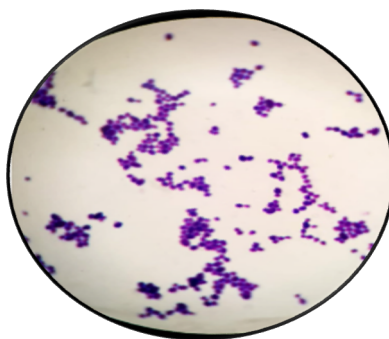


Figura 12. *C. albicans* observada a las 24 horas

8.5 Efecto antimicótico *in vitro*

La actividad antimicótica del extracto sobre *Candida albicans*, se determinó en función al diámetro de halo de inhibición y los controles positivo y negativo. Los resultados del ensayo no mostraron halo de inhibición.

Tabla 4. Efecto antimicótico del extracto de *P. zonale* contra *C. albicans* ATCC

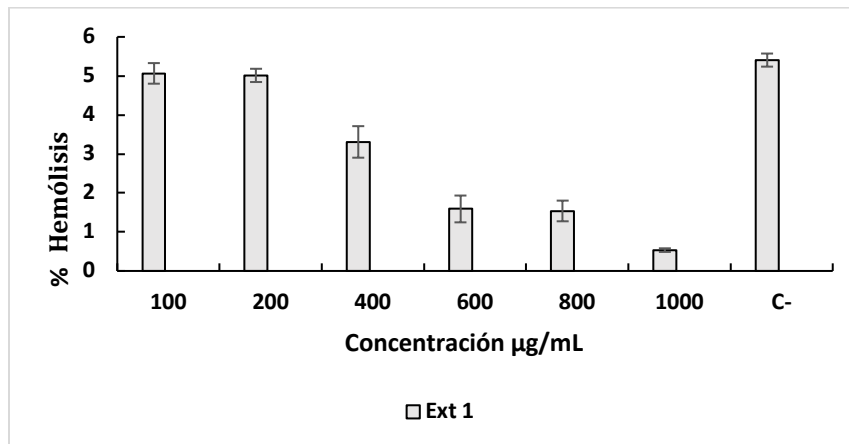
<i>P. zonale</i> µg/mL	Promedio de inhibición de <i>Candida albicans</i> ATCC (mm)		
	1	2	3
15	-	-	-
20	-	-	-
30	-	-	-
50	-	-	-
100	-	-	-

(-) = sin efecto inhibitorio.

8.6 Evaluación citotóxica

Los resultados del ensayo de hemólisis (citotoxicidad) obtenidos por técnica espectrofotométrica del extracto de *P. zonale* se muestran en la Gráfica 1. Como podemos apreciar en la gráfica el extracto no es considerado hemolítico ya que a la concentración de 1000 µg/mL tiene un porcentaje de hemólisis igual o menor al 1%, por lo tanto no se considera tóxico.

En cuanto a las concentraciones mas bajas (100 y 200 µg/mL), se encontró que produjeron hemólisis con un porcentaje del 5% por lo que se considera tóxico.



Gráfica 1. Efecto citotóxico de extracto *P. zonale* sobre eritrocitos humanos

9. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la acción antifúngica contra *C. albicans* del extracto de *P. zonale*. La candidiasis es una de las infecciones oportunistas más prevalentes que afectan a la mucosa oral. Recientemente se ha documentado que existe un aumento en la resistencia a los agentes antifúngicos utilizados en odontología, además de los efectos adversos que estos ocasionan.

En otros estudios se ha confirmado que las especies de *Pelargonium* contienen flavonoles siendo los principales constituyentes flavonoides vacuolares de las hojas en el género, así como taninos, sesquiterpenos, ácido fenólico, ácido cinámico, cumarina y monoterpenos (Saraswathi *et al.*, 2011). Se tiene registro de componentes con actividad antifúngica entre los que se encuentran los compuestos fenólicos, el timol, terpenoides, además de flavonoides, taninos y saponinas (Hsu *et al.*, 2021), los cuales están presentes en el extracto utilizado en este trabajo. Existen diversos factores como condiciones ambientales (clima, tipo de suelo, humedad, estación del año), condiciones genotípicas y fisiológicas de las plantas y el método de extracción que afectan la composición fitoquímica del extracto (Narnoliya *et al.*, 2019).

La aparición de resistencia a los antimicóticos por parte de *C. albicans* ha persuadido en la búsqueda para encontrar nuevos agentes terapéuticos con actividad antimicótica siendo las plantas una fuente para la obtención de compuestos con dicha actividad (Gizaw *et al.*, 2022).

Las plantas medicinales se han utilizado ampliamente en los productos de cuidado bucal. Hay muchas pruebas clínicas del uso de productos a base de plantas para el tratamiento de la candidiasis (Tafazoli *et al.*, 2021). Nuestro objetivo fue evaluar un agente antifúngico de origen vegetal que pueda ofrecer una alternativa a los antimicóticos disponibles en el ámbito farmacéutico. Se utilizó el extracto metanólico de *P. zonale* para determinar su efecto antimicótico, los resultados obtenidos en el presente trabajo no muestran actividad biológica por parte del extracto en estudio. Se ha reportado actividad biológica por parte de especies de geranio frente a especies de *Candida*. Tal es el caso de Mahboubi y cols. que evaluaron la actividad antimicótica frente a *C. albicans* del aceite esencial de *Pelargonium graveolens* y se observaron halos de inhibición. A diferencia de nuestro trabajo ellos utilizan el aceite esencial además se trata de una especie distinta de geranio. Por otra parte Lewtak y colaboradores analizaron el efecto antifúngico frente a *Candida albicans* de el extracto acuoso de *Pelargonium zonale*. Sus resultados demuestran que el extracto causa una disminución significativa en la actividad

metabólica de *C. albicans*. La diferencia con nuestros resultados se debe probablemente por el método utilizado para obtener el extracto, que en su caso es acuoso a diferencia del metanólico obtenido en el presente estudio. En otro estudio se evaluó la actividad antimicótica del aceite esencial de *Pelargonium roseum* y este si demostró efectividad, sin embargo concluyeron que se necesitan más estudios basados en el método de dilución para establecer la concentración mínima en la que los aceites esenciales estudiados tienen un efecto inhibitor contra *Candida albicans* (Carmen et al., 2014).

Un amplio número de compuestos obtenidos a partir de diversas fuentes presentan actividad hemolítica, entre estos se encuentran sustancias derivadas de plantas. El modelo de eritrocitos ha sido ampliamente utilizado ya que presenta una indicación directa de toxicidad.

El ensayo de hemólisis para el presente estudio se realizó a las concentraciones de 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/mL. Al igual que Bianchini y cols 2017., y Elizondo y cols 2020., que utilizaron las mismas concentraciones para evaluar el efecto de citotoxicidad sobre eritrocitos humanos solo que con diferentes plantas, que en su caso fueron con *Mentha pulegium* y *Argemone mexicana*. La acción hemolítica produce cambios en la membrana del eritrocito, ocasionando la ruptura y liberación de los pigmentos característicos de la hemoglobina (Oliveira et al., 2009). Nuestros resultados muestran que el extracto no induce a hemólisis esto implica que el extracto crudo se puede usar con seguridad en humanos, al igual que *Pelargonium odoratissimum*, planta del mismo género que tampoco demostró actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos (Abdelbaky et al., 2022), y *Pelargonium peltatum* (Coronado et al., 2018).

10. CONCLUSIONES

El extracto metanólico de *Pelargonium zonale* no presenta acción antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC. Por otra parte, se considera un extracto seguro ya que no presenta actividad hemolítica sobre eritrocitos humanos.

11. PERSPECTIVAS A FUTURO

Analizar el efecto contra bacterias orales debido a que la estructura es distinta, y por lo tanto se pudiera analizar el comportamiento para poderse evaluar como un efecto antibacteriano y antiinflamatorio. Al no ser citotóxico analizar su efectividad a nivel tópico.

12. LITERATURA CITADA

1. Abdelbaky AS, Abd El-Mageed TA, Babalghith AO, Selim S, Mohamed AMHA. Green Synthesis and Characterization of ZnO Nanoparticles Using *Pelargonium odoratissimum* (L.) Aqueous Leaf Extract and Their Antioxidant, Antibacterial and Anti-inflammatory Activities. *Antioxidants* (Basel). 2022 Jul 26;11(8):1444.
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002 Aug;78(922):455-9.
3. Al-Mijalli SH, Mrabti HN, Assaggaf H, Attar AA, Hamed M, Baaboua AE, Omari NE, Menyiy NE, Hazzoumi Z, Sheikh RA, Zengin G, Sut S, Dall'Acqua S, Bouyahya A. Chemical Profiling and Biological Activities of *Pelargonium graveolens* Essential Oils at Three Different Phenological Stages. *Plants* (Basel). 2022 Aug 27;11(17):2226.
4. Alonso AM, Reyes-Maldonado OK, Puebla-Pérez AM, Arreola MPG, Velasco-Ramírez SF, Zúñiga-Mayo V, Sánchez-Fernández RE, Delgado-Saucedo JI, Velázquez-Juárez G. GC/MS Analysis, Antioxidant Activity, and Antimicrobial Effect of *Pelargonium peltatum* (Geraniaceae). *Molecules*. 2022 May 26;27(11):3436.
5. Alqahtani AA, El Raey MA, Abdelsalam E, Ibrahim AM, Alqahtani O, Torky ZA, Attia HG. The Biosynthesized Zinc Oxide Nanoparticles' Antiviral Activity in Combination with *Pelargonium zonale* Extract against the Human Corona 229E Virus. *Molecules*. 2022 Nov 30;27(23):8362.
6. Amin M, Babadi F, Baghipour N, Sadeghi-Nejad B. Evaluation of the effect of Jaftex herbal mouthwash on the growth of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *J Family Med Prim Care*. 2021 Oct;10(10):3815-3819.
7. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal*. 2016 Apr;6(2):71-79.
8. Berman J. *Candida albicans*. *Curr Biol*. 2012 Aug 21;22(16):R620-2.
9. Bianchini MC, Galvão DO, Tamborena T, Alves CO, Puntel RL. *Mentha pulegium* crude extracts induce thiol oxidation and potentiate hemolysis when associated to t-butyl hydroperoxide in human's erythrocytes. *An Acad Bras Cienc*. 2017 Oct-Dec;89(4):2901-2909.
10. Buyel JF. Plants as sources of natural and recombinant anti-cancer agents. *Biotechnol Adv*. 2018 Mar-Apr;36(2):506-520.

11. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, Monk BC. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology (Reading)*. 2007 Oct;153(Pt 10):3211-3217.
12. Carmen G, Hancu G. Antimicrobial and Antifungal Activity of *Pelargonium roseum* Essential Oils. *Adv Pharm Bull*. 2014 Dec;4(Suppl 2):511-4.
13. Chibana H, Beckerman JL, Magee PT. Fine-resolution physical mapping of genomic diversity in *Candida albicans*. *Genome Res*. 2000 Dec;10(12):1865-77.
14. Ciprandi G, Tosca MA. Non-pharmacological remedies for post-viral acute cough. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2021 Aug 10.
15. Coronado-López S, Caballero-García S, Aguilar-Luis MA, Mazulis F, Del Valle-Mendoza J. Antibacterial Activity and Cytotoxic Effect of *Pelargonium peltatum* (Geranium) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Int J Dent*. 2018 Nov 28;2018:2714350.
16. Cruz Martínez C, Diaz Gómez M, Oh MS. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: a review. *Pharm Biol*. 2017 Dec;55(1):1992-1998.
17. Cumaoglu A, Karatoprak GŞ, Yerer MB, Koşar M. Anti-inflammatory Effects of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. Extracts in Lipopolysaccharide-stimulated Macrophages. *Turk J Pharm Sci*. 2018 Apr;15(1):107-115.
18. da Costa GA, Gonçalo RIC, Dos Santos MAL, Ayres LCG, Barbosa BF, Trento CL, Takeshita WM, Santana LADM. Persistent erythematous candidiasis as a sequela after SARS-CoV-2 infection: A case report. *Oral Surg*. 2022 Sep 12:10.1111/ors.12777.
19. Dourmashkin RR, Rosse WF. Morphologic changes in the membranes of red blood cells undergoing hemolysis. *Am J Med*. 1966 Nov;41(5):699-710.
20. Du Q, Ren B, Zhou X, Zhang L, Xu X. Cross-kingdom interaction between *Candida albicans* and oral bacteria. *Front Microbiol*. 2022 Nov 3;13:911623.
21. Dumlupınar B, Karatoprak GŞ, Fırat M, Akkol EK. Appraisal of the antimicrobial and cytotoxic potentials of nanoparticles biosynthesized from the extracts of *Pelargonium quercetorum* Agnew. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2021 Nov 30;26(11):1089-1096.
22. Elizondo-Luevano JH, Verde-Star J, González-Horta A, Castro-Ríos R, Hernández-García ME, Chávez-Montes A. In Vitro Effect of Methanolic Extract of *Argemone mexicana* against *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol*. 2020 Apr;58(2):135-145.

23. El Karkouri J, Bouhrim M, Al Kamaly OM, Mechchate H, Kchibale A, Adadi I, Amine S, Alaoui Ismaili S, Zair T. Chemical Composition, Antibacterial and Antifungal Activity of the Essential Oil from *Cistus ladanifer* L. *Plants (Basel)*. 2021 Sep 30;10(10):2068.
24. Fardsadegh, B., Vaghari, H., Mohammad-Jafari, R., Najian, Y. & Jafarizadeh-Malmiri, H. Biosynthesis, characterization and antimicrobial activities assessment of fabricated selenium nanoparticles using *Pelargonium zonale* leaf extract. *Green Processing and Synthesis*. 2019; 8(1), 191-198.
25. Figueirêdo, E.C. *et al.* (2019) 'Use of erythrocytes in cytotoxicity and toxicity assays of medicinal plant extracts: analysis of their application and bibliometric study', *Blacpma*, 18(4), pp. 359–377.
26. Garcia BA, Acosta NC, Tomar SL, Roesch LFW, Lemos JA, Mugayar LRF, Abranches J. Association of *Candida albicans* and Cbp+ *Streptococcus mutans* with early childhood caries recurrence. *Sci Rep*. 2021 May 24;11(1):10802.
27. Gholyaf M, Asmarian S, Akbarpour B, Gholyaf M, Mohammadi F. Protective Effect of the Hydroalcoholic Extract of *Pelargonium Graveolens* L. on Rats with Acetaminophen-Induced Nephrotoxicity. *Iran J Kidney Dis*. 2022 Mar;16(2):108-114.
28. Gizaw A, Marami LM, Teshome I, Sarba EJ, Admasu P, Babele DA, Dilba GM, Bune WM, Bayu MD, Tadesse M, Abdisa K. Phytochemical Screening and In Vitro Antifungal Activity of Selected Medicinal Plants against *Candida albicans* and *Aspergillus niger* in West Shewa Zone, Ethiopia. *Adv Pharmacol Pharm Sci*. 2022 Jun 28;2022:3299146.
29. Goodhead LK, MacMillan FM. Measuring osmosis and hemolysis of red blood cells. *Adv Physiol Educ*. 2017 Jun 1;41(2):298-305.
30. Gómez-Moreno G, Valerón-Rodríguez F. Pseudomembranous oral candidiasis resolved with a mouthwash containing 0.05% chlorhexidine + 0.05% cetylpyridinium chloride. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021 Sep;25(18):5725-5728.
31. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect*. 2016 May;18(5):310-21.
32. Gucwa K, Milewski S, Dymerski T, Szweda P. Investigation of the Antifungal Activity and Mode of Action of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Pelargonium graveolens*, *Cinnamomum cassia*, *Ocimum basilicum*, and *Eugenia caryophyllus* Essential Oils. *Molecules*. 2018 May 8;23(5):1116.

33. Hamed M., Mohamed M., Refai L., Hammam O., El-Ahwany E., Salah F., Hassanein H. The active constituents of *Pelargonium zonale* induced cytotoxicity in human hepatoma cell line HepG2. *Int. J. Pharm. Appl.* 2015;6:10–19.
34. Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. *Head Neck Pathol.* 2019 Mar;13(1):25-32.
35. Hsu H, Sheth CC, Veses V. Herbal Extracts with Antifungal Activity against *Candida albicans*: A Systematic Review. *Mini Rev Med Chem.* 2021;21(1):90-117.
36. Iancu C., Cioancă O., Mircea C., Mocanu M., Hăncianu M. *Pelargonium* sp.: Characterization of the polyphenols and their biological potential. *Farmacia.* 2016;64:333–338.
37. Ilić M, Samardžić S, Kotur-Stevuljević J, Ušjak D, Milenković M, Kovačević N, Drobac M. Polyphenol rich extracts of *Geranium L.* species as potential natural antioxidant and antimicrobial agents. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021 Oct;25(20):6283-6294.
38. Jaradat N, Hawash M, Qadi M, Abualhasan M, Odetallah A, Qasim G, Awayssa R, Akkawi A, Abdullah I, Al-Maharik N. Chemical Markers and Pharmacological Characters of *Pelargonium graveolens* Essential Oil from Palestine. *Molecules.* 2022 Sep 5;27(17):5721.
39. Kadosh D. Control of *Candida albicans* morphology and pathogenicity by post-transcriptional mechanisms. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Nov;73(22):4265-4278.
40. Katirae F, Ahmadi Afshar S, Rahimi Pirmahalleh SF, Shokri H. In vitro antifungal activity of essential oils extracted from plants against fluconazole-susceptible and -resistant *Candida albicans*. *Curr Med Mycol.* 2017 Jun;3(2):1-6.
41. Kessler SQS, Lang PM, Dal-Pizzol TS, Montagner F. Resistance profiles to antifungal agents in *Candida albicans* isolated from human oral cavities: systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2022 Nov;26(11):6479-6489.
42. Khozimeh F, Mohammadpour M, Taghian M, Naemy V. A comparative study of *Candida albicans* mean colony counts and blood group antigens in the saliva of healthy subjects. *Dent Res J (Isfahan).* 2014 Mar;11(2):240-3.
43. Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chem Rev.* 2021 Mar 24;121(6):3390-3411.

44. Lewtak K, Fiołka MJ, Szczuka E, Ptaszyńska AA, Kotowicz N, Kołodziej P, Rzymowska J. Analysis of antifungal and anticancer effects of the extract from *Pelargonium zonale*. *Micron*. 2014 Nov;66:69-79.
45. Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman MR, Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiol Biochem*. 2020 Mar;148:80-89.
46. Liaqat N, Jahan N, Khalil-Ur-Rahman, Anwar T, Qureshi H. Green synthesized silver nanoparticles: Optimization, characterization, antimicrobial activity, and cytotoxicity study by hemolysis assay. *Front Chem*. 2022 Aug 29;10:952006.
47. Lin JT, Liu SC, Kuo LC, Yang DJ. Composition of phenolic compounds and antioxidant attributes of *Cyclea gracillima* Diels extracts. *J Food Drug Anal*. 2018 Jan;26(1):193-200.
48. Loaiza-Oliva M, Arias-Durango L, Martínez-Pabón MC. The Cytotoxic and Inhibitory Effects of Plant Derivatives on *Candida albicans* Biofilms: A Scoping Review. *Molecules*. 2022 Dec 23;28(1):130.
49. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Jan;16(1):19-31.
50. Lorenzo-Pouso AI, Pérez-Jardón A, Caponio VCA, Spirito F, Chamorro-Petronacci CM, Álvarez-Calderón-Iglesias Ó, Gándara-Vila P, Lo Muzio L, Pérez-Sayáns M. Oral Chronic Hyperplastic Candidiasis and Its Potential Risk of Malignant Transformation: A Systematic Review and Prevalence Meta-Analysis. *J Fungi (Basel)*. 2022 Oct 17;8(10):1093.
51. Lyu X, Zheng H, Wang X, Zhang H, Gao L, Xun Z, Zhang Q, He X, Hua H, Yan Z, Chen F. Oral Microbiota Composition and Function Changes During Chronic Erythematous Candidiasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Aug 16;11:691092.
52. Mardani M, Kamrani O. Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy with indocyanine green against the standard and fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Lasers Med Sci*. 2021 Jul 31
53. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013 Feb 15;4(2):119-28.
54. Mahboubi M, Mahdizadeh E, HeidaryTabar R. The anti-candidal activity of *Pelargonium graveolens* essential oils against clinical isolates of *Candida albicans*. *Infectio*. 2017 Feb;22(1):9-12.

55. McManus BA, Coleman DC. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infect Genet Evol.* 2014 Jan;21:166-78.
56. Melchor-Martínez EM, Tamez-Fernández JF, González-González GM, Silva-Mares DA, Waksman-Minsky N, Pérez-López LA, Rivas-Galindo VM. Active Flavonoids from *Colubrina greggii* var. *greggii* S. Watson against Clinical Isolates of *Candida* spp. *Molecules.* 2021 Sep 23;26(19):5760.
57. Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. *Clin Dermatol.* 2016 Jul-Aug;34(4):487-94.
58. Mishra R, Tandon S, Rathore M, Banerjee M. Antimicrobial Efficacy of Probiotic and Herbal Oral Rinses against *Candida albicans* in Children: A Randomized Clinical Trial. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2016 Jan-Mar;9(1):25-30.
59. Morse DJ, Wilson MJ, Wei X, Bradshaw DJ, Lewis MAO, Williams DW. Modulation of *Candida albicans* virulence in in vitro biofilms by oral bacteria. *Lett Appl Microbiol.* 2019 Apr;68(4):337-343.
60. Moyo M, Van Staden J. Medicinal properties and conservation of *Pelargonium sidoides* DC. *J Ethnopharmacol.* 2014 Mar 14;152(2):243-55.
61. Mukaremera L, Lee KK, Mora-Montes HM, Gow NAR. *Candida albicans* Yeast, Pseudohyphal, and Hyphal Morphogenesis Differentially Affects Immune Recognition. *Front Immunol.* 2017 Jun 7;8:629.
62. Mulder R, Mohamed N, Mathiba O. Prevalence of oral mucosal lesions in human immunodeficiency virus-infected children attending the Pediatric Infectious Diseases Clinic in Cape Town. *Clin Exp Dent Res.* 2021 Sep 29.
63. Narnoliya, L. K., Jadaun, J. S., & Singh, S. P. (2019). The Phytochemical Composition, Biological Effects and Biotechnological Approaches to the Production of High-Value Essential Oil from *Geranium*. *Essential Oil Research: Trends in Biosynthesis, Analytics, Industrial Applications and Biotechnological Production*, 327–352.
64. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69:71-92.
65. Oliveira, V. M. A. de ., Carneiro, A. L. B., Cauper, G. S. de B., & Pohlit, A. M.. (2009). In vitro screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. *Acta Amazonica*, 39(4), 973–980.
66. Omojokun OS, Oboh G, Ademiluyi AO, Oladele JO, Boligon AA. Impact of drying processes on *Bryophyllum pinnatum* phenolic constituents and its anti-inflammatory and antioxidative activities in human erythrocytes. *J Food Biochem.* 2021 Mar;45(3):e13298.

67. Özdal Zincir Ö, Özdal U, Ünlü Ö, Demirci M, Katiboğlu AB, Egil E, Altan Şallı G. Synergistic effect of thymoquinone and nystatin in the treatment of oral candidiasis; an in vitro study. *Odontology*. 2021 Oct 17;17:1–8.
68. Páez X, Hernández L. Topical hemostatic effect of a common ornamental plant, the geraniaceae *Pelargonium zonale*. *J Clin Pharmacol*. 2003 Mar;43(3):291-5.
69. Papiés J, Emanuel J, Heinemann N, Kulić Ž, Schroeder S, Tenner B, Lehner MD, Seifert G, Müller MA. Antiviral and Immunomodulatory Effects of *Pelargonium sidoides* DC. Root Extract EPs® 7630 in SARS-CoV-2-Infected Human Lung Cells. *Front Pharmacol*. 2021 Oct 25;12:757666.
70. Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Morais SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol*. 2021 Jul;131(1):11-22.
71. Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Crit Rev Microbiol*. 2021 Feb;47(1):91-111.
72. Prajapati M, Shah M, Ranginwala A, Agrawal P, Acharya D, Thakkar S. Antifungal effects of tulsi, garlic, cinnamon and lemongrass in powder and oil form on *Candida albicans*: An in vitro study. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2021 May-Aug;25(2):306-312.
73. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Jul;25(7):792-798.
74. R AN, Rafiq NB. Candidiasis. 2023 May 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–.
75. Rafat Z, Sasani E, Salimi Y, Hajimohammadi S, Shenagari M, Roostaei D. The Prevalence, Etiological Agents, Clinical Features, Treatment, and Diagnosis of HIV-Associated Oral Candidiasis in Pediatrics Across the World: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pediatr*. 2021 Dec 24;9:805527.
76. Raghavanpillai Sabu K, Sugathan S, Idhayadhulla A, Woldemariam M, Aklilu A, Biresaw G, Tsegaye B, Manilal A. Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Activity of *Excoecaria agallocha* Leaf Extract. *J Exp Pharmacol*. 2022 Jan 14;14:17-26.
77. Sabzghabae AM, Shirdare Z, Ebadian B, Aslani A, Ghannadi A. Clinical evaluation of the essential oil of *Pelargonium graveolens* for the treatment of denture stomatitis. *Dent Res J (Isfahan)*. 2011 Dec;8(Suppl 1):S105-8.
78. Sadhasivam L., Durairaj J. R. Evaluation profile of silver nanoparticle synthesized by *Aloe vera* extract. *Int. J. Chem. Tech. Res*. 2014. 6, 974–4290.

79. Sæbø IP, Bjørås M, Franzyk H, Helgesen E, Booth JA. Optimization of the Hemolysis Assay for the Assessment of Cytotoxicity. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 2;24(3):2914.
80. Sakaguchi H. [Treatment and Prevention of Oral Candidiasis in Elderly Patients]. *Med Mycol J.* 2017;58(2):J43-J49.
81. Saraswathi J, Venkatesh K, Nirmala B, Majid Hameed H, Roja A. Phytopharmacological importance of Pelargonium species. *J Med Plants Res.* 2011 Jul;5(13):2587-98.
82. Schiller H, Young C, Schulze S, Tripepi M, Pohlschroder M. A Twist to the Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test: an Accessible Laboratory Experiment Comparing *Haloferax volcanii* and *Escherichia coli* Antibiotic Susceptibility to Highlight the Unique Cell Biology of Archaea. *J Microbiol Biol Educ.* 2022 Jan 31;23(1):e00234-21.
83. Sharma A, Flores-Vallejo RDC, Cardoso-Taketa A, Villarreal ML. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2017 Aug 17;208:264-329.
84. Sharma P, Sharma JD. In vitro hemolysis of human erythrocytes -- by plant extracts with antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol.* 2001 Mar 3;74(3):239-43.
85. Şöhretoğlu D., Sakar M.K., Sabuncuoğlu S.A., Özgüneş H., Sterner O. Polyphenolic constituents and antioxidant potential of *Geranium stepporum* Davis. *Rec. Nat. Prod.* 2011;5:22–28.
86. Souza-Melo WO, Figueiredo-Júnior EC, Freire JCP, Costa BP, Lira AB, Freires IA, Cavalcanti YW, Lopes WS, Tavares JF, Pessôa HLF, Pereira JV. Phytochemistry, antifungal and antioxidant activity, and cytotoxicity of *Byrsonima gardneriana* (A. Juss) extract. *Arch Oral Biol.* 2021 Mar;123:104994.
87. Tafazoli A, Tafazoli Moghadam E. *Camellia Sinensis* Mouthwashes in Oral Care: a Systematic Review. *J Dent (Shiraz).* 2020 Dec;21(4):249-262.
88. Taheri JB, Azimi S, Rafieian N, Zanjani HA. Herbs in dentistry. *Int Dent J.* 2011 Dec;61(6):287-96.
89. Taylor M, Brizuela M, Raja A. Oral Candidiasis. 2023 Jul 4. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–.
90. Thouri A, Chahdoura H, El Arem A, Omri Hichri A, Ben Hassin R, Achour L. Effect of solvents extraction on phytochemical components and biological activities of Tunisian date seeds (var. Korkobbi and Arechti). *BMC Complement Altern Med.* 2017 May 4;17(1):248.

91. Tripathi N, Sapra A. Gram Staining. 2023 Aug 14. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–.
92. Valasi L, Zafeiri EC, Thanou I, Pappas CS. Study of volatile compounds in Greek pistachio (*Pistacia vera* L. 'Aegina' cultivar) oils using Soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Heliyon*. 2023 Apr 20;9(5):e15623.
93. Wall G, Montelongo-Jauregui D, Vidal Bonifacio B, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2019 Dec;52:1-6.
94. Wang Y. Looking into *Candida albicans* infection, host response, and antifungal strategies. *Virulence*. 2015;6(4):307-8.
95. Yang F, Dinis M, Haghighi F, He X, Shi W, Chaichanasakul Tran N. Oral colonization of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in children with or without fixed orthodontic appliances: A pilot study. *J Dent Sci*. 2022 Jan;17(1):451-458.
96. Yang X, Wang D, Zhou Q, Nie F, Du H, Pang X, Fan Y, Bai T, Xu Y. Antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae: determination of disk content and Kirby-Bauer breakpoint for ceftazidime/avibactam. *BMC Microbiol*. 2019 Nov 1;19(1):240.
97. Yang L, Wen KS, Ruan X, Zhao YX, Wei F, Wang Q. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules*. 2018 Mar 27;23(4):762.