



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE CLAVO (*SYZYGIVM AROMATICUM*) Y
CANELA (*CINNAMOMUN ZEYLANICUM BLUME*) EN
DIFERENTES ESPECIES DEL GÉNERO *CANDIDA***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA :
KATERIN IVONNE REYES RAYA

ASESORA: QFB Leticia Cubillo Carrillo

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

Evaluación del efecto inhibitorio de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomun zeylanicum Blume*) en diferentes especies del género *Candida*.

Que presenta la pasante: **Katerin Ivonne Reyes Raya**
Con número de cuenta: **308147537** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de Enero de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q. Mario Arturo Morales Delgado	
VOCAL	Dr. Enrique Salas Téllez	
SECRETARIO	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enriquez	
2do. SUPLENTE	Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

“Este trabajo fue realizado en el laboratorio 10 de Microbiología en la Unidad de Posgrado FES Campo 1”

“Con el apoyo de Herbario Iztacala y Laboratorio de Química Medicinal y Teórica en la Unidad de Posgrado FESC “

Índice

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de <i>Candida spp.</i>	2
2. Factores de Patogenicidad.....	7
3. Morfogénesis.....	9
4. Candidiasis.....	112
5. Antimicóticos.....	14
6. Tratamiento para candidiasis.....	14
6.1 Derivados imidazólicos.....	18
6.2 Derivados triazólicos.....	19
6.3 Derivados poliénicos.....	20
6.4 Equinocandinas.....	20
6.5 Derivado de Pirimidina.....	20
7. Métodos de diagnóstico.....	21
8. Importancia de la candidiasis en materia de Salud Pública.....	222
9. Aceites esenciales.....	222
9.1 Composición.....	23
9.2 Distribución y estado natural.....	23
10. Métodos de extracción.....	244
10.1 Expresión.....	24
10.2 Destilación por arrastre de vapor de agua.....	25
10.3 Extracción con solventes volátiles.....	25
10.4 Enflorado o enfleurage.....	25
10.5 Extracción con fluidos supercríticos.....	26
11. Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	26
11.1 Componente principal del aceite esencial de clavo: Eugenol.....	28
11.2 Propiedades del Clavo.....	28
11.3 Mecanismo de acción de Clavo.....	30
12. Canela (<i>Cinnamomun zeylanicum Blume</i>).....	31
12.1 Componente principal del aceite esencial de Canela: Cinamaldheído.....	33
12.2 Propiedades de la Canela.....	33

12.3 Mecanismo de acción de Canela.....	35
13. Métodos para evaluar la capacidad antibacterial de los aceites esenciales.....	37
13.1 Técnica de difusión en agar.....	37
13.2 Método de dilución en agar.....	37
14. JUSTIFICACIÓN.....	38
15. HIPÓTESIS.....	39
16. OBJETIVO GENERAL.....	40
16.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	40
17. MÉTODOS.....	41
18. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	45
19. MATERIAL.....	49
20. RESULTADOS.....	50
21. DISCUSIÓN.....	63
22. CONCLUSIONES.....	69
23. Referencias.....	71
24. Anexos.....	74
24.1 Anexo 1: Identificación taxonómica de las especies en Herbario IZTACALA.....	75
24.2 Anexo 2: Análisis Organoléptico de los Aceites Esenciales.....	78
24.3 Anexo 3: Norma para Aceites Esenciales.....	78
24.4 Anexo 4: Reactivos.....	79
24.5 Anexo 5: Equipo.....	80
24.6 Anexo 6: Cepas aisladas de <i>Candida spp</i>	81
24.7 Anexo 7. Resultados en AST ® BIOXON de los aceites esenciales.....	82
24.8 Anexo 8. Resultados de Chromagar <i>Candida</i> ® BD y agar Biggy ® BIOXON.....	83
24.9 Anexo 9: Fundamento de Agar Mueller Hinton adicionado con glucosa al 2 %.....	87
24.10 Anexo 10: Porcentaje de Rendimiento.....	88
24.11 Anexo 11. Referencias de espectro IR.....	89
24.12 Anexo 12. Susceptibilidad de especies de <i>Candida spp</i>	91
24.13 Anexo 13. Susceptibilidad de antimicóticos de referencia marca ® HIMEDIA.....	91
24.14 Anexo 14: Conservación de levaduras y medios de cultivo.....	92
24.15 Anexo 15: Disposición de residuos.....	93

AGRADECIMIENTOS

“Quiero compartir con ustedes el secreto que
me ha llevado a alcanzar mis metas:
mi fuerza reside únicamente en mi tenacidad”

Louis Pasteur

El presente trabajo de tesis es dedicado a mi familia, a los cuales agradezco su esfuerzo, dedicación y buenos consejos, los que me han apoyado y ayudado a cumplir mi sueño de titularme y llegar hasta este punto de mi vida. Todo lo que soy se lo debo a ellos ya que me han enseñado valores muy valiosos que me han llevado a aprender y ser constante con mis metas.

También quiero agradecer a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán porque, me dio la oportunidad de crecer profesionalmente y a esta licenciatura ya que es de mucha perseverancia y dedicación así como a los profesores de FESC- Campo 1 que compartieron sus conocimientos académicos así como sus experiencias laborales.

A mis amigos de la tercera generación de Bioquímica que me acompañaron a lo largo de este sueño que hoy se hace realidad y los cuales me dejaron experiencias y momentos inolvidables y sobre todo su amistad y que espero encontrar a lo largo de mi vida profesional.

A la profesora QFB. Leticia Cubillo Carrillo por creer en mí, permitiendo desarrollar mi tesis en el laboratorio 10 de Unidad de Posgrado dándome su apoyo y enseñanza para desarrollar este proyecto.

A mi profesor de servicio social IQ. Daniel Mauricio Vicuña Gómez el cual me brindo su amistad y apoyo incondicional y al cual le debo mi respeto y admiración.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
5-FC	5-Fluorocitosina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AE	Aceite esencial
AmB	Anfotericina B de lípidos complejos
AMB	Anfotericina B coloidal de dispersión
AmB-D	Anfotericina B desoxicolato
AST	Agar soya tripticaseína
ATCC	Colección americana de cultivos tipo (del inglés American Type Culture Collection)
ATPasa	<u>Adenosintrifosfatasa</u>
Biggy	Agar bismuto glucosa glicina extracto
CIM	Concentración mínima inhibitoria
CMCC	Candidosis mucocutánea crónica
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos (del inglés Food and Drug Administration)
FTs2	Tubulina bacteriana
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
L-AmB	Anfotericina B liposómica
MH	Agar Mueller-Hinton
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida
NCCLSI	Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (del inglés National Committee for Clinical Laboratory Standards)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PHR1	Gen de sensibilidad al pH 1
PHR2	Gen de sensibilidad al pH 2
SDA	Agar dextrosa Sabouraud
SIDA	Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Taxonomía del género <i>Candida</i>	3
2	Sitios de aislamiento e importancia clínica de especies de <i>Candida</i>	5
3	Infecciones por <i>Candida</i> y factores predisponentes	6
4	Frecuencia de patogenicidad de especies de <i>Candida</i>	12
5	Clasificación de Candidiasis	13
6	Tipos de antimicóticos y grupos químicos	16
7	Tratamientos contra Candidiasis	18
8	Partes de la planta utilizadas en la obtención de aceite esencial	24
9	Especies de <i>Candida</i> en Chromagar <i>Candida</i> ® BD y agar Biggy® BIOXON	52
10	Promedio de Aceite Esencial de Clavo (<i>Syzygium Aromaticum</i>)	54
11	Promedio de Aceite Esencial de Canela (<i>Cinnamomun zeylanicum Blume</i>)	56
12	Eficacia de Anfotericina B® HIMEDIA (100 unidades/disco) en especies del genero <i>Candida</i>	59
13	Eficacia de Fluconazol® HIMEDIA (25 mcg/disco) en especies del genero <i>Candida</i>	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Candidiasis Bucal	4
2	Micografías de <i>Candida Albicans</i>	11
3	Historia de antimicóticos	14
4	Mecanismo de acción de los antimicóticos	15
5	Planta: <i>Syzygium aromaticum</i>	26
6	Botón floral desecado: <i>Syzygium aromaticum</i>	27
7	Estructura química de eugenol	28
8	Planta: <i>Cinnamomun zeylanicum Blume</i>	31
9	Corteza interior: <i>Cinnamomun zeylanicum Blume</i>	32
10	Estructura química de Cinamaldeído	33
11	Montaje del equipo	42
12	Espectroscopia Infrarroja de Canela (Cinamaldeído)	50
13	Espectroscopia Infrarroja de Clavo (Eugenol)	51
14	<i>Candida famata</i> sensible a AE de Clavo	53
15	<i>Candida lusitaniae</i> sensible a AE de Clavo	53
16	<i>Candida krusei</i> sensible a AE de Clavo	53
17	<i>Candida tropicalis</i> sensible a AE de Clavo	53
18	<i>Candida glabrata</i> sensible a AE de Clavo	53
19	<i>Candida guilliermondii</i> sensible a AE de Clavo	53
20	<i>Candida albicans</i> sensible a AE de Clavo	53
21	<i>Candida stellatoidea</i> sensible a AE de Clavo	53
22	<i>Candida parapsilosis</i> sensible a AE de Clavo	53
23	<i>Candida famata</i> sensible a AE de Canela	55
24	<i>Candida lusitaniae</i> sensible a AE de Canela	55
25	<i>Candida krusei</i> sensible a AE de Canela	55
26	<i>Candida tropicalis</i> sensible a AE de Canela	55
27	<i>Candida glabrata</i> sensible a AE de Canela	55
28	<i>Candida guilliermondii</i> sensible a AE de Canela	55
29	<i>Candida albicans</i> sensible a AE de Canela	55
30	<i>Candida stellatoidea</i> sensible a AE de Canela	55
31	<i>Candida parapsilosis</i> sensible a AE de Canela	55
32	Comparación de la efectividad de las especies del género <i>Candida</i> respecto a cada aceite esencial	57
33	<i>Candida famata</i> sensible a Anfotericina B	58
34	<i>Candida lusitaniae</i> sensible a Anfotericina B	58
35	<i>Candida krusei</i> sensible a Anfotericina B	58
36	<i>Candida tropicalis</i> sensibilidad intermedia a Anfotericina B	58
37	<i>Candida glabrata</i> sensible a Anfotericina B	58
38	<i>Candida guilliermondii</i> sensible a Anfotericina B	58
39	<i>Candida albicans</i> sensible a Anfotericina B	58
40	<i>Candida stellatoidea</i> sensible a Anfotericina B	58
41	<i>Candida parapsilosis</i> sensible a Anfotericina B	58
42	<i>Candida famata</i> sensible a Fluconazol	60
43	<i>Candida lusitaniae</i> sensible a Fluconazol	60

44	<i>Candida krusei</i> sensible a Fluconazol	60
45	<i>Candida tropicalis</i> sensible a Fluconazol	60
46	<i>Candida glabrata</i> sensible a Fluconazol	60
47	<i>Candida guilliermondii</i> sensible a Fluconazol	60
48	<i>Candida albicans</i> resistente a Fluconazol	60
49	<i>Candida stellatoidea</i> resistente a Fluconazol	60
50	<i>Candida parapsilosis</i> sensible a Fluconazol	60
51	Comparación de la efectividad de las especies del genero <i>Candida</i> respecto a cada antimicótico de referencia y aceite esencial	62
52	Identificación taxonómica: Clavo (<i>Syzygium Aromaticum</i>)	76
53	Identificación taxonómica: Canela (<i>Cinnamomun zeylanicum Blume</i>)	77
54	Espectrómetro FT-IR Nicolet™ iS™10	80
55	Especies de <i>Candida</i> en agar Dextrosa Sabouraud® MCD – LAB	81
56	Control negativo sin contaminación en AE de Clavo	82
57	Control negativo sin contaminación en AE de Canela	82
58	Especies de <i>Candida</i> en agar Chromagar <i>Candida</i> ® BD	84
59	Especies de <i>Candida</i> en agar Biggy® BIOXON	86
60	Espectroscopia infrarroja de referencia; Eugenol (Clavo)	89
61	Espectroscopia infrarroja de referencia; Cinamaldehído (canela)	90

RESUMEN

Se utilizaron 9 muestras clínicas de diferentes especies de *Candida* del año 2015 las cuales fueron sembradas en agar Dextrosa Sabouraud y posteriormente cultivados en medio Chromoagar *Candida* y agar Biggy, para evaluar su morfología colonial y su coloración. Posteriormente se realizó la técnica de destilación por arrastre de vapor con el fin de obtener aceites esenciales de las especias clavo y canela. Se utilizó acetato de etilo para la obtención del aceite esencial puro con la ayuda de un recuperador de solvente, posteriormente se realizó una espectroscopia infrarroja para identificar cualitativamente sus componentes. Se realizó la técnica Kirby-Bauer (difusión en disco) por triplicado a las muestras clínicas de *Candida* impregnando los sensidiscos de aceite esencial así como antimicóticos estandarizados (Anfotericina B y Fluconazol).

Los aceites esenciales pueden ser recomendados como tratamiento alternativo para onicomicosis ya que se demostró que son sensibles con las especies de *Candida* utilizadas.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La candidosis es una enfermedad micótica que se conoce desde la antigüedad. En su obra *Epidemisc*, Hipócrates descubrió que en niños recién nacidos y en pacientes debilitados se presentaban placas blanquecinas en la boca, a lo que denominó “estomatitis aftosa”. En Francia, Veron y Berg en 1835 descubrieron diversas variedades clínicas del padecimiento, pero no es sino hasta 1844 cuando Bennet, y en 1853 Robin, aislaron el hongo y propusieron de nueva cuenta que la enfermedad es propia de pacientes debilitados. A través de los años, muchos han sido los autores que han descrito las variedades clínicas de la candidosis y realizando trabajos epidemiológicos. En la actualidad sigue siendo una de las enfermedades más estudiadas a todos los niveles (Bonifaz, 2015).

El nombre del agente etiológico ha pasado por diversos géneros y especies, se han llegado a contar hasta 250 sinónimos y acrónimos; entre los más importantes se encuentran *Oidium albicans* (Robin, 1853) y *Monilia candida* (Bonoderm, Hansen, 1868), este último término utilizado hasta 1932, cuando gracias a los trabajos de Langeron y Talice, quedó clasificada como *Candida albicans* (Bonifaz, 2015).

1. Generalidades de *Candida spp.*

Existen más de 600 especies conocidas de levaduras, distribuidas en 60 géneros taxonómicos, de las cuales solo unas pocas especies son capaces de producir enfermedades en humanos (Biasoli, 2013) (Ver Cuadro 1), están ampliamente distribuidas en la naturaleza; en el suelo y agua dulce, vegetales, frutas, exudado de árboles, granos y en general toda sustancia rica en hidratos de carbono simples. Diversas especies de *Candida* son componentes de la flora habitual del cuerpo; se presentan desde los primeros días del nacimiento y tienen una gran predilección por

las mucosas. Se encuentran en el tracto gastrointestinal (40 a 50 %) y tracto respiratorio superior (boca, laringe, faringe).

Las especies *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida dublinensis*, son frecuentemente aisladas de infecciones en humanos, siendo *Candida albicans* la más relevante en términos de patogenicidad (Pfaller & Diekema, 2007). El género *Candida* es una levadura con ausencia de pigmentos (melánicos y carotenoides); forma celular variable, es decir, las células pueden ser elípticas, globosas, cilíndricas y triangulares; tienen pared celular con dos capas; su reproducción es por gemación holoblástica o blastoconidios y pueden formar pseudohifas e hifas a excepción de *Candida glabrata* (Arenas, 2014) (Bonifaz, 2015)

Clase: Ascomycetes

Subclase: Hemyascomycetes

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccaromycetes

Género: *Pichia*, *Hansenula*, *Arxiozyma* (estados teleomórficos, levaduras ascosporadas)

Especies: (a los estados anamórficos se les denomina *Candida*)

Candida albicans

Candida glabrata

Candida glabrata

Candida krusei

Candida parapsilosis

Candida dubliniensis

Candida lusitaniae

Candida kefyr

Candida guilliermondii

Candida famata

Cuadro 1. Taxonomía del género *Cándida*, tomado de (Bonifaz, 2015)

Candida spp, corresponde a un grupo de hongos, formado por más de 100 especies que potencialmente afectan al ser humano. *Candida albicans*, es el más representativo de este grupo, otras especies de *Candida*, forma parte normal de la microbiota humana y las especies que se aíslan con más frecuencia se encuentran en las lesiones de candidosis (Ver Cuadro 2). Las manifestaciones patológicas más frecuentes son las infecciones superficiales, por ejemplo vulvovaginitis o candidiasis oral (Figura 1). Diferentes especies de *Candida* pueden producir compromiso específico con algunos órganos en pacientes con enfermedades crónicas que les provoca inmunodeficiencia (p. ej.: candidiasis esofágica). Solo algunos pacientes que se encuentran hospitalizado bajo terapia con antimicrobianos de amplio espectro y/o invadidos por un dispositivo biomédico (catéter central, tubo oro-traqueal) pueden presentar infecciones fúngicas invasoras (Tobar, 2011). Existen otros factores de predisposición y riesgo asociados a candidiasis (Ver Cuadro 3) (Bonifaz, 2015).



Figura 1. Candidiasis Bucal, tomada de: <http://www.gettyimages.com/detail/news-photo/oral-thrush-aphthae-candida-albicans-image-courtesy-cdc-news-photo/509396610#oral-thrush-aphthae-candida-albicans-image-courtesy-cdc-1990-picture-id509396610>

Agente etiológico	Sitios de aislamiento probables	Importancia clínica
<i>Candida albicans</i>	Secreciones respiratorias, vagina, orina, piel, orofaringe, lavados gástricos, sangre, heces, aspiración transtraqueal, córnea, uñas, líquido cefalorraquídeo, hueso, líquido peritoneal	Infección pulmonar, vaginitis, infecciones urinarias, dermatitis, fungemia, queratitis micótica, onicomicosis, meningitis, osteomielitis, peritonitis, miocarditis, endocarditis, endoftalmitis, infección diseminada, muguet, artritis
<i>Candida glabrata</i>	Secreciones respiratorias, orina, vagina, lavados gástricos, sangre, piel, orofaringe, aspiración transtraqueal, heces, médula ósea, piel, uñas	Infección pulmonar, infecciones urinarias, vaginitis, fungemia, infección diseminada, endocarditis, onicomicosis
<i>Candida tropicalis</i>	Secreciones respiratorias, orina, lavados gástricos, vagina, sangre, piel, orofaringe, aspiración transtraqueal, heces, líquido pleural, líquido peritoneal, córnea, uñas	Infección pulmonar, vaginitis, muguet, endoftalmitis, endocarditis, artritis, peritonitis, queratitis micótica, fungemia, onicomicosis
<i>Candida parapsilosis</i>	Secreciones respiratorias, orina, lavados gástricos, sangre, vagina, orofaringe, piel, aspiración transtraqueal, heces, líquido pleural, oído, uñas	Endoftalmitis, endocarditis, vaginitis, queratitis micótica, onicomicosis externa, paroniquia, fungemia, onicomicosis
<i>Candida krusei</i>	Secreciones respiratorias, orina, lavados gástricos, orofaringe, sangre, aspiración transtraqueal, heces, córnea, uñas	Endocarditis, vaginitis, infecciones urinarias, queratitis micótica
<i>Candida guilliermondii</i>	Secreciones respiratorias, lavados gástricos, vagina, piel, uñas, orofaringe, sangre, cornea, hueso, orina	Endocarditis, fungemia, dermatitis, onicomicosis, queratitis micótica, osteomielitis, infecciones urinarias
<i>Candida famata</i>	Piel, orina, córnea, uña	Dermatitis, infecciones urinarias, queratitis micótica, onicomicosis
<i>Candida lusitanae</i>	Secreciones respiratorias, lavados gástricos	Infección pulmonar, fungemia
<i>Candida stellatoidea</i>	Vagina	Vaginitis

Cuadro 2. Sitios de aislamiento e importancia clínica de especies de *Candida*, tomada de: (Enache-Angoulvant, 2007); (Arenas, 2014); (Forbes, 2007)

La incidencia y prevalencia de las infecciones fúngicas invasivas han aumentado desde la década de 1980, especialmente en poblaciones de pacientes inmunocomprometidos o aquellos hospitalizados con enfermedades graves. Las especies de *Candida* pertenecen a la microbiota normal de un individuo de la mucosa en cavidad oral, el tracto gastrointestinal y la vagina, y son responsables de varias manifestaciones clínicas de crecimiento mucocutáneo al torrente sanguíneo (Sardi, 2016). Estas levaduras son comensales en los seres humanos sanos y pueden causar infecciones sistémicas en situaciones inmunocomprometidas debido a su gran capacidad de adaptación a diferentes organismos.

Tipo de candidosis	Factor predisponente o de riesgo
Orofaringea	Edad avanzada, uso de prótesis dentales, <i>diabetes mellitus</i> , antibióticos, radioterapia, corticoesteroides inhalados y sistémicos, quimioterapia citotóxica, infección por VIH, enfermedades hematológicas, trasplantes de órganos sólidos o de células madre
Esofágica	Corticoesteroides sistémicos, SIDA, cáncer, células madre
Gastrointestinal	Cáncer, cirugías
Vulvovaginal	Anticonceptivos orales, embarazo, <i>diabetes mellitus</i> , corticoesteroides sistémicos, uso de antibióticos
Cutánea y onicomicosis	Humedad local y oclusión, <i>diabetes mellitus</i> , inmersión de las manos en agua, enfermedad vascular periférica
Cutánea congénita	Cuerpo extraño intrauterino, neonato prematuro
Mucocutánea crónica	Defectos en linfocitos T y procesos endocrinológicos
Tracto urinario	Catéter urinario infestado, obstrucción urinaria, procedimientos del tracto urinario, <i>diabetes mellitus</i>
Neumonía	Aspiración, inmunosupresión, trasplantes
Endocarditis	Cirugía mayor, endocarditis bacteriana o enfermedad cardiaca valvular, abuso de drogas intravenosas, catéter venoso central
Pericarditis	Cirugía torácica, inmunosupresión
Sistema nervioso central	Cirugía del sistema nervioso central, cirugía ocular, derivación ventrículo-peritoneal
Ocular	Traumas, esteroides tópicos, cirugías
Abdominal	Perforación recurrente, cirugía abdominal repetitiva, pancreatitis, diálisis peritoneal ambulatoria continua
Hematógena	Trasplante de órganos sólidos, colonización, uso prolongado de antibióticos, cirugía abdominal, cuidados intensivos, nutrición parental total, hemodiálisis, inmunosupresión, trasplante de hígado o de células madre

Cuadro 3. Infecciones por *Cándida* y factores predisponentes, tomado de (Bonifaz, 2015)

2. Factores de Patogenicidad

La patogenicidad de especies de *Candida* se atribuye a ciertos factores de virulencia, tales como la capacidad para evadir las defensas del huésped, la adhesión, la formación de biopelículas (el tejido del huésped y sobre productos sanitarios) y la producción de tejidos que dañan enzimas hidrolíticas tales como proteasas, fosfolipasas y hemolisina (Silva, 2009).

La candidiasis requiere de factores predisponentes; la mayor parte de las veces se origina de manera endógena, casi siempre se atribuye a dos procesos: 1) el desequilibrio de la flora microbiana, que favorece el incremento de levaduras de *Candida*, lo cual se puede atribuir a cambios en el pH, acumulación de nutrientes como el glucógeno, o la disminución de la flora bacteriana por antibióticos; o bien 2) debido a enfermedades o procesos que influyan en la respuesta inmune, sobre todo a nivel celular (Bonifaz, 2015).

Los casos exógenos siempre se inician por el ingreso al organismo de grandes cantidades de levaduras (por ejemplo, vía cateterismo o drogadicción), en los que se inoculan los microorganismos de manera directa al torrente circulatorio (Bonifaz, 2015).

En el desarrollo del padecimiento influyen una serie de factores que actúan de manera coordinada; los más importantes son los siguientes:

- a) **Adaptación al pH.** Las diversas especies de *Candida* tienen una gran adaptación a diversos medios y sustratos; siendo capaces de soportar cambios de pH. Esta propiedad está regida por dos genes (*PHR1* y *PHR2*); ambos se activan o inactivan en diferentes condiciones; el primero se activa en pH neutro o ligeramente básico (presentándose en sangre o piel alcalinizada) y se inactiva en medio ácido, a este pH se activa el segundo (por ejemplo la vagina) (Bonifaz, 2015).

b) Adhesinas. Son una serie de sustancias que influyen en la adaptación o adhesión de la levadura; su presencia está bien comprobada en *Candida albicans* y *Candida glabrata*. Las más importantes son las manoproteínas, las mananas y, por parte de las células receptoras o del hospedero, las manoproteínas de superficie tipo lectina, las cuales están reguladas por genes específicos (Bonifaz, 2015).

c) Enzimas. Se han reportado como factores de virulencia de las especies de *Candida* a diversas enzimas; las más importantes son: queratinasas, peptidasas, hemolisinas, proteasas y hialuronidasas. En forma específica: aspartilproteínasa secretora, fosfolipasas y lipasas (Bonifaz, 2015).

d) Transición morfológica. Es la capacidad que tienen estas levaduras de cambiar morfológicamente de blastoconidio a pseudohifa e hifa. Este cambio es estimulado por las condiciones ambientales y se considera uno de los factores de patogenicidad o virulencia más significativos. Es preciso enfatizar que esta propiedad hace que dichas levaduras se comporten como hongos dimórficos; las formas de pseudofilamentos y filamentos son las que marcan infección (Bonifaz, 2015).

Este proceso tiene excepción en *Candida glabrata*, que no sufre cambios morfológicos, por lo que se considera una levadura monomórfica, muy parecida a *Saccharomyces* (Bonifaz, 2015).

e) Variabilidad fenotípica. Entendido como la capacidad que tienen estas levaduras de hacer grandes cambios fenotípicos, como son diferencias en las macromorfología colonial (colonias lisas, rugosas), y cambios en la antigenicidad, como aumento o disminución en la producción de enzimas y

toxinas. Este fenómeno de cambio fenotípico se da a manera de una estrategia del agente frente a las diferentes células que ataca y medios que soporta (Bonifaz, 2015).

- f) Formación de biopelículas o biofilms.** Es una propiedad de patogenicidad, la cual presentan diversos agentes, como las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.* y otras levaduras. Una biopelícula es una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie que permanecen unidos con fuerza por sustancias poliméricas secretadas por ellos mismos. Esta conformación le da persistencia, así como alta capacidad defensiva y mayor resistencia al ataque de los antibióticos y antimicóticos, las especies de *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* tienen mayor capacidad de formar estas biopelículas (Bonifaz, 2015).

En la actualidad en todo el mundo, ha aumentado el número de levaduras que presentan resistencia a los fármacos antifúngicos, por lo tanto, el uso de pruebas de laboratorio *in vitro* puede ayudar a determinar una terapia apropiada (Bonifaz, 2015).

3. Morfogénesis

Candida albicans es polimórfica, ya que existe en forma de levadura (blastocnidios o blastosporas) o como filamentos (pseudohifa o hifa). La morfogénesis se refiere a la transición entre las levaduras (unicelulares) y la forma de crecimiento filamentosa del microorganismo, que puede convertirse de forma reversible a células de levadura, con crecimiento de hifa o pseudohifa (Castrillón, 2005).

La conversión de la forma unicelular de levadura al crecimiento filamentoso es esencial para la virulencia de *Candida albicans*. La morfogénesis, por sí misma, está bajo múltiples controles y rutas de transducción de señales. La transición de levadura a hifa es uno de los atributos de virulencia que capacitan a *Candida albicans* para invadir los tejidos (Castrillón, 2005). Como criterio general, se puede distinguir los distintos tipos celulares (Ver Figura 2):

- **Levaduras:** También denominadas blastoconidios y blastosporas. Se reproducen asexualmente por gemación multilateral, y corresponden a la fase unicelular del hongo. Cuando la yema alcanza su tamaño óptimo, se produce la división celular y se forma una cicatriz de gemación entre la célula madre y la hija. Se representan como levaduras ligeramente pleomórficas, desde ovoideas hasta esféricas (Caminero, 2013).
- **Hifas:** También conocidos como micelios. Son células que han sufrido un crecimiento apical continuo, cuya elongación va seguida de tabicación interna por septos a intervalos regulares, y conservan una comunicación citoplasmática a través de poros en sus septos de división. Pueden generar yemas laterales o ramificaciones que continúan siendo mononucleadas (Caminero, 2013).
- **Pseudohifas:** También llamados pseudomicelios. Están constituidos por células que han quedado unidas a la madre, dando como resultado agrupaciones de células elongadas unidas, de forma variable, en cadenas y racimos, pero sin continuidad citoplasmática a diferencia de los micelios. Algunas veces muestran una apariencia miceliar (Caminero, 2013).

- **Clamidosporas:** Son células de forma más o menos esférica (aproximadamente 10 μm de diámetro), cubiertas por una pared gruesa y muy refringentes, que se generan a partir de hifas o pseudohifas en estado estacionario. Básicamente son el producto del crecimiento en ausencia de nutrientes, o promovido por otros tipos de estrés, siendo consideradas como estructuras aletargadas o de resistencia (Caminero, 2013).

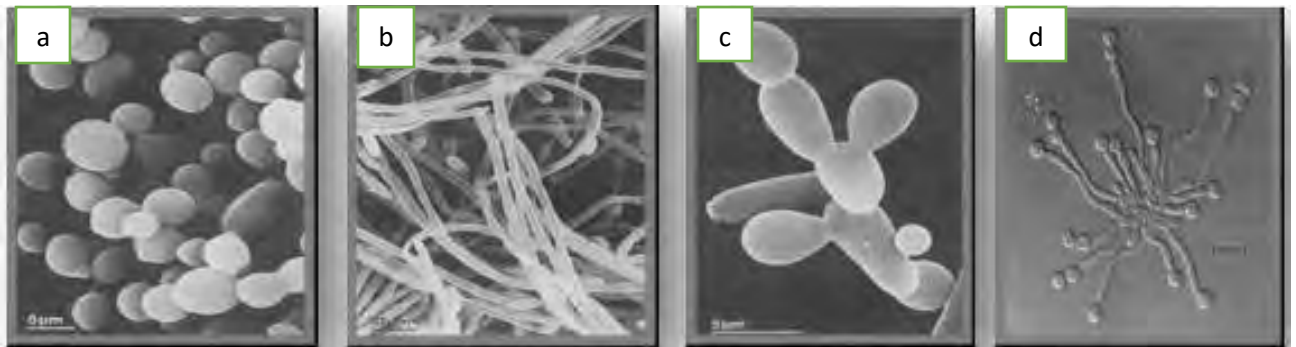


Figura 2. Micrografías de *Candida albicans*: a) Levaduras; b) Hifas; c) Pseudohifas; d) Clamidosporas, tomadas de (Caminero, 2013).

Se ha comprobado que el crecimiento de forma filamentosa tiene ventajas sobre la levadura en la penetración de la célula o tejido, la hifa puede abrir barreras tisulares, gracias a que su punta es el sitio de secreción de enzimas capaces de degradar proteínas, lípidos y otros componentes celulares, ésta facilita su infiltración en sustratos sólidos y tejidos. En general, las levaduras predominan durante la colonización de la mucosa en el huésped sano, pero la hifa emerge cuando las defensas de éste declinan. Por lo tanto, ambas formas de crecimiento podrían desempeñar un papel importante en la patogénesis y encontrarse en muchos microambientes diferentes en el huésped (Castrillón, 2005).

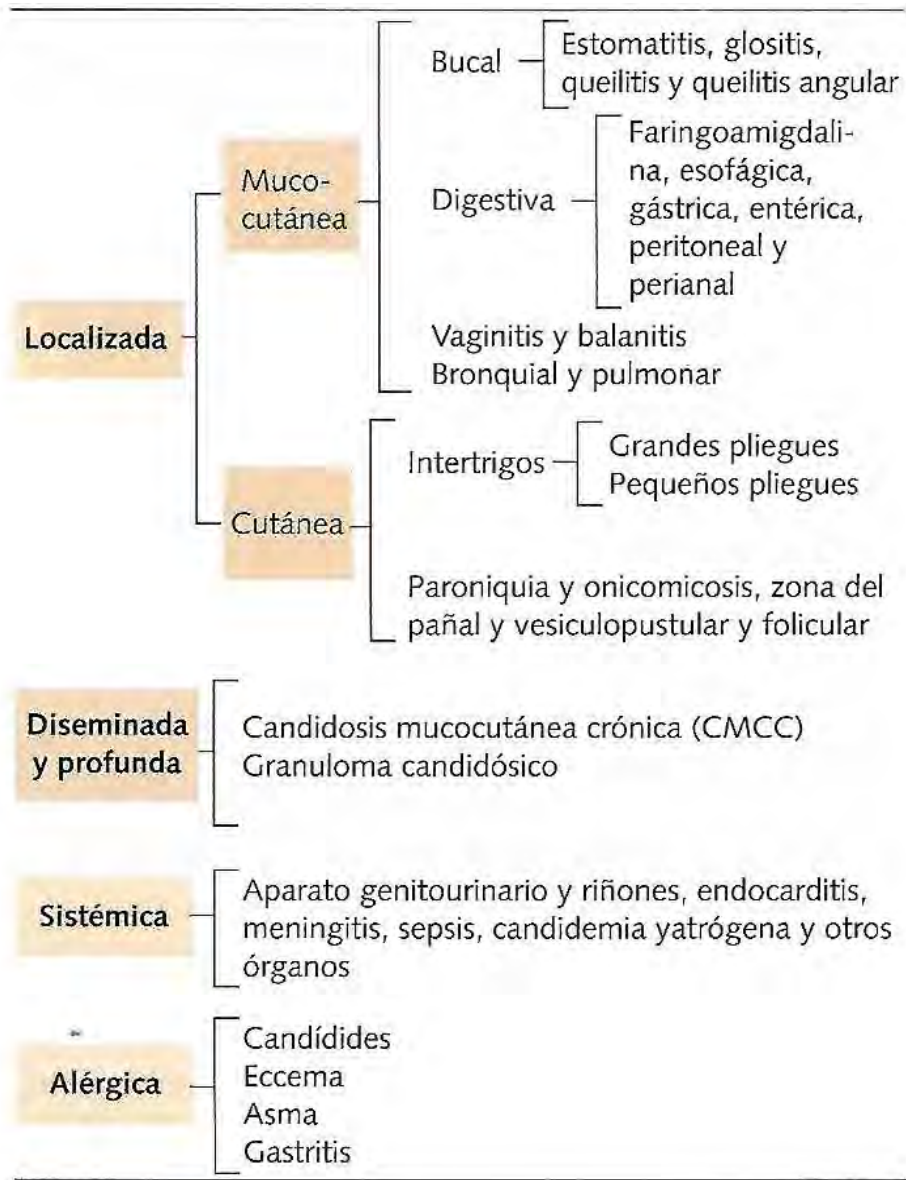
4. Candidiasis

La candidiasis es una micosis primaria o secundaria ocasionada por levaduras endógenas y oportunistas del género *Candida*. Las especies más frecuentes son: *Candida albicans* (40 - 85 %), *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae* (Ver Cuadro 4) (Bonifaz, 2015). Las manifestaciones clínicas son localizadas, diseminadas o sistémicas; puede afectar piel, mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación mínima hasta supuración o granuloma. La evolución es aguda, subaguda o crónica (Arenas, 2014). Es una infección cosmopolita, en general afecta a todos los grupos de edad, sexo, raza y ocupación (López, Méndez, Hernández, & Castañon, 2012).

Especie	Frecuencia
<i>C. albicans</i>	50 %
<i>C. tropicalis</i>	15 - 30 %
<i>C. parapsilosis</i>	15 - 30 %
<i>C. glabrata</i>	15 - 30 %
<i>C. krusei</i>	~1 %
<i>C. guilliermondii</i>	~1 %
<i>C. lusitanae</i>	~1 %
<i>C. dubliniensis</i>	~1 %

Cuadro 4. Frecuencia de patogenicidad de especies de *Candida* tomado de
(Castañon, 2012)

La clasificación de candidiasis más frecuentes y polimórficas que atacan al hombre; su nivel de profundidad y gravedad no depende tanto del agente etiológico en sí, sino del factor de predisposición con el que se asocie (Ver Cuadro 5).



Cuadro 5. Clasificación de Candidiasis, tomado de: (Arenas, 2014)

5. Antimicóticos

La síntesis de estos fármacos comenzó en el siglo XX y desde entonces no ha cesado el diseño de nuevas moléculas para combatir a las infecciones fúngicas invasoras (Ver figura 3).

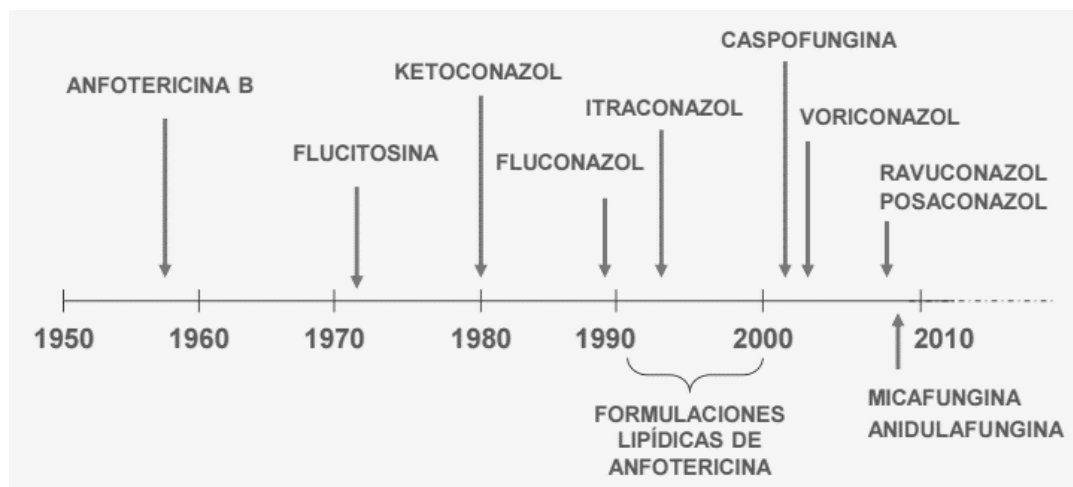


Figura 3. Historia de antimicóticos, tomada de: (Biasoli, 2013)

6. Tratamiento para candidiasis

Se ha revisado una enorme variedad de enfermedades tanto superficiales como sistémicas causadas por diversos hongos patógenos primarios y oportunistas, sus características clínicas y algunas condiciones particulares de los agentes etiológicos y el hospedero en cada caso (Bonifaz, 2015). Para el tratamiento óptimo de estas enfermedades es indispensable contar con opciones terapéuticas lo más adecuadas en cada situación; en esa búsqueda del antimicótico “ideal” hay una gran cantidad de fármacos; algunos han pasado la prueba del tiempo y continúan siendo eficaces, de fácil aplicación e incluso de bajo costo, resultando útiles en las enfermedades (Bonifaz, 2015).

De esta forma, se continúa en la búsqueda de nuevos medicamentos que cumplan en la mayor medida las expectativas del antimicótico “ideal”: un amplio espectro y eficacia clínica, bajas tasas de resistencia, menos efectos adversos e interacciones medicamentosas; disponibilidad en el mercado y un costo accesible (Bonifaz, 2015).

Los antimicóticos, llamados también antifúngicos, son una serie de medicamentos que tienen diversas acciones frente a los hongos productores de micosis superficiales, subcúrneas y profundas, tanto patógenos primarios como oportunistas. A este tipo de fármacos se le puede dividir de acuerdo con diferentes características: mecanismo de acción (Ver Figura 4), composición química, espectro de acción y los tipos de tipo de antimicóticos de acuerdo al grupo químico al que pertenecen (Ver Cuadro 6).

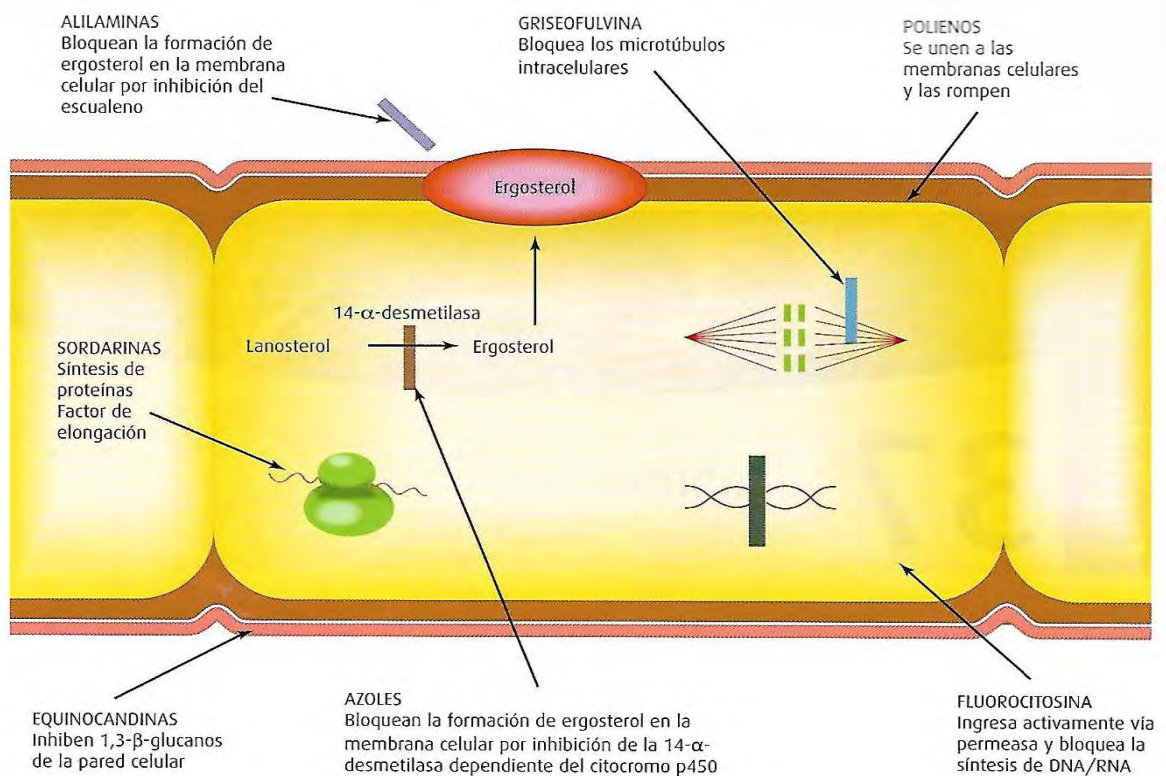


Figura 4. Mecanismo de acción de los antimicóticos (tomada y modificada de (Bonifaz, 2015) (Hernandez, 2003)

Tipo de antimicóticos	Grupos y ejemplos
1. Inhibidores de la síntesis del ergosterol	<ul style="list-style-type: none"> • Imidazólicos: bifonazol, ketoconazol, miconazol, isoconazol, etcétera. • Triazólicos: fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, etcétera. • Alilaminas: naftifina, terbinafina • Bencilaminas: butenafina
2. Desestabilizadores de membrana fúngica (derivados poliénicos)	<ul style="list-style-type: none"> • Anfotericina B desoxicolato • Anfotericina B lipídica • Anfotericina B liposomal • Anfotericina B de dispersión coloidal • Nistatina • Pimaricina (natamicina)
3. Inhibidores de síntesis de ácidos nucleicos	<ul style="list-style-type: none"> • 5-fluorocitosina
4. Inhibidores de la mitosis fúngica	<ul style="list-style-type: none"> • Griseofulvina
5. Inhibidores de la síntesis de proteínas	<ul style="list-style-type: none"> • Sordarinas
6. Inhibidores de la síntesis de pared celular fúngica	<ul style="list-style-type: none"> • Equinocandinas y neumocandinas: micafungina, anidulafungina y caspofungina • Nikkomicinas
7. Grupo misceláneo	<ul style="list-style-type: none"> • Amorolfina • Ciclopiroxolamina • Derivados tiocarbamatos: tolnaftato y tolclolato

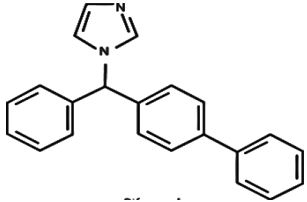
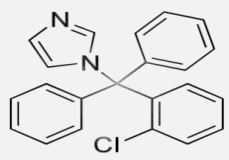
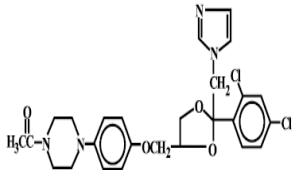
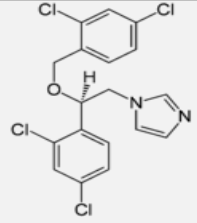
Cuadro 6. Tipos de antimicóticos y grupos químicos, tomada de (Bonifaz, 2015)

Candida sp. se puede tratar con varios antimicóticos pero es importante aclarar que depende el tipo de candidiasis y del factor predisponente al que esté ligado; por tanto, a veces la terapia es muy sencilla y solo se requieren tratamientos tópicos, mientras que en otras situaciones es necesario que sea por vía sistémica y por tiempo prolongado.

Existen tratamientos específicos de acuerdo a la especie de *Candida* que se presente, y de acuerdo a la NCCLS Anfotericina B y Fluconazol presentan mayor efecto inhibitorio *in vitro*.

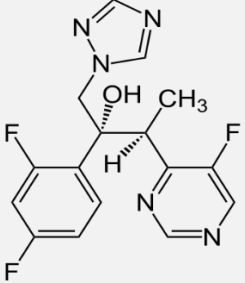
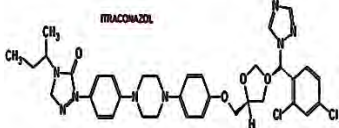
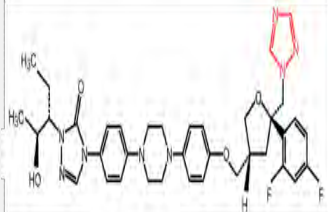
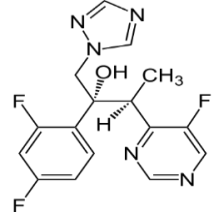
Los agentes antifúngicos sistémicos que han demostrado ser efectivos en el tratamiento de la candidiasis comprenden 4 categorías principales: 1) los polienos (AmB-d, L-AmB, complejo lipídico de AmB y dispersión coloidal de AmB), 2) los triazoles (fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol), 3) las equinocandinas (caspofungina, anidulafungina y micafungina) y 4) la flucitosina (Ver Cuadro 7) (Pappas, 2009).

El fluconazol, itraconazol, voriconazol y el posaconazol demuestran actividad similar contra la mayoría de las especies de *Candida* (Ver Anexo 12). Cada uno de los azoles tiene menos actividad contra *C. glabrata* y *C. krusei*. Todos los antifúngicos azoles inhiben las enzimas del citocromo P-450 hasta cierto grado. Por lo tanto, los médicos clínicos deben considerar detenidamente la influencia sobre el régimen de medicamentos de un paciente al agregar o suspender un azol.

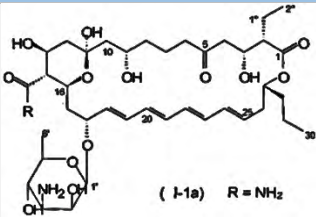
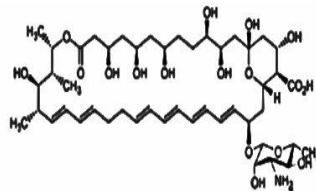
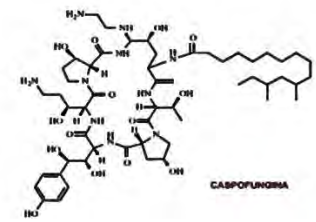
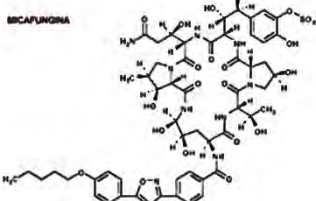
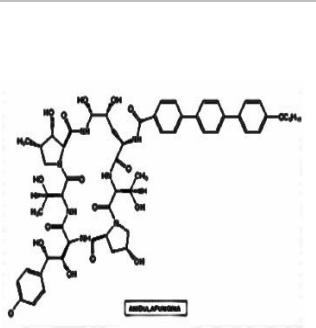
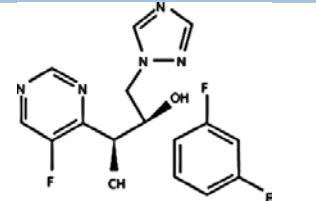
6.1 Derivados imidazólicos (los más representativos)			
Antimicótico	Mecanismo de acción	Espectro	Estructura química
Bifonazol	Fungistático a nivel de membrana celular. Inhibe síntesis del ergosterol por la 14- α -esterol-desmetilasa. Inhibición de la síntesis del ácido mevalónico (enzima 24- hidroximetilglutaril-CoA)	- <i>Candida spp.</i> ; otras levaduras como: <i>Malassezia spp.</i> - Dermatofitos	
Clotrimazol	Fungistático. Inhibe síntesis de ergosterol por la la 14- α esterol-desmetilasa. (interrupción de formación me membranas)	- <i>Candida spp.</i> -Dermatofitos	
Ketoconazol	Fungistático. Inhibe síntesis del ergosterol por la 14- α -esterol-desmetilasa. (interrupción de formación me membranas)	-Hongos levaduriformes (<i>Candida sp.</i> , <i>C. neoformans</i> . -Hongos dimórficos -Dermatofitos	
Miconazol	Fungistático. Inhibe síntesis del ergosterol por la 14- α -esterol-desmetilasa. (interrupción de formación me membranas)	-Hongos levaduriformes (<i>Candida sp.</i>) -Dermatofitos	

Tratamientos contra Candidiasis (continuación)

6.2 Derivados triazólicos

<p>Fluconazol</p>	<p>Fungistático. Síntesis del ergosterol por la 14-α-esterol-desmetilasa. (interrupción de formación me membranas)</p>	<p>-<i>Candida spp.</i> -<i>Malassezia spp.</i> -Activo frente a dermatofitos y hongos dimórficos. -Resistente para <i>Candida krusei</i>; <i>C. glabrata</i> y algunas cepas de <i>C. albicans</i>.</p>	 <p>The image shows the chemical structure of Fluconazole, a triazole antifungal. It features a central 1,5-diazol-3-ylmethyl group attached to a 2,4-difluorophenyl ring. This ring is further substituted with a 2,4-difluorophenyl group and a 2-methyl-2-(2,4-difluorophenyl)propan-1-yl group.</p>
<p>Itraconazol</p>	<p>Fungistático. Inhibe síntesis del ergosterol por la 14-α-esterol-desmetilasa. (interrupción de formación me membranas)</p>	<p>-<i>Candida spp.</i> -<i>Malassezia spp.</i> Y <i>Cryptococcus neoformans</i>. -Hongos dimórficos bifásicos y oportunistas.</p>	 <p>The image shows the chemical structure of Itraconazole, a benzimidazole antifungal. It consists of a benzimidazole core with a 2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl group at position 2 and a 2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl group at position 5. The label 'ITRACONAZOL' is placed above the structure.</p>
<p>Posaconazol</p>	<p>Fungistático. Inhibe síntesis de ergosterol por la 14-α-esterol-desmetilasa. (interrupción de formación me membranas)</p>	<p>Cepas resistentes de <i>Candida spp.</i>, a fluconazol e itraconazol, así como contra <i>Cryptococcus neoformans</i>, <i>Aspergillus spp.</i>, etc.</p>	 <p>The image shows the chemical structure of Posaconazole, a benzimidazole antifungal. It features a benzimidazole core with a 2-(2,4-difluorophenyl)ethyl group at position 2 and a 2-(2,4-difluorophenyl)ethyl group at position 5. A red pentagon highlights a specific substituent on the structure.</p>
<p>Voriconazol</p>	<p>Fungistático. Inhibe síntesis de ergosterol por la 14-α-esterol-desmetilasa. (interrupción de formación me membranas)</p>	<p><i>Candida spp.</i>, infecciones severas diseminadas en la piel y a nivel abdominal y renal.</p>	 <p>The image shows the chemical structure of Voriconazole, a triazole antifungal. It features a central 1,5-diazol-3-ylmethyl group attached to a 2,4-difluorophenyl ring. This ring is further substituted with a 2,4-difluorophenyl group and a 2-methyl-2-(2,4-difluorophenyl)propan-1-yl group.</p>

Tratamientos contra Candidiasis (continuación)

6.3 Derivados poliénicos (los más representativos)			
Anfotericina B	Fungistático y fungicida. Interrumpe la formación de membranas (esteroles)	<i>Candida spp.</i> (incluyendo <i>C. glabrata</i> y <i>C. parapsilosis</i>), <i>C. neoformans</i> .	 <p>(1a) R = NH₂</p>
Nistatina	Similar a la anfotericina B	-Levaduras (<i>Candida spp.</i> Y <i>C. neoformans</i>) -Hongos dimórficos - <i>Aspergillus spp.</i>	
6.4 Equinocandinas			
Caspofungina	Inhibe la síntesis de la 1, 3 β-glucana (pared fúngica), resultando en inestabilidad osmótica y muerte del hongo	Fungicida para <i>Candida spp.</i> Y fungistática para <i>Aspergillus spp.</i> , etc.	 <p>CASPOFUNGINA</p>
Micafungina	Inhibe la síntesis de la 1, 3 β-glucana (pared fúngica), resultando en inestabilidad osmótica y muerte del hongo	Fungicida para <i>Candida spp.</i> y fungistática para <i>Aspergillus spp.</i> , etc.	 <p>MICAFUNGINA</p>
Anidulafungina	Inhibe la síntesis de la 1, 3 β-glucana (pared fúngica), resultando en inestabilidad osmótica y muerte del hongo	Fungicida para <i>Candida spp.</i> (cepas resistentes como <i>C. krusei</i> y <i>C. lusitaniae</i>) y fungistática para <i>Aspergillus spp.</i> Actúa contra biofilms de especies de <i>Candida</i>	 <p>ANIDULAFUNGINA</p>
6.5 Derivado de Pirimidina			
5-Fluorocitosina (5-FC)	Inhibe síntesis de DNA y RNA	Levaduras: <i>Candida spp.</i> , <i>C. neoformans</i> <i>Aspergillus spp.</i>	

Cuadro 7. Tratamientos de Candidiasis, tomado y modificado de: (Bonifaz, 2015).

7. Métodos de diagnóstico

Las diversas especies de *Candida* crecen en la mayor parte de medios de cultivo habituales, como son: agar Dextrosa Sabouraud (SDA), infusión de cerebro y corazón (BHI), agar soya tripticaseína (AST), *agar Biggy*, Chromagar-*Candida* y extracto de levadura. Es importante saber que *Candida albicans* y *Candida dubliniensis* crecen en los medios de Sabouraud más antibióticos; sin embargo, algunas otras especies son inhibidas por la cicloheximida (*Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* y *Candida zeylanoides*), por lo que se recomienda utilizar a la par medios: agar Sabouraud y agar extracto de levadura sin antibiótico. Las características de las colonias en la mayor parte de medios son similares, crecen en 2 o 3 días en un rango de temperatura entre 28 - 37 °C, dando colonias blanquecinas, lisas (en ocasiones rugosas), húmedas, limitadas, opacas y en algún momento se observan pseudomicelio y micelio dentro del agar (Bonifaz, 2015).

Existen medios de cultivo selectivos para el género *Candida*, como el Biggy (Nickerson), que contiene gran cantidad de citratos que eliminan la flora bacteriana, así como sulfitos que son reducidos a sulfuros; de esta manera las colonias se ven de color café claro u oscuro, lo que las hace distinguibles de otros hongos levaduriformes y se considera un excelente medio de primo-aislamiento, por lo que es muy útil para el trabajo rutinario (Bonifaz, 2015).

En la actualidad ha surgido una serie de medios de cultivo cromogénicos que permiten hacer una identificación desde los primeros aislamientos; por ejemplo, el medio pionero de Chromagar-*Candida*, está hecho a base de sales cromógenicas y enzimas, que permiten el desarrollo de las especies más comunes de *Candida* y otros hongos levaduriformes, mediante la formación de colonias coloridas, perfectamente diferenciadas: *Candida albicans* (verde-claro); *Candida dubliniensis* (verde-oscuro); *Candida tropicalis* (azul-gris); *Candida krusei* (rosa pálido); *Candida glabrata* (rosa intenso a púrpura brillante); *Candida sp.* (blanco-crema) (Arenas, 2014) (Bonifaz, 2015).

8. Importancia de la candidiasis en materia de Salud Pública

En México se han realizado pocos estudios clínico-epidemiológicos, sobre todas las especies de *Candida*, por lo que se desconoce la magnitud del problema para establecer las medidas terapéuticas y preventivas oportunas (Hernandez, 2003).

Cada día es mayor el índice de infecciones causadas por *Candida*, así como el incremento de las Candidas que no están consideradas dentro de la especie *albicans*, incluyendo *Candida glabrata* y *Candida krusei*, las que frecuentemente manifiestan resistencia a los antimicóticos de uso común (Hernandez, 2003).

El SINAVE catalogó entre los años 2015 - 2016 a la candidiasis urogenital como un problema de salud ascendente principalmente en Estado de México (2342 personas), Veracruz (1889 personas) y Puebla (1180 personas) predominando en el sexo femenino (Comité Nacional para la Vigilancia Epidemiológica, 2016). Por lo tanto, es necesario que el personal médico intencionalmente busque focos de infección.

En la medida en que el personal conozca con fundamentos el grado de afección y riesgo de infección de los pacientes, podrá aplicar medidas de prevención y control de las infecciones fúngicas, intra o extra hospitalarias, reduciendo así los índices de morbilidad y mortalidad en los pacientes de alto riesgo (Hernandez, 2003).

9. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son sustancias aromáticas de base terpenoide encontradas prácticamente en todas las plantas; son muy numerosos y están ampliamente distribuidos en las distintas partes de la planta: raíces, tallos, hojas, flores y frutos (Vásquez, Alenguer, & Marreros, 2001). Los aceites esenciales contienen moléculas con propiedades antimicrobianas, en particular los fenoles (tales como carvacrol, timol y eugenol) y aldehídos (tales como cinamaldehído) (Bouhdid, Abrini, Baudoux, Manresa, & Zhiri, 2012).

Los aceites esenciales se pueden obtener por distintos métodos. El más frecuente es la destilación por arrastre de vapor (Tránsito, 2004). Estos aceites esenciales son productos naturales que tienen aplicación en diferentes industrias, como son la farmacéutica, la alimentaria, o en perfumería, entre otros.

Entre las principales propiedades terapéuticas asociadas a los aceites esenciales, cabe destacar la antiséptica y antifúngica.

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas y se clasifican de acuerdo a su:

9.1 COMPOSICIÓN

- Consistencia (Esencias fluídas, bálsamos y oleorresinas)
- Origen (Naturales, Artificiales y Sintéticos)
- Clase química de componentes principales (Monoterpenoides, Sesquiterpenoides, Fenilpropanoides)

(Martinez, 2001)

9.2 DISTRIBUCIÓN Y ESTADO NATURAL

Los aceites esenciales son sustancias naturales contenidas en glándulas microscópicas de las plantas, se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: hojas, raíces, pericarpio del fruto, semillas, tallo, flores y frutos (Cuadro 8). Se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas: Compuestas (eucalipto), Lauráceas (canela), Mirtáceas (clavo), Pináceas (cedro), Rosáceas (membrillo), Rutáceas (limón), Umbelíferas (hinojo) (Camacho, 2003).

Aceite esencial	Parte de la planta utilizada
Ciprés: jara	Ramas
Lavanda, lavandín	Sumidades floridas
Meta, hierba limón, eneldo	Planta entera
Geranio	Hojas
Neroli, rosa	Flor
Limón, naranja, mandarina	Flavedo (capa externa del fruto)
Romero, tomillo, ajedrea, mejorana	Planta entera con flor
Melisa	Planta fresca
Abeto de Siberia	Acículas
Manzanilla	Flor seca
Canela	Corteza
Cedro	Madera
Lima	Fruto entero
Clavo	Botones florales

Cuadro 8. Partes de la planta utilizadas en la obtención de aceite esencial
(Camacho, 2003)

10. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Extracción y aislamiento

“Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con flúidos supercríticos” (Martinez, 2001).

10.1 Expresión

“En la expresión el material vegetal es exprimido para liberar el aceite éste es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencia de cítricos” (Martinez, 2001).

10.2 Destilación por arrastre de vapor de agua

“En la destilación por arrastre con vapor de agua, la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluídas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada” (Martinez, 2001).

10.3 Extracción con solventes volátiles

“En el método de extracción con solventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles” (Martinez, 2001).

10.4 Enflorado o enfleurage

“En el método de enflorado o enfleurage, el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con grasas naturales. La esencia es solubilizada en la grasa natural que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y grasa sólida la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa,

jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa” (Martinez, 2001).

10.5 Extracción con fluidos supercríticos

“El método de extracción con fluidos supercríticos, es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo bióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura. Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones” (Martinez, 2001).

11. Clavo (*Syzygium aromaticum*)



Figura 5. Planta: *Syzygium aromaticum*, tomada de

<http://www.terapiaycursos.com/index.php/clavo>

Definición: El clavo de especia consiste en los botones florales enteros de *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill et L. M. Perry (*Eugenia caryophyllus* (C. Spreng.) Bull. Et Harr.), desecados hasta que adquieren una coloración pardo rojiza. Contiene no menos de 15 - 20 % de aceite esencial (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003).

Nombre científico: *Syzygium aromaticum*.

Origen: El clavo de olor es nativo de las Islas Molucas y de la región sur de las Filipinas, se cultiva en estos sitios y muchas zonas tropicales como: islas de este de África (Zanzibar y Pemba), Madagascar, Malasia, Tanzania, Sri Lanka y algunos países del sur de América (Brasil) (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003).

- **Parte utilizable:** Los botones florales desecados.



Figura 6. Botón floral desecado: *Syzygium aromaticum* tomado de:
<http://candidiasisweb.com/remedios/antifungicos/naturales/clavo-de-olor.php>

- **Composición química:** Contiene abundante aceite esencial (15 - 20 % v/p) más denso que el agua, compuesto fundamentalmente por eugenol (70 – 85 %). Otros componentes son acetato de eugenilo y β -cariofileno. Además contiene flavonoides, C-glucosilcromonas, ácidos fenoles y abundantes taninos (10 - 13 %) entre los que destaca el elagitanino eugeniina. Contiene también pequeñas cantidades de esteroides (Bravo, 2003).

Acción farmacológica: Efectos de tipo antiséptico, analgésico, antibacteriano, antifúngico, etc (Bravo, 2003).

11.1 Componente principal del aceite esencial de clavo: Eugenol

Definición: El aceite esencial de clavo se obtiene por destilación en corriente de vapor de los botones florales desecados de *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill y L. M. Perry (*Eugenia caryophyllus* C. Spring. Bull. Y Harr.) (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003).

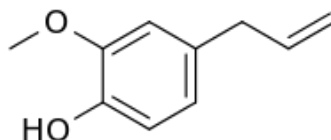


Figura 7. Estructura química de eugenol, tomado de: (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003)

- **Propiedades fisicoquímicas de eugenol:** Líquido incoloro o amarillo claro, por exposición al aire se oscurece y aumenta su viscosidad, miscible con cloruro de metileno, éter, tolueno y aceites grasos.

Punto de ebullición: 254 °C, punto de fusión: -7 °C, acidez: pka: 10.19 a 25 °C, solubilidad: Soluble en 100 % de etanol, éter, aceites, 70 % de alcohol, ácido acético glacial, cloroformo e hidróxido de sodio acuoso. Poco soluble en agua, densidad: 1.07g/mL a 25 °C.

11.2 Propiedades del Clavo

- **Actividad antimicrobiana**

Clavo exhibe actividad antimicrobiana potente contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Los aceites esenciales de clavo de olor y eugenol muestran diferentes grados de inhibición frente a *Aspergillus niger*, *Saccharomyces*

cerevisiae, *Mycoderma sp.*, *Lactobacillus acidophilus* y *Bacillus cereus*, según lo estimado por el método de difusión en agar disco de papel. El aceite también inhibe la *Listeria monocytogenes* en salchichas de pollo. Tiene excelentes propiedades antimicrobianas (Pathasarathy, 2008).

El aceite de clavo y uno de sus componentes mayoritarios (eugenol) poseen actividad antifúngica significativa contra los hongos pertenecientes a especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, comúnmente causando el deterioro de productos de panadería (Pathasarathy, 2008).

- **Actividad antibacteriana**

El aceite esencial de clavo es eficaz contra las bacterias *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Klebsiella*. Los aceites volátiles de clavo mostraron considerables efectos inhibitorios frente a varios géneros de bacterias, incluyendo bacterias de descomposiciones patógenas de plantas, animales y de intoxicación alimentaria (Pathasarathy, 2008).

Pathasarathy recomienda el uso del clavo ya que puede llegar a matar parásitos intestinales. El aceite esencial de clavo es un potente antimicrobiano, antiséptico, hemostático y anti-inflamatorio. El aceite de clavo mostró actividad antimicrobiana frente a algunas bacterias patógenas humanas resistentes a ciertos antibióticos (Pathasarathy, 2008).

- **Actividad antiinflamatoria**

El eugenol es considerado el componente mayoritario del clavo, el cual es un aceite volátil y se considera una sustancia antiinflamatoria. En algunos estudios, se reduce aún más los síntomas inflamatorios en un 15 – 30 % de clavo, también contiene una variedad de flavonoides, incluyendo kaempferol y ramnetina, que también contribuyen a las propiedades anti-inflamatorias y antioxidante de clavo. Otro constituyente de aceite de clavo, β -cariofileno, también contribuye a la actividad anti-inflamatoria (Pathasarathy, 2008).

11.3 Mecanismo de acción de Clavo

El eugenol es un componente importante en el aceite esencial de clavo, y su actividad antimicrobiana permeabiliza la membrana celular e interactúa con las proteínas. La acción de eugenol sobre las membranas se produce principalmente por una permeabilización no específica. El eugenol induce cambios menores en las células en el perfil de ácidos grasos de *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Brochothrix thermosphacta*, *Salmonella entérica* y *Staphylococcus aureus* (Hyldgaard, 2012).

El grupo hidroxilo del eugenol se cree que se unen y afectan a las propiedades de las proteínas, lo que contribuye a un efecto inhibitorio de eugenol a concentraciones sub-letales. El eugenol ha demostrado inhibir la actividad de las siguientes enzimas: ATPasa, histidina descarboxilasa, amilasa, y la proteasa. La inhibición de la ATPasa puede ser importante para la eliminación de células a altas concentraciones de eugenol porque la generación de energía necesaria para la recuperación celular se ve afectada (Hyldgaard, 2012).

El modo de acción antifúngico del eugenol necesita más investigación, pero se sabe que depende de la proliferación celular. El eugenol altera estructuras de la membrana

celular y de la pared celular de la proliferación de células de *Saccharomyces cerevisiae* que ocasiona la liberación del contenido celular (Hyldgaard, 2012).

- **Dosificación de clavo:**

-Modo de administración: Puede administrarse como polvo, triturado o la hierba entera para la obtención del aceite esencial y en otras preparaciones galénicas para uso tópico.

-Dosis diaria: Soluciones acuosas correspondientes a un 1 – 5 % del aceite esencial son utilizada de forma externa (Hall, Rocha, Rodríguez, & CIMED, 2002).

- **Efectos adversos de clavo:**

No se han reportado casos de amenaza de salud o de efectos secundarios cuando es administrado de manera apropiada. Algunos autores señalan que el aceite de clavo de olor no debe emplearse por vía interna, únicamente debe aplicarse de forma tópica, a menos se administre en las cantidades indicadas anteriormente. Las reacciones alérgicas al eugenol ocurren raramente (Hall, Rocha, Rodríguez, & CIMED, 2002).

12. Canela (*Cinnamomun zeylanicum* Blume)



Figura 8. Planta: *Cinnamomun zeylanicum* Blume, tomado de:

<http://www.uniprot.org/taxonomy/128608>

- **Definición:** La canela de Ceilán está constituida por la corteza desecada, privada del súber externo y del parénquima subyacente, de los brotes desarrollados sobre los vástagos cortados de *Cinammomun zeylanicum* Nees. Contiene no menos de 0.5 – 2.5 % de aceite esencial (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003).
- **Nombre científico:** *Cinammomun zeylanicum*
- **Origen:** La planta de la canela es nativa de las regiones de Sri Lanka, sureste de la India, Indonesia, Sudamérica y la India Occidental ((Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003).
- **Parte utilizable:** La corteza interior de las ramas jóvenes (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003).



Figura 9. Corteza interior: *Cinammomun zeylanicum* Blume, tomado de:

<http://www.ihb.co.in/2016/01/cinammom-stick-cinammom-zeylanicum.html>

- **Composición química:**
Según la Real Farmacopea Española del año 2003, la corteza de Ceilán contiene un 0.5 – 2.5 % de aceite esencial (, no menos del 1.2 %); el aceite esencial contiene mayoritariamente cinamaldehído (70 %) y eugenol (10 %), acompañado de otros compuestos fenilpropánicos, aldehídos, algunos terpenos. También contiene almidón, diterpenos policíclicos, y trazas de cumarinas, etc (Bravo, 2003).

12.1 Componente principal del aceite esencial de canela: Cinamaldehído

Definición: El cinamaldehído es un compuesto orgánico responsable del sabor y del olor característico de la canela. Se trata de un líquido amarillo pálido y viscoso que se presenta de forma natural en la corteza del árbol de la canela y otras especies del género *Cinnamomum*. El aceite esencial de la canela se compone en un 90% de cinamaldehído (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003).

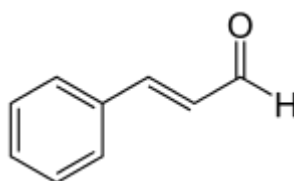


Figura 10. Estructura química de Cinamaldehído, tomado de (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2003)

- **Propiedades fisicoquímicas de cinamaldehído:** Líquido móvil, límpido, de color amarillo claro que se transforma en rojizo por envejecimiento.

Punto de ebullición: 251 °C, punto de fusión: -8 °C, punto de inflamación: 138 °C, densidad (20/4): 1.05, solubilidad: 1.5 g/L en agua a 20 °C, densidad: 1.05 g/cm³.

12.2 Propiedades de la canela

○ Actividad antibacteriana

El efecto antimicrobiano de la canela es un área de actividad que ha sido ampliamente investigada, los informes están disponibles a partir de 1944. Estos estudios incluyen efectos antibacterianos y antifúngicos (Ravindran, 2004).

Un extracto etanólico del 40 % de la corteza tenía un buen efecto inhibitor del crecimiento en *Enterobacter aerogenes*, una bacteria que causa infecciones del tracto urinario. Wendakoon y Sakagudi (1995) atribuyeron el efecto antibacteriano al cinamaldehído y al eugenol (Ravindran, 2004).

Quale et al. (1996) estudiaron el efecto de la canela y de sus componentes contra especies de *Candida* y extendieron un estudio clínico para pacientes con candidiasis. Estudiaron la actividad contra especies de *Candida* resistentes a fluconazol aisladas de pacientes infectados por VIH *in vitro* y se encontró que el extracto de canela inhibió completamente el crecimiento a una CIM valuado de 0.5 - 30 mg/mL, trans-cinamaldehído y o-metoxi-cinamaldehido también mostraron actividad en un valor CIM de 0.03 a 0.5 mg/mL. Un estudio piloto en cinco pacientes con candidiasis oral se realiza mediante la preparación de canela disponible en el mercado. Los pacientes fueron tratados con la formulación durante una semana y en los cuales se mostró una mejora. Sin embargo, para establecer el uso terapéutico de canela o sus constituyentes, debe llevarse a cabo un ensayo clínico (Ravindran, 2004).

Se ha encontrado que las bacterias gram positivas son más sensible que las gram negativas (Ravindran, 2004).

Chao et al. (2000) observaron que el aceite de canela era inhibitorio contra cuatro bacterias gram positivas (*Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) y contra cuatro bacterias gram negativas (*Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*). Los resultados mostraron que el aceite de canela tenía un amplio espectro de actividad así como un alto grado de inhibición hacia *Candida albicans*. Los resultados de las investigaciones anteriores muestran el alto potencial de canela como un agente

antibacteriano. Cabe señalar específicamente que la canela beneficia la flora intestinal por lo que aumenta el potencial de desarrollo como un agente terapéutico contra muchas de las bacterias patógenas (Ravindran, 2004).

- **Actividades antimicrobianas**

El aceite de canela posee diversas actividades contra bacterias y hongos. El t-cinamaldehído y o-metoxi-cinamaldehído si se administra oralmente inhibe la candidiasis a una concentración de 0.03 – 0.05 mg/mL (Pathasarathy, 2008).

El cinamaldehído es un agente antifúngico efectivo contra *Alternaria alternata*. El cinamaldehído, alcohol cinámico y eugenol poseen efectos antibacterianos, astringentes y estomacales (Pathasarathy, 2008).

- **Actividad antifúngica**

La aceite esencial de canela es una sustancia antifúngica potente. Es fungistático o fungicida contra muchas especies de hongos patógenos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Candida spp.*) (Ravindran, 2004).

12.3 Mecanismo de acción de Canela

Los grupos aldehído del cinamaldehído son reactivos y tienen la capacidad para reticular covalentemente con el ADN y proteínas a través de grupos amina, lo que interfiere con su función normal. Sin embargo, el modo de acción del cinamaldehído, no está definido. Por lo menos, tres cosas se cree que se producen: 1) a bajas concentraciones, el cinamaldehído inhibe diversas enzimas que participan en las funciones celulares de menor importancia o citocinesis. 2) En concentraciones más altas, pero sub-letales, actúa como un inhibidor de la ATPasa, y 3) a concentraciones

letales perturba la membrana celular. Se ha establecido que el cinamaldehído une a la proteína FtsZ, la inhibición de su polimerización dependiente del GTP evitando así la división celular. Otras enzimas, por ejemplo, la histidina descarboxilasa, es también inhibida por cinamaldehído (Hyldgaard, 2012).

A concentraciones sub-letales, el uso de cinamaldehído permiten el acceso al espacio periplasmático e inhibe la actividad de la ATPasa transmembranal, a estas concentraciones el cinamaldehído no afecta la integridad de la membrana externa de *Escherichia coli*, pero inhibe el crecimiento y la bioluminiscencia de *Photobacterium leiognathi*, lo que indica que permite el acceso del cinamaldehído al espacio periplasmático y posiblemente también al citoplasma. (Hyldgaard, 2012).

Entre los hongos, también se ha propuesto que el principal modo de acción de cinamaldehído es la inhibición de la división celular. Esto fue propuesto debido a que el cinamaldehído inhibió la síntesis de la pared celular de las enzimas en *Saccharomyces cerevisiae* por funcionar como un inhibidor no competitivo de β -(1,3) glucano sintasa y un inhibidor mixto de isoenzimas de quitina sintasa (Hyldgaard, 2012).

- **Acción farmacológica de cinamaldehído:**

El cinamaldehído presente en el aceite esencial es antibacterial, fungistático, antiséptico, entre otras. Su uso tópico se recomienda en dermatomicosis y vulvovaginitis. A nivel externo es ligeramente astringente y rubefaciente, de allí su uso para la curación de heridas (Hall, Rocha, Rodríguez, & CIMED, 2002).

- **Dosificación de canela:**

0.05-0.2 g del aceite esencial.

- **Efectos adversos de canela:**

El aceite esencial de canela provoca dermatitis de contacto. Lo anterior se le atribuye a la presencia del cinamaldehído (Hall, 2002).

13. MÉTODOS PARA EVALUAR LA CAPACIDAD ANTIBACTERIAL DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los métodos actualmente utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales son:

13.1 Técnica de difusión en agar

El método consiste en aplicar una cantidad determinada del extracto en estudio, en un disco de papel que se coloca sobre la superficie de la placa donde se ha distribuido el inóculo con el microorganismo sobre el que se quiere ver el poder antimicrobiano. Por gradiente de concentración, el extracto difunde alrededor del disco (Castañón, 2012).

La sensibilidad del microorganismo al extracto se relaciona con el tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano. Según el diámetro del halo de inhibición, los microorganismos se clasifican en:

- **(R)** Nula diámetro ≤ 8 mm.
- **(I +)** Sensibilidad límite (sensible = +) diámetro entre 8-14 mm.
- **(I ++)** Medio (muy sensible =++) diámetro entre 14 y 20 mm.
- **(S +++)** Sumamente sensible (+++) diámetro ≥ 20 mm.

13.2 Método de dilución en agar

El extracto se incorpora al medio con agar cuando aún está líquido. Para lograr el rango de dilución deseado se preparan una serie de placas con diferentes concentraciones del extracto. El resultado se expresa como; CIM el cual se define como la menor concentración del extracto que produce el 90 % de reducción en el crecimiento de las colonias. Si se usan medios líquidos, el procedimiento es el mismo, solo que se usan tubos de ensayo para las diferentes diluciones. Ambos métodos permiten obtener datos cuantitativos (Castañón, 2012).

14. JUSTIFICACIÓN

La candidiasis es la infección más frecuente en pacientes hospitalizados por ser un patógeno oportunista, su diseminación y mal tratamiento ha provocado que desarrolle resistencia a antimicóticos como Fluconazol, situación que ha impulsado la búsqueda de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas.

Los tratamientos antimicóticos son costosos por su larga duración y pueden llegar a ser tóxicos por ello se propone el uso de aceites esenciales de clavo y canela con la finalidad de utilizarlos para tratamientos de oncomicosis debido a sus propiedades medicinales, ya que se ha reportado dentro de su acción farmacológica actividad antifúngica, antiséptica y antiinflamatoria. Los tratamientos alternos de este tipo se usan debido a su bajo costo, y porque producen menos efectos adversos.

15. HIPÓTESIS

De las 9 especies de *Candida* puestas a prueba con aceites esenciales de clavo y canela se espera que más de una especie sea inhibida por los componentes que contienen el clavo y la canela, dichas inhibiciones presentaran una mayor sensibilidad a los aceites esenciales empleados en comparación con los antimicóticos comerciales comunes.

16. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto inhibitorio de aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry) y canela (*Cinnamomun zeylanicum* Blume) sobre nueve especies del género *Candida* mediante una prueba cualitativa, respecto al método de Kirby-Bauer (difusión en disco), comparando su efectividad con Anfotericina B y Fluconazol.

16.1 OBJETIVOS PARTICULARES

-
- Identificación taxonómica de las especias: clavo y canela por Herbario FES IZTACALA.
- Extraer los aceites esenciales utilizando el método de destilación por *arrastre de vapor*.
- Determinar cualitativamente los componentes principales de los aceites esenciales a través de espectroscopia IR en el laboratorio de Química Medicinal y Teórica en Unidad de Posgrado FESC.
- *Realizar pruebas de identificación en CHROMagar-Candida® Becton Dickinson y agar Biggy® BIOXON a las cepas de Candida* proporcionadas por el laboratorio 10 en Unidad de Posgrado FESC.
- Evaluar la resistencia o sensibilidad de las nueve especies de *Candida* a los aceites esenciales a través de una prueba cualitativa por el método difusión en disco.
- Comparar el efecto inhibitorio de los aceites esenciales al ser enfrentados con las nueve especies de *Candida*, contra antimicóticos comerciales (sensidiscos de los laboratorios HIMEDIA: Anfotericina B y Fluconazol).

17. MÉTODOS

Tamaño de la muestra

Se trabajó con 9 cepas del género *Candida* (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida stellatoidea*, *Candida parapsilosis*, *Candida lusitaniae* y *Candida glabrata*) proporcionadas en el laboratorio 10 en Unidad de Posgrado-FESC, previamente identificadas con agar SDA ® MCD - LAB, Chromagar-*Candida* ®BD y Agar Biggy ® BIOXON. No se utilizaron cepas ATCC como referencia.

Adquisición e identificación de la canela y el clavo

Las muestras fueron adquiridas en Casco La Providencia (Central de Abastos Tultitlán Mariano Escobedo) y fueron identificadas taxonómicamente por el Herbario IZTACALA, pudiendo así encontrarlas en la colección Etnobotánica del Herbario Iztacala con el número de registro **2480 IZTA** para *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela) y para *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L. M. Perry (Clavo) con el número de registro **2481 IZTA** (Ver Anexo 1).

❖ Extracción e identificación de los aceites esenciales

1) Método utilizado: Destilación por arrastre de vapor de agua

a) Agregar 100 g. de muestra (Canela) previamente molida al matraz de bola y posteriormente humedecerla con agua destilada, conectarla a un matraz erlenmeyer con agua destilada a través de un puente de vidrio y una cabeza de destilación, sellar las boquillas con un corcho de goma y poner sobre la parrilla eléctrica, posteriormente conectar la cabeza de destilación al refrigerante con

mangueras (sostenido de un soporte universal) y por último la alargadera para recolectar la muestra en un matraz colector. Para comenzar la destilación, meter las mangueras al recipiente (contenido de agua corriente) con la bomba de agua, conectar la bomba a la corriente eléctrica así como la parrilla eléctrica y comenzar la destilación. Destilar durante 5 horas y repetir el arrastre con 600 g. más de muestra (Canela). Después de coleccionar la muestra, colocarla en un embudo de separación (dejarla reposar para separar las dos fases) eliminar la fase acuosa (agua) y hacer tres separaciones con el disolvente acetato de etilo, posteriormente con ayuda de un recuperador de solvente extrae el disolvente y resguardar el aceite esencial en un frasco ámbar.

Nota: Realizar el mismo procedimiento para obtener el aceite esencial de Clavo.

b) Realizar una identificación de los componentes de cada aceite esencial a través de un análisis cualitativo con espectroscopia infrarroja (Espectrómetro FT-IR NicoleTM iSTM 10 [Ver Anexo 5]) en el laboratorio de Química Medicinal y Teórica en Unidad de Posgrado FESC, tomar con un capilar 10 μ L de aceite esencial y agregarlo en un porta muestras, colocarlo sobre el detector y analizarlo con el programa OMNIC.

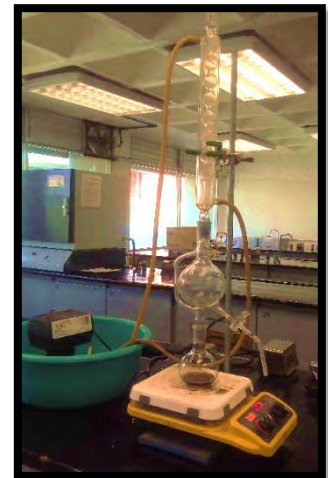
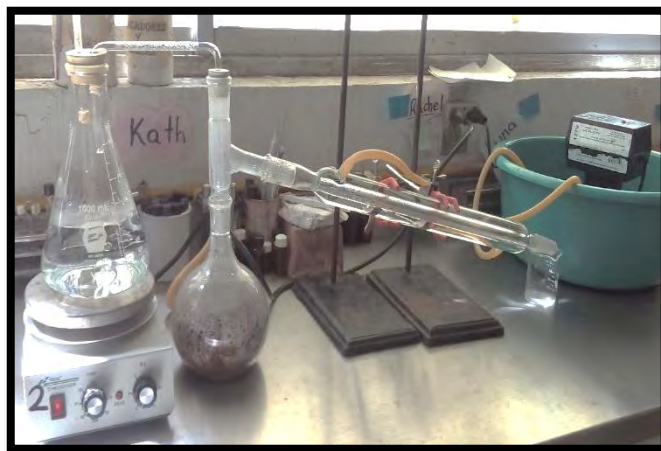


Figura 11. Montaje del equipo:

Destilación por arrastre de vapor de agua (izquierda), Recuperador de solvente (derecha) tomado en el laboratorio de laboratorio 10 de Microbiología en la Unidad de Posgrado FES Campo 1.

❖ **Identificación de Cepas: Medio de aislamiento**

a) Agar SDA ® MCD – LAB

Tomar un inóculo directo de las 9 cepas de *Candida* y sembrarlas en una caja de agar SDA ® MCD – LAB (con la finalidad de mantenerlas viables durante la experimentación), posteriormente incubar a 37 °C durante 48 horas y observar la morfología de las cepas.

❖ **Medios cromogénicos**

a) Chromagar *Candida* ® BD

Igualar las 9 cepas de *Candida* al Nefelómetro de Macfarland con ayuda de un hisopo estéril, tomar un inóculo con un asa bacteriológica estéril y sembrarlas en Chromagar *Candida* ® BD, posteriormente incubar a 37 °C durante 48 horas y observar las cepas coloridas para clasificar las especies de *Candida* de acuerdo al Anexo 8.

b) Agar Biggy ® BIOXON

Igualar las 9 cepas de *Candida* al Nefelómetro de Macfarland con ayuda de un hisopo estéril, tomar un inóculo con un asa bacteriológica estéril y sembrarlas por la técnica de dilución americana en agar Biggy ® BIOXON, posteriormente incubar a 37 °C durante 48 horas y observar la morfología de las cepas y su color amarronado para clasificar las especies de *Candida* de acuerdo al Anexo 8.

❖ **Controles negativos de aceite esencial**

a) Control microbiológico para los aceites esenciales: Agar AST® BIOXON

Tomar con un hisopo estéril una muestra de cada aceite esencial y sembrarlo masivamente en agar AST® BIOXON, y posteriormente incubar a 37 °C durante 48 horas y observar si existe algún crecimiento (Ver Anexo 7).

b) Exposición al acetato de etilo

Ajustar *Candida albicans* a 0.5 Nefelómetro de Macfarland y sembrar masivamente una caja de Mueller - Hinton + glucosa al 2 %, dejar reposar 5 min, y posteriormente agregar un sensidisco impregnado con 20 µL de acetato de etilo y colocarlo en el centro de la caja e incubar a 37 °C durante 48 horas, observar si existe algún crecimiento.

❖ **Pruebas de sensibilidad**

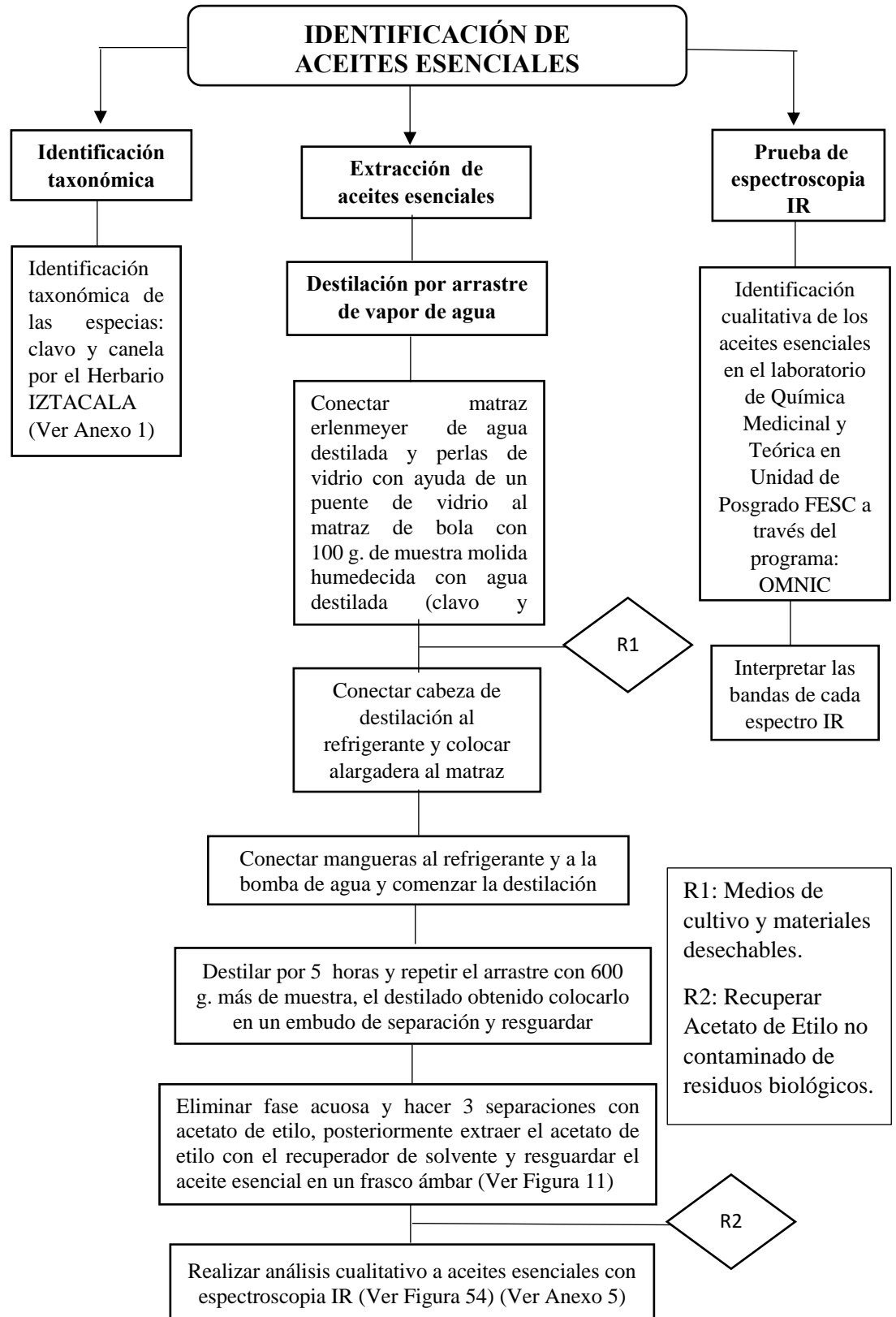
a) Antimicóticos de referencia: Anfotericina B y Fluconazol

Ajustar las 9 especies de *Candida* a 0.5 Nefelómetro de Macfarland y sembrar masivamente una caja de Mueller - Hinton + glucosa al 2 %, dejar reposar 5 min, y posteriormente agregar en cada caja un sensidisco con antimicótico comercial, incubar a 37 °C durante 48 horas y medir los halos de inhibición (Ver Anexo 13).

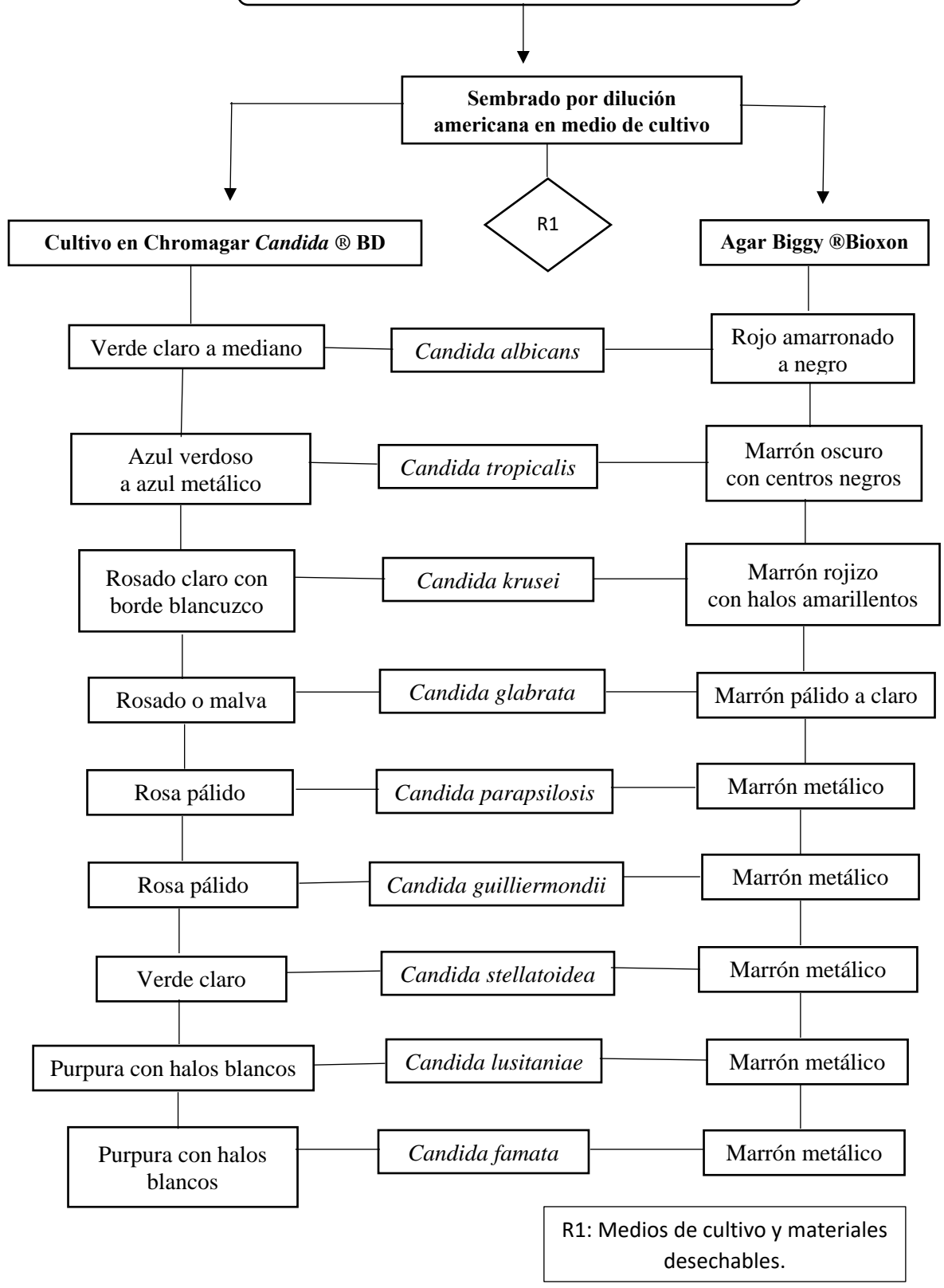
b) Método Kirby-Bauer para aceites esenciales

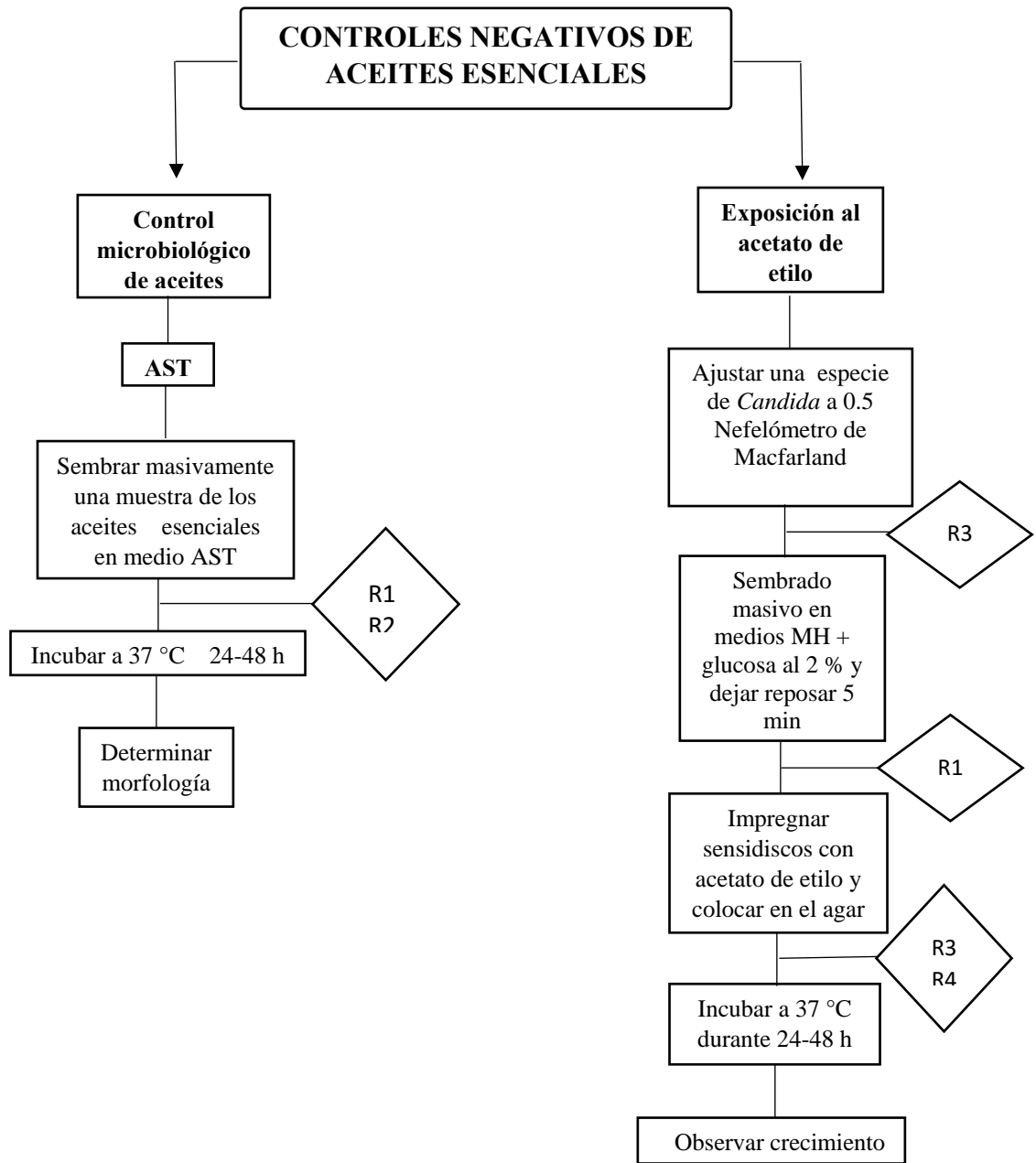
Ajustar las 9 especies de *Candida* a 0.5 Nefelómetro de Macfarland y sembrar masivamente una caja de Mueller - Hinton + glucosa al 2 %, dejar reposar 5 min, y posteriormente impregnar cada sensidisco con 20 µL del respectivo aceite esencial, colocarlo en el centro de la caja e incubar a 37 °C durante 48 horas y medir los halos de inhibición.

18. DISEÑO EXPERIMENTAL



PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE CEPAS



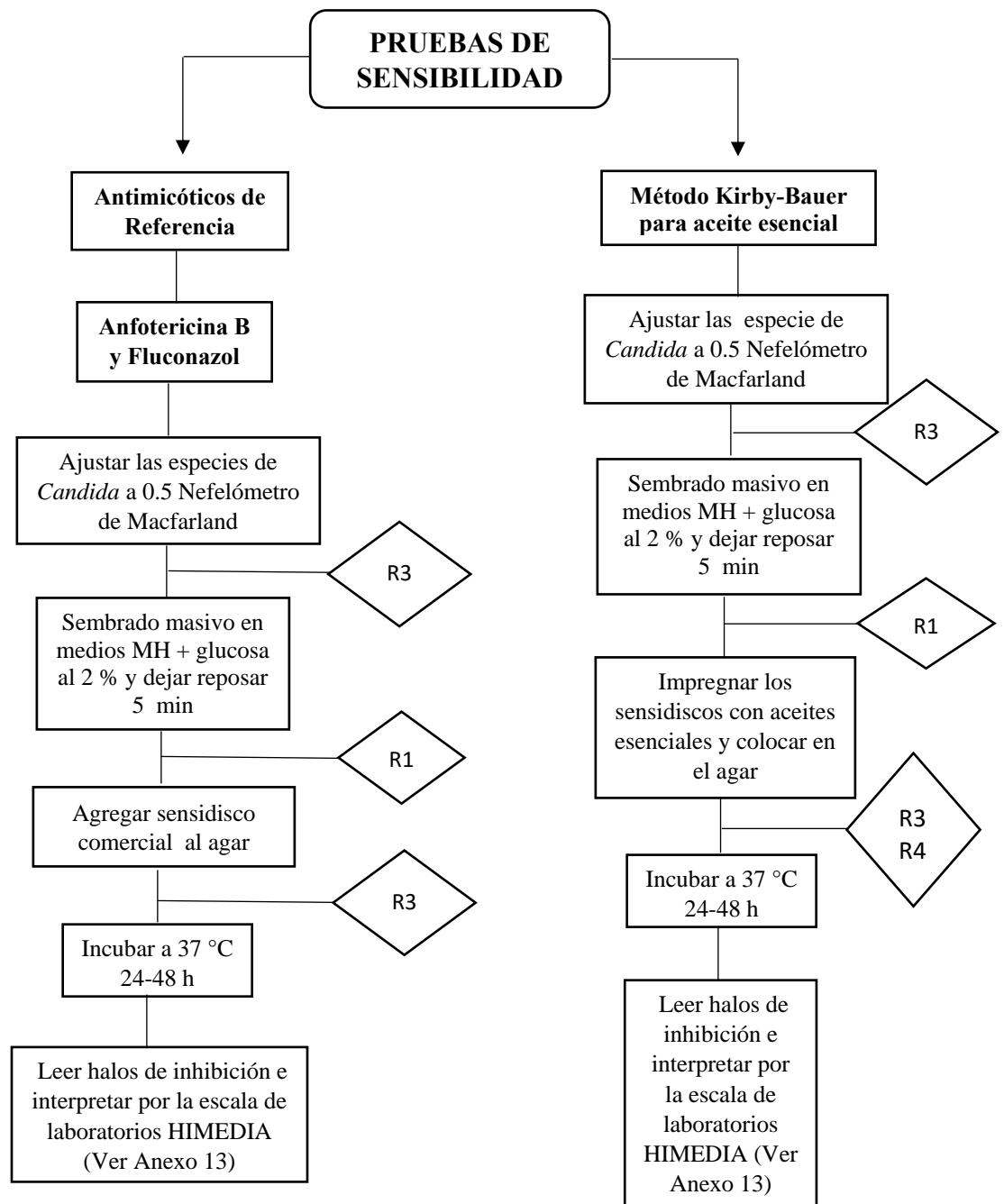


R1: Medios de cultivo y materiales desechables.

R2: Recuperar Acetato de Etilo no contaminado de residuos biológicos.

R3: Material de laboratorio contaminado con muestra biológica (Puntas, hisopos, tubos de ensaye, sensidiscos).

R4: Material desechable no contaminado de residuos biológicos (guantes y servitoallas).



R1: Medios de cultivo y materiales desechables.
 R3: Material de laboratorio contaminado con muestra biológica (Puntas, hisopos, tubos de ensaye, sensidiscos).
 R4: Material desechable no contaminado de residuos biológicos (guantes y servitoallas).

19. MATERIAL

Destilación por arrastre de vapor de agua

Parrilla eléctrica
Matraz erlenmeyer de 1000 mL
Perlas de ebullición
Puente de vidrio
Corcho de goma
Matraz de bola de 1000 mL
Cabeza de destilación
Refrigerante con mangueras
Soporte universal con pinzas y nuez
Alargadera
Matraz colector
Bomba de agua
Embudo de separación
Vaso de precipitado 100 mL
Frasco ámbar
Recuperador de solvente
Solvente: Acetato de Etilo

Medios de cultivo

Agar Dextrosa Sabouraud ® MCD - LAB
Chromagar *Candida* ® Becton, Dickinson
Agar Biggy ® BIOXON
Agar Soya Trypticaseína ® BIOXON
Agar Mueller – Hinton ® DIBICO
D (+) – Glucosa (Monohidratada) ® MERCK

Prueba de Espectroscopia IR

Equipo Thermo SCIENTIFIC
Capilar

Antimicóticos comerciales

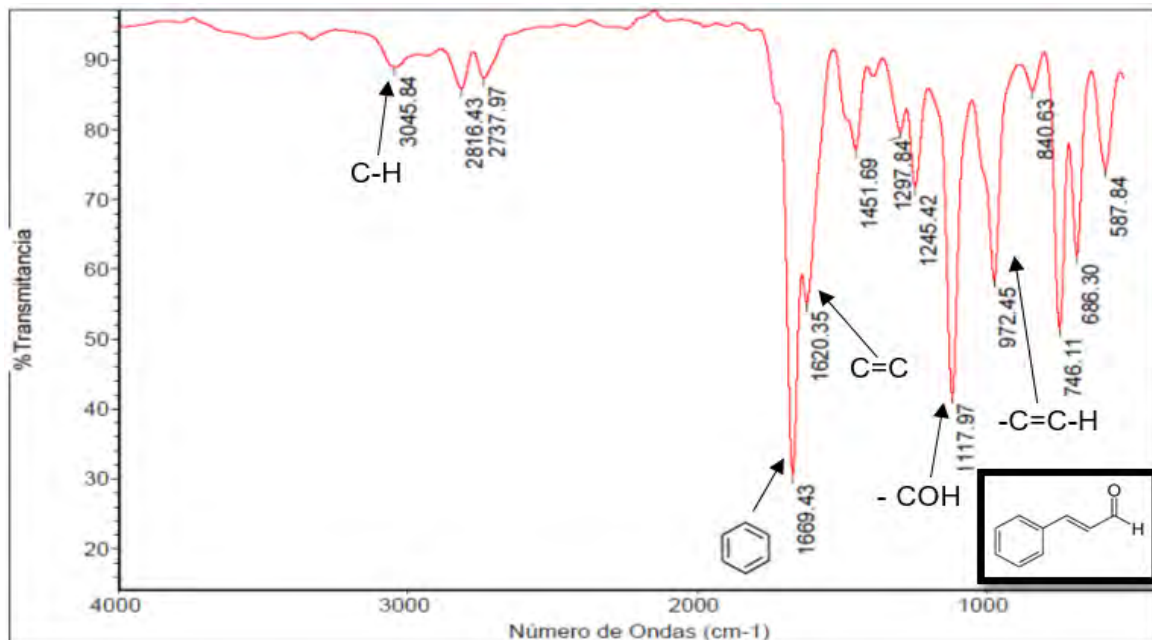
Amfotericina B ® HIMEDIA (100 unidades/disco)
Fluconazol ® HIMEDIA (25 mcg / disco)

Material y equipo de laboratorio

Porta muestras
Mechero de Bunsen
Asa bacteriológica
Hisopo estéril
Suspensión al 0.5 Nefelómetro de Macfarland
Sensidisco estéril
Incubadora
Autoclave
Cajas Petri estériles
Balanza granataria
Probeta graduada de 1000 mL
Puntas para micropipeta de 100 µL
Micropipeta de 100 µL

20. RESULTADOS

Los espectros IR se obtuvieron en una región de 400 a 4000 cm^{-1} con el aceite esencial sobre un divisor de haz de KBr, el complejo sólido y el detector DTGS KBr (Ver Anexo 11).



Vie Mar 18 12:12:42 2016 (GMT-06:00)

BUSCAR PICOS:

Espectros: CANELA C
 Región: 4000.00 400.00
 Umbral absoluto: 96.947
 Sensibilidad: 50

Lista de picos:

Posición:	Intensidad:	Intensidad:
587.84	74.462	74.462
686.30	61.896	61.896
746.11	51.348	51.348
840.63	85.625	85.625
972.45	58.491	58.491
1117.97	41.750	41.750
1245.42	71.811	71.811
1297.84	79.624	79.624
1451.69	77.163	77.163
1620.35	55.155	55.155
1669.43	30.423	30.423
2737.97	87.424	87.424
2816.43	85.887	85.887
3045.84	89.000	89.000

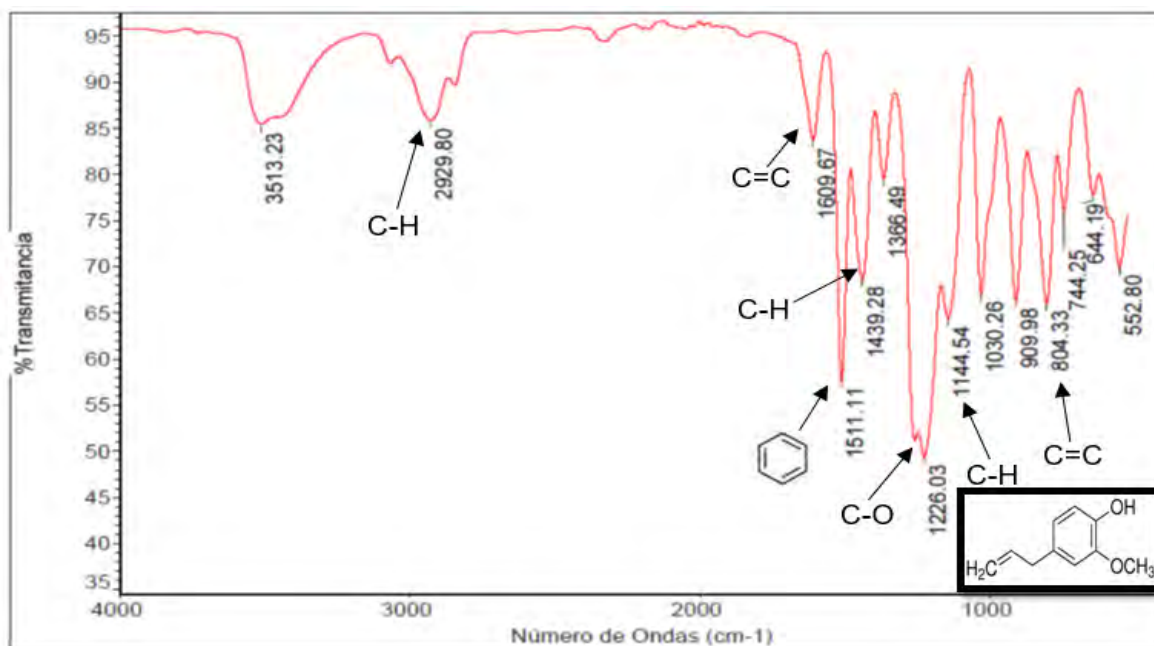
Tiempo de recogida: Vie Mar 18 12:12:13 201

Número de barridos de la muestra: 140
 Número de barridos del fondo: 140
 Resolución: 32.000
 Ganancia de la muestra: 8.0
 Velocidad del espejo: 0.6329
 Apertura: 80.00

Detector: DTGS KBr
 Divisor de haz: KBr
 Fuente: IR

Figura 12. Espectroscopia Infrarroja de Canela (Cinamaldehído)

Estas señales indican que existen los enlaces entre grupos funcionales que existen en la molécula de Cinamaldehído, lo cual demuestra su presencia en el aceite esencial de Canela y coincide con el espectro de referencia tomado de la base de datos (AIST, 2016).



Jue Mar 03 16:37:00 2016 (GMT-06:00)

Tiempo de recogida: Jue Mar 03 16:36:35 201

BUSCAR PICOS:

Espectros: CLAVO
 Región: 4000.00 400.00
 Umbral absoluto: 96.660
 Sensibilidad: 50

Número de barridos de la muestra: 140
 Número de barridos del fondo: 140
 Resolución: 32.000
 Ganancia de la muestra: 8.0
 Velocidad del espejo: 0.6329
 Apertura: 80.00

Lista de picos:

Posición:	Intensidad:
552.80	69.959
644.19	77.772
744.25	76.010
804.33	66.027
909.98	66.274
1030.26	66.952
1144.54	64.392
1226.03	49.319
1366.49	79.571
1439.28	68.719
1511.11	57.462
1609.67	83.782
2929.80	85.876
3513.23	85.461

Detector: DTGS KBr
 Divisor de haz: KBr
 Fuente: IR

Figura 13. Espectroscopia Infrarroja de Clavo (Eugenol)

Estas señales indican que existen los enlaces entre grupos funcionales que existen en la molécula de Eugenol, lo cual demuestra su presencia en el aceite esencial de Clavo y coincide con el espectro de referencia tomado de (Delgadillo, 2016).

En la tabla 1 se muestra el espectro de colores y morfología colonial de las 9 cepas (Chromagar *Candida*® BD y Agar Biggy® BIOXON) (Ver Anexo 8)

Número de caja	Género / Especie	Morfología en CHROMagar <i>Candida</i> ® BD	• Morfología en Agar Biggy® BIOXON
1	<i>Candida famata</i>	Purpura-borde blanco, lisas, cremosas	Marrón-metálico, convexas, cremosas
2	<i>Candida lusitanae</i>	Purpura-borde blanco, lisas, cremosas	Marrón-metálico, planoconvexas, cremosas
3	<i>Candida krusei</i>	Rosa-claro- borde blanco, lisas, opacas	Marrón-metálico, planoconvexas, cremosas
4	<i>Candida tropicalis</i>	Gris-azulado-halo color purpura, lisas, cremosas	Marrón-metálico, planoconvexas, cremosas
5	<i>Candida glabrata</i>	Rosa-intenso, lisas, cremosas	Beage-mate, planoconvexa, cremosa
6	<i>Candida guilliermondii</i>	Rosa-claro, lisas, cremosas	Marrón-metálico, convexa, cremosas
7	<i>Candida albicans</i>	Verde-mediano, lisas, cremosas	Marrón-metálico, convexas, cremosas
8	<i>Candida stellatoidea</i>	Verde-claro, lisas, cremosas	Marrón-metálico, convexas, cremosas
9	<i>Candida parapsilosis</i>	Rosa-claro, lisas, cremosas	Marrón-metálico, convexas, cremosas

Cuadro 9. Especies de *Candida* en Chromagar *Candida*® BD y agar Biggy® BIOXON.



Figura 14. *Candida famata* sensible a AE de Clavo.

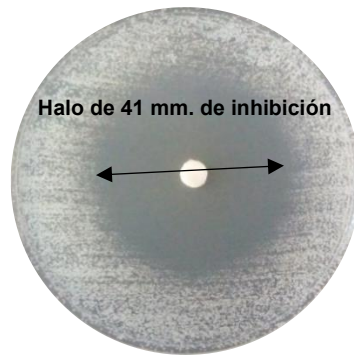


Figura 15. *Candida lusitanae* sensible a AE de Clavo.



Figura 16. *Candida krusei* sensible a AE de Clavo.

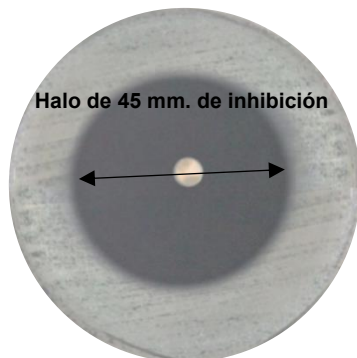


Figura 17. *Candida tropicalis* sensible a AE de Clavo.

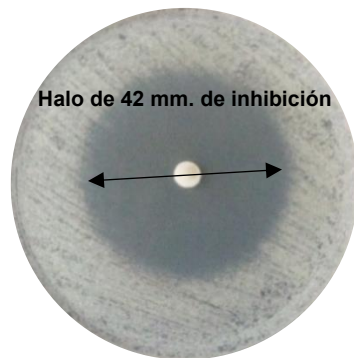


Figura 18. *Candida glabrata* sensible a AE de Clavo.



Figura 19. *Candida guilliermondii* sensible a AE de Clavo.

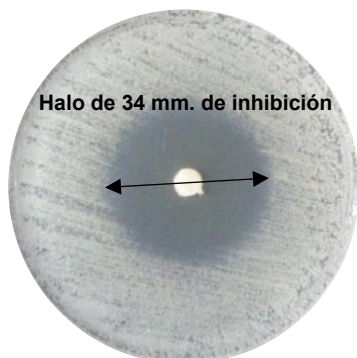


Figura 20. *Candida albicans* sensible a AE de Clavo.

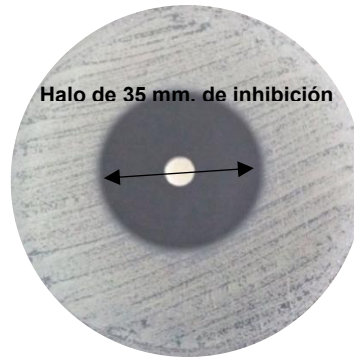


Figura 21. *Candida stellatoidea* sensible a AE de Clavo.

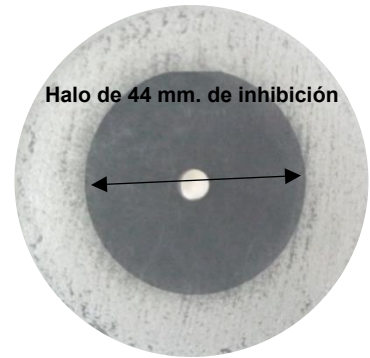


Figura 22. *Candida parapsilosis* sensible a AE de Clavo.

Figuras de Aceite esencial de Clavo de las 9 especies de *Candida* en agar MH + glucosa al 2 %, se observó un mayor halo de inhibición en *Candida tropicalis* (45 mm. de diámetro) y el menor halo de inhibición en *Candida krusei* (27 mm. de diámetro). Figuras tomadas en el laboratorio 10 de Microbiología en la Unidad de Posgrado FES Campo 1.

Número de caja	Género / Especie	Diámetro de los halos de inhibición				Escala Duraffourd (mm)
		1 (mm)	2 (mm)	3 (mm)	Promedio (mm)	
1	<i>Candida famata</i>	45	43	43	44	S +++
2	<i>Candida lusitaniae</i>	41	42	41	41	S +++
3	<i>Candida krusei</i>	29	29	23	27	S +++
4	<i>Candida tropicalis</i>	45	45	45	45	S +++
5	<i>Candida glabrata</i>	44	40	41	42	S +++
6	<i>Candida guilliermondii</i>	32	33	36	34	S +++
7	<i>Candida albicans</i>	35	35	31	34	S +++
8	<i>Candida stellatoidea</i>	35	35	35	35	S +++
9	<i>Candida parapsilosis</i>	42	50	40	44	S +++

Cuadro 10. Promedio de Aceite Esencial de Clavo (*Syzygium Aromaticum*).

Escala Duraffourd:

- (-) Nula diámetro ≤ 8 mm.
- (I +) Sensibilidad límite (sensible = +) diámetro entre 8-14 mm.
- (I ++) Medio (muy sensible =++) diámetro entre 14 y 20 mm.
- (S +++) Sumamente sensible (+++) diámetro ≥ 20 mm.

Se observó que las 9 especies de *Candida* resultaron sumamente sensibles (S+++), destacando entre ellas *Candida tropicalis*.

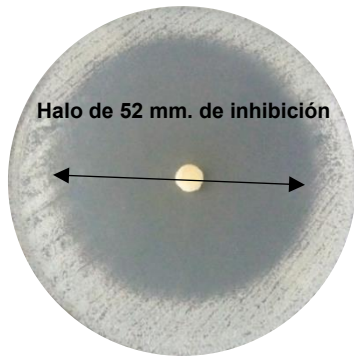


Figura 23. *Candida famata* sensible a AE de Canela.

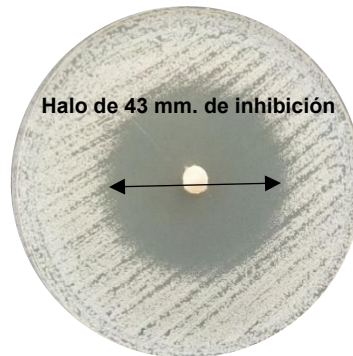


Figura 24. *Candida lusitanae* sensible a AE de Canela.

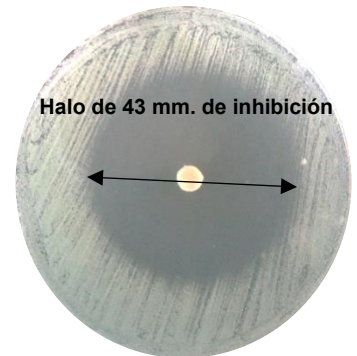


Figura 25. *Candida krusei* sensible a AE de Canela.

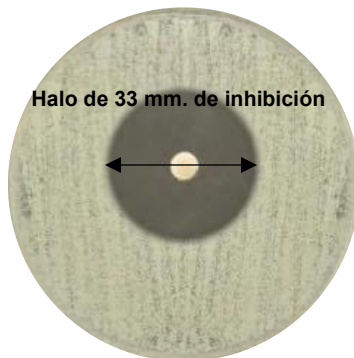


Figura 26. *Candida tropicalis* sensible a AE de Canela.

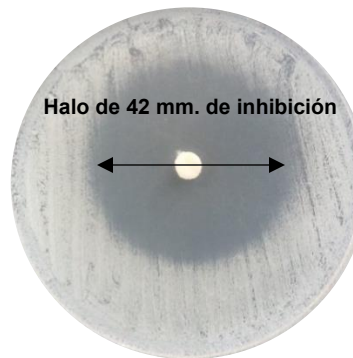


Figura 27. *Candida glabrata* sensible a AE de Canela.

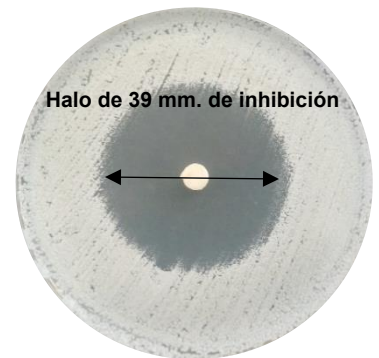


Figura 28. *Candida guilliermondii* sensible a AE de Canela.

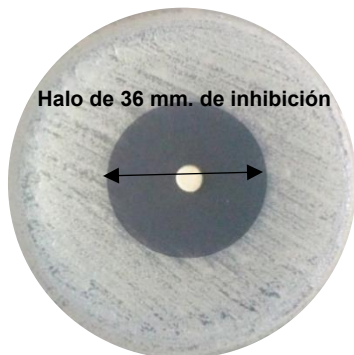


Figura 29. *Candida albicans* sensible a AE de Canela.

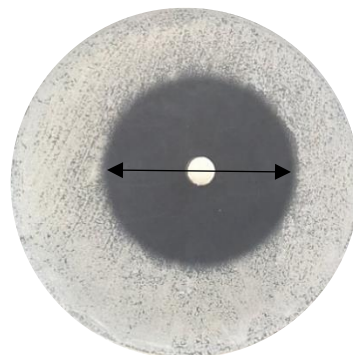


Figura 30. *Candida stellatoidea* sensible a AE de Canela.

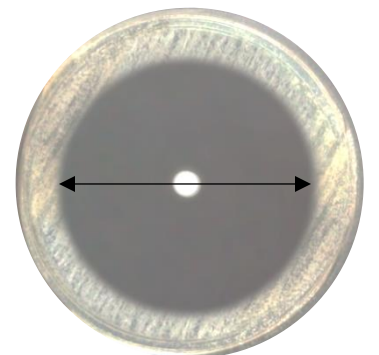


Figura 31. *Candida parapsilosis* sensible a AE de Canela.

Figuras de Aceite esencial de Canela de las 9 especies de *Candida* en agar MH + glucosa al 2 %, se observó un mayor halo de inhibición en *Candida famata* (52 mm. de diámetro) y el menor halo de inhibición en *Candida tropicalis* (33 mm. de diámetro). Figuras tomadas en el laboratorio 10 de Microbiología en la Unidad de Posgrado FES Campo 1.

Número de caja	Género/ Especie	Diámetro de los halos de inhibición				Escala Duraffourd (mm)
		1 (mm)	2 (mm)	3 (mm)	Promedio (mm)	
1	<i>Candida famata</i>	55	49	52	52	S +++
2	<i>Candida lusitanae</i>	46	40	43	43	S +++
3	<i>Candida krusei</i>	46	46	38	43	S +++
4	<i>Candida tropicalis</i>	35	33	32	33	S +++
5	<i>Candida glabrata</i>	45	40	42	42	S +++
6	<i>Candida guilliermondii</i>	37	45	36	39	S +++
7	<i>Candida albicans</i>	36	36	35	36	S +++
8	<i>Candida stellatoidea</i>	38	43	42	41	S +++
9	<i>Candida parapsilosis</i>	45	40	39	41	S +++

Cuadro 11. Promedio de Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomun zeylanicum* Blume).

Escala Duraffourd:

- **(R)** Nula diámetro ≤ 8 mm.
- **(I +)** Sensibilidad límite (sensible = +) diámetro entre 8-14 mm.
- **(I ++)** Medio (muy sensible =++) diámetro entre 14 y 20 mm.
- **(S +++)** Sumamente sensible (+++) diámetro ≥ 20 mm.

Se observó que las 9 especies de *Candida* resultaron sumamente sensibles (S+++), destacando entre ellas *Candida famata*.

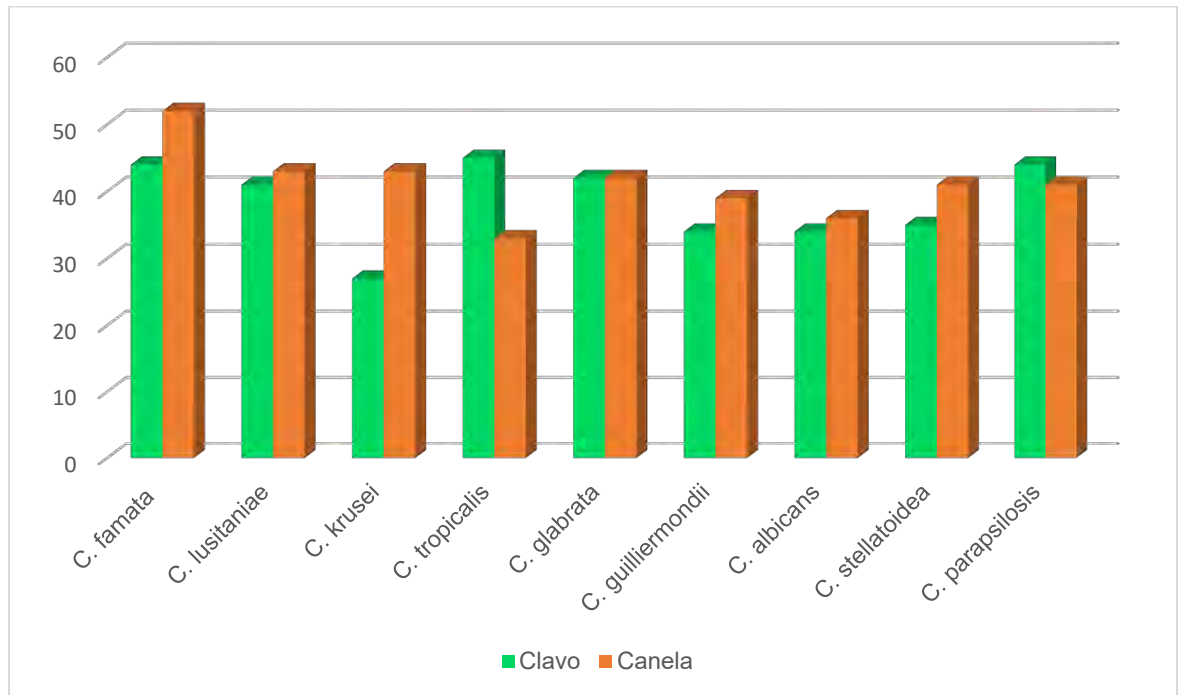


Figura 32. Comparación de la efectividad de las especies del género *Candida* respecto a cada aceite esencial, se observa que los dos aceites esenciales tienen un efecto inhibitorio positivo destacándose *Candida famata* en aceite esencial de Canela y *Candida tropicalis* en aceite esencial de Clavo.

- Resultados experimentales de antimicóticos comerciales

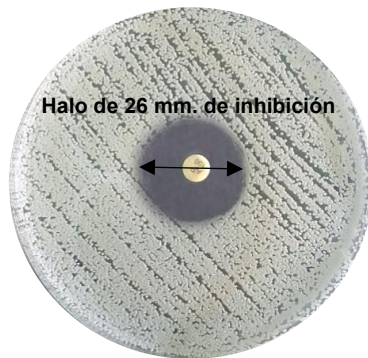


Figura 33. *Candida famata* sensible a Anfotericina B.

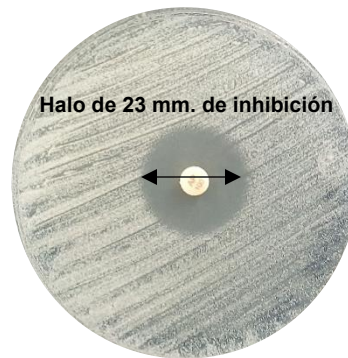


Figura 34. *Candida lusitanae* sensible a Anfotericina B.



Figura 35. *Candida krusei* sensible a Anfotericina B.

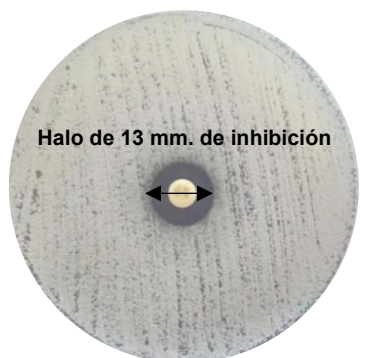


Figura 36. *Candida tropicalis* sensibilidad intermedia a Anfotericina B.

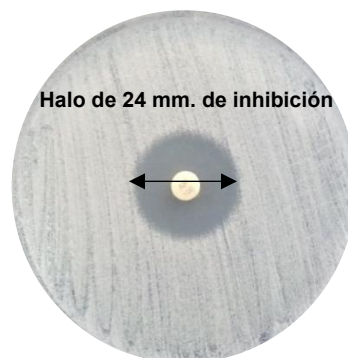


Figura 37. *Candida glabrata* sensible a Anfotericina B.



Figura 38. *Candida guilliermondii* sensible a Anfotericina B.

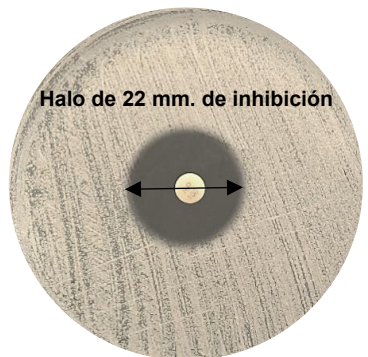


Figura 39. *Candida albicans* sensible a Anfotericina B.

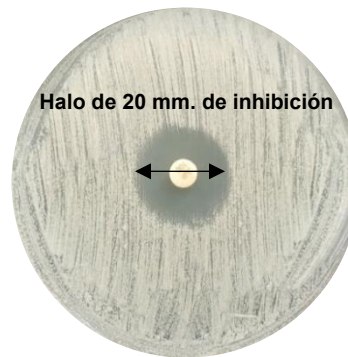


Figura 40. *Candida stellatoidea* sensible a Anfotericina B.

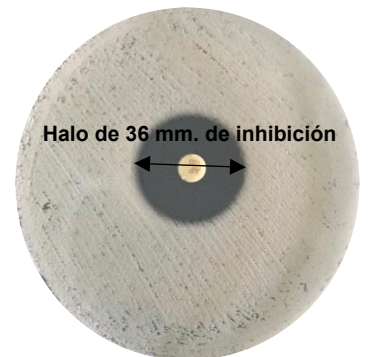


Figura 41. *Candida parapsilosis* sensible a Anfotericina B.

Figuras de Anfotericina B de las 9 especies de *Candida* en agar MH + glucosa al 2 %, se observó un mayor halo de inhibición en *Candida parapsilosis* (36 mm. de diámetro) y un halo intermedio de inhibición en *Candida tropicalis* (13 mm. de diámetro). Figuras tomadas en el laboratorio 10 de Microbiología en la Unidad de Posgrado FES Campo 1.

Número de caja	Género / Especie	Diámetro de halos de inhibición de Anfotericina B (mm)	Resultados Experimentales	Datos bibliográficos
1	<i>Candida famata</i>	26	S	*
2	<i>Candida lusitaniae</i>	23	S	S-R
3	<i>Candida krusei</i>	21	S	S-I
4	<i>Candida tropicalis</i>	13	I	I
5	<i>Candida grablata</i>	24	S	S-I
6	<i>Candida guilliermondii</i>	23	S	S-R
7	<i>Candida albicans</i>	22	S	S
8	<i>Candida stellatoidea</i>	20	S	*
9	<i>Candida parapsilosis</i>	36	S	S

Cuadro 12. Eficacia de Anfotericina B ® HIMEDIA (100 unidades/disco) en especies del genero *Candida*.

HIMEDIA y CLSI (mm):

- (R) Resistente ≤ 10 mm.
- (I) $10 \text{ mm} \leq$ Intermedio ≤ 14 mm.
- (S) Sensible ≥ 15 mm.
- * Dato no disponible

Se observó que 8 de las 9 especies de *Candida* tienen sensibilidad al antimicótico destacando entre ellas *Candida parapsilosis* (36 mm. de inhibición).



Figura 42. *Candida famata* sensible a Fluconazol.

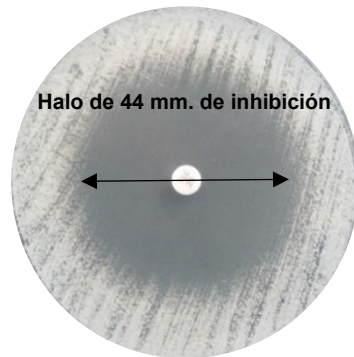


Figura 43. *Candida lusitaniae* sensible a Fluconazol.



Figura 44. *Candida krusei* sensible a Fluconazol.

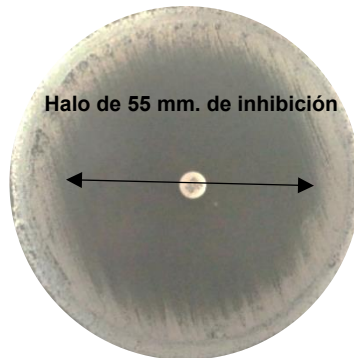


Figura 45. *Candida tropicalis* sensible a Fluconazol.



Figura 46. *Candida glabrata* sensible a Fluconazol.

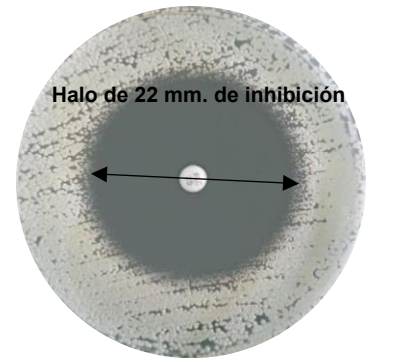


Figura 47. *Candida guilliermondii* sensible a Fluconazol.



Figura 48. *Candida albicans* resistente a Fluconazol.

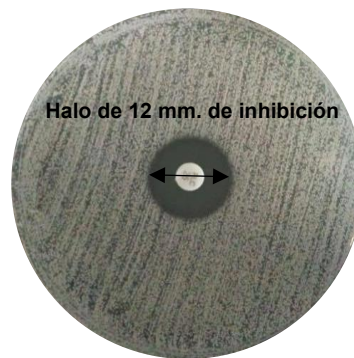


Figura 49. *Candida stellatoidea* resistente a Fluconazol.



Figura 50. *Candida parapsilosis* sensible a Fluconazol.

Figuras de Fluconazol de las 9 especies de *Candida* en agar MH + glucosa al 2 %, se observó un mayor halo de inhibición en *Candida tropicalis* (55 mm. de diámetro) y resistencia de *Candida albicans* (0 mm. de diámetro). Figuras tomadas en el laboratorio 10 de Microbiología en la Unidad de Posgrado FES Campo 1.

Número de caja	Género / Especie	Diámetro de halos de inhibición de Fluconazol (mm)	Resultados Experimentales	Datos bibliográficos
1	<i>Candida famata</i>	37	S	*
2	<i>Candida lusitanae</i>	44	S	S
3	<i>Candida krusei</i>	50	S	R
4	<i>Candida tropicalis</i>	55	S	S
5	<i>Candida grablata</i>	33	S	S
6	<i>Candida guilliermondii</i>	22	S	S
7	<i>Candida albicans</i>	0	R	S
8	<i>Candida stellatoidea</i>	12	R	*
9	<i>Candida parapsilosis</i>	38	S	S

Cuadro 13. Eficacia de Fluconazol ® HIMEDIA (25 mcg/disco) en especies del genero *Candida*.

HIMEDIA y CLSI (mm):

- (R) Resistente ≤ 14 mm.
 - (I) Intermedio $15 \text{ mm} \leq \text{Intermedio} \leq 18$ mm.
 - (S) Sensible ≥ 19 mm.
- * Dato no disponible

Se observó que 7 de las 9 especies de *Candida* resultaron sensibles (S) destacando entre ellas *Candida tropicalis* y presentando resistencia *Candida albicans* y *Candida stellatoidea*.

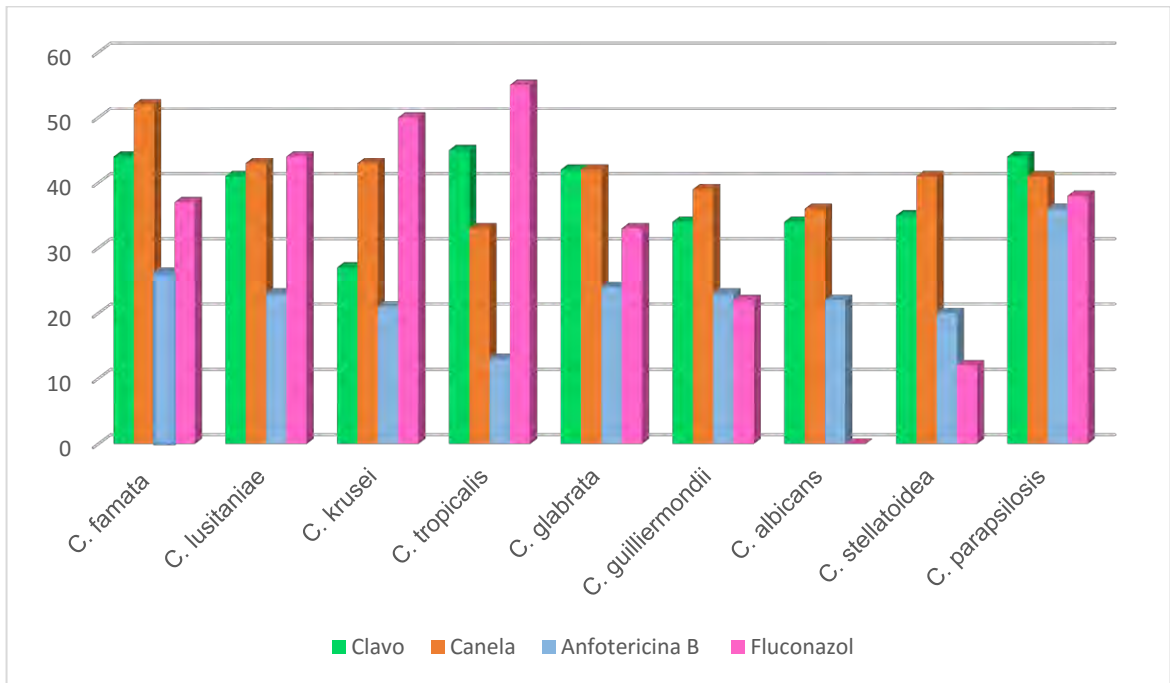


Figura 51. Comparación de la efectividad de las especies del genero *Candida* respecto a cada antimicótico de referencia y aceite esencial, se observa que los dos aceites esenciales tienen un efecto inhibitorio potente en las 9 especies de *Candida*, mientras que los antimicóticos comerciales tienen un buen efecto pero en algunas especies presentan resistencia (*Candida albicans* y *Candida stellatoidea* en Fluconazol).

21. Discusión

Las infecciones por candidiasis cada vez son más frecuentes debido a que esta levadura es oportunista. La resistencia a los antimicóticos comerciales se ha vuelto muy común debido a un mal diagnóstico, por ende es necesario encontrar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de candidiasis las cuales se busca sean eficaces, económicas y con menos efectos adversos, por lo que planteó como posible tratamiento alternativo contra candidiasis a los aceites esenciales de las especias (Clavo y Canela) debido a las propiedades antifúngicas, antibacterianas, antimicrobianas con las que cuentan, por consiguiente se realizaron pruebas cualitativas con el método Kirby-Bauer que pueden dar pie a pruebas posteriormente cuantitativas.

El método de obtención para aceites esenciales fue el recomendado por la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos la cual se rige por la MGA-FH 0090 (Ver Anexo 3) en el que la obtención se llevó a cabo por destilación por arrastre de vapor (Secretaría de Salud, 2004). Para separar el aceite esencial de su fase acuosa se decidió utilizar el disolvente acetato de etilo debido a sus características químicas (insoluble en agua) y de solvatación para aceites y de fácil recuperación por su bajo punto de ebullición, resultando óptimo su uso ya que se comprobó por medio del espectro IR que no interactuó con los componentes de los aceites esenciales. El espectro IR logró identificar a través de bandas a los grupos funcionales presentes en las moléculas de cinamaldehído y eugenol que son los componentes mayoritarios de cada aceite esencial (Ver Figura 12 y 13).

Posteriormente se calculó el rendimiento obtenido de los aceites esenciales (canela con rendimiento de 0.6 % y clavo con rendimiento de 0.9 % [Ver Anexo 10]) y el cual varía ya que depende de la especie, la época de siembra, el suelo, clima, etc.

Al obtener los aceites esenciales se les realizó un control microbiológico en el medio AST® BIOXON (agar soya tripticaseína) (Ver Anexo 7) del cual se obtuvo un resultado negativo por lo que aseguramos tener aceites esenciales libre de microorganismos contaminantes.

El agar ideal para la evaluación de los aceites de clavo y canela y los antimicóticos de referencia es el medio Mueller–Hinton® DIBICO (Ver fundamento en Anexo 9) adicionado con glucosa al 2 %. La determinación se realizó por el método de Kirby-Bauer (difusión en disco).

El medio Mueller – Hinton® DIBICO determina la susceptibilidad de *Candida* debido a su reproducibilidad y se recomienda utilizar un solo sensidisco de alta concentración, la adición de glucosa al 2 % proporciona un crecimiento adecuado de las levaduras.

El aceite esencial de clavo contiene propiedades antimicrobianas, antibacterianas y antiinflamatorias y su componente mayoritario es el eugenol el cual tiene la capacidad de permear la membrana celular, inhibir enzimas y afectar proteínas ya que se ha comprobado en otros patógenos (*Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Brochothrix thermosphacta*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Brochothrix thermosphacta* (Hyldgaard, 2012), por lo que se plantea que las especies de *Candida* sufren los mismos efectos mencionados anteriormente, ya que los resultados in vitro mostraron de acuerdo a la escala Duraffourd que son sumamente sensibles (S+++) al aceite esencial de clavo en especial *Candida tropicalis* la cual presenta un halo de inhibición de 45 mm. seguido por *Candida parapsilosis* y *Candida famata* (halo de inhibición de 44 mm.) y *Candida glabrata* (halo de 42 mm.) (Ver Cuadro 10) siendo los más

representativos experimentalmente, con estos datos obtenidos podemos decir que el aceite esencial de clavo puede ser utilizado como tratamiento en las infecciones candidiasicas que causan onicomicosis ya que se ha reportado que *Candida tropicalis* afecta las uñas de las manos en un 7.5 %, a *Candida famata* en un 12.4 %, *Candida parapsilosis* en un 20.8 % y a *Candida glabrata* en un 12.4 % (Molina, 2013).

El aceite esencial de canela contiene propiedades antibacterianas, antimicrobianas, antifúngicas, y su componente mayoritario es el cinamaldehído el cual tiene la capacidad de inhibir síntesis de la pared celular, provocar citocinesis (concentraciones bajas), a concentraciones sub-letales actúa como un inhibidor de la ATPasa dando así muerte celular, y a concentraciones letales perturba la membrana celular ya que se ha comprobado en distintos patógenos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus cereus*, *Photobacterium Leioognathi*, *Escherichia coli* (Hyldgaard, 2012), por lo que se plantea que las especies de *Candida* sufren los mismos efectos mencionados anteriormente debido al efecto inhibitorio presentado por el aceite esencial de canela ya que en los resultados in vitro se plantea que las especies de *Candida* pueden seguir alguno de estos mecanismos de acción debido al efecto inhibitorio presentado, los resultados mostraron de acuerdo a la escala Duraffourd que son sumamente sensibles (S+++), en especial *Candida famata* la cual presenta un halo de inhibición de 52 mm. seguido de *Candida krusei* (halo de 43 mm.) y *Candida glabrata* (halo de 42 mm.) siendo los más representativos experimentalmente (Ver Cuadro 11), con estos datos obtenidos el aceite esencial de canela puede ser utilizado como tratamiento en las infecciones candidiasicas que causan onicomicosis ya que se ha reportado que *Candida famata* afecta las uñas de las manos en un 6.6 %, a *Candida krusei* en un 7.8 %, y a *Candida glabrata* en un 2.6 % (Alvarado, 2014) ya que actúa directamente sobre la lámina ungueal de las uñas afectando así las células y su material proteico fibroso gracias al cinamaldehído componente mayoritario en el aceite esencial el cual le da esta propiedad.

El disco de Fluconazol ®HIMEDIA 25 mcg/disco es utilizado en pruebas de susceptibilidad antimicrobiana cualitativa basado en el método Kirby–Bauer a través de procedimientos de referencia normalizados por la OMS (Organización Mundial de la Salud) y la FDA (Food and Drug Administration) actualizados por CLSI, ya que éste es empleado para el tratamiento contra candidiasis.

El fluconazol es de uso sistémico para tratamiento de la *Candida* y su mecanismo de acción es fungistático, a nivel de membrana celular, su mecanismo interrumpe la síntesis de ergosterol (membrana fúngica), principal componente lipídico de la membrana celular fúngica, la inhibición de la 14 α – esterol – desmetilasa enzima dependiente de la citocromo P- 450 – oxidasa. La consecuencia directa es la acumulación de 14 α – metil esterol sobre la superficie celular, generando una membrana defectuosa que pierde la capacidad de permeabilidad, en particular en el intercambio iónico (bomba de sodio/potasio). A nivel mitocondrial también tienen acción sobre algunas enzimas: NADH – oxidasa, peroxidasa y catalasa, lo que genera un aumento de radicales libres como peróxido de hidrógeno, con consecuencias intracelulares importantes, por lo tanto hay una inhibición fúngica. Respecto a los resultados in vitro con fluconazol sobre las especies de *Candida* a través de las escalas de laboratorios HIMEDIA (Ver Anexo 13) y el CLSI en mm., nos mostraron que *Candida albicans* y *Candida stellatoidea* son Resistente a fluconazol y las otras especies presentaron un halo mayor a 20 mm. siendo así sumamente sensible, de acuerdo a sus datos bibliográficos, se dice que *Candida krusei* presenta resistencia (R) (Ver Cuadro 5), la variación en estos datos se pueden deber a varios factores como; resistencia de manera intrínseca o al surgimiento de levaduras resistentes, esto debido a la aparición de nuevas especies patógenas, a la prescripción irracional de antimicóticos como profilaxis y al aumento de las dosis terapéuticas. Por lo que estos resultados indican que fluconazol a pesar de ser un antimicótico con alta resistencia a las especies de *Candida* mostro no ser tan eficaz para todas las especies de *Candida*.

Otro antimicótico comercial recomendado por el CLSI para candidiasis es Anfotericina B el cual es un fármaco para micosis sistémicas graves y superficiales de amplio espectro, su mecanismo de acción es fungistático y fungicida el cual actúa a nivel de membrana celular y se adhiere a esteroides (ergosterol), lo que origina la formación de grandes poros y espacios en las membranas celulares; lo que da como consecuencia una alteración en el intercambio iónico, en especial en la bomba de sodio / potasio, que causa lisis y muerte celular.

Los resultados in vitro mostraron que solo *Candida tropicalis* posee sensibilidad intermedia mientras las demás especies de *Candida* se muestran sumamente sensibles concordando así con los datos bibliográficos (Ver Cuadro 12), estos resultados nos indican que Anfotericina B mostro ser potente debido a la alta sensibilidad que presento hacia las diferentes especies de *Candida* (Ver Anexo 13).

Al comparar el efecto inhibitorio entre los aceites esenciales de clavo y canela se puede determinar que los dos aceites son eficaces ya que los resultados mostraron que las especies de *Candida* son sumamente sensibles (S+++) de acuerdo a la escala Duraffourd (Ver Figura 32) en las especies de *Candida*, y debido a su componente mayoritario (eugenol) del aceite esencial es viable ya que contiene propiedades cicatrizantes puesto que estimula la regeneración celular, así como la reparación de los tejidos.

En general, para el tratamiento de la onicomicosis por levaduras están indicados los antifúngicos sistémicos azólicos. De éstos, los de mayor uso han sido el fluconazol e itraconazol. Uno de los fenómenos de reciente observación en las infecciones ungueales por hongos levaduriformes es el

incremento en los fracasos terapéuticos que, entre otras causas, puede tener su origen en la aparición de resistencia a los antifúngicos (Lizardo, 2008).

Los antimicóticos de referencia que se utilizaron fueron elegidos debido a lo estipulado por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) en el documento M44-A (Métodos por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos) también basadas en el estudio “Clinical practice guidelines for the management of candidiasis” (Pappas, 2009) donde se probó la efectividad antimicótica de especies de *Candida* (Ver Anexo 12).

Comparando los resultados entre los aceites esenciales y los antimicóticos de referencia podemos decir que los aceites esenciales son una opción terapéutica en los tratamientos para candidiasis ya que son pocas las especies de *Candida* las que se presentaron una resistencia fúngica, por ende los aceites esenciales pueden llegar a ser una opción terapéutica alternativa.

22. Conclusiones

El análisis taxonómico de clavo y canela fue identificado correctamente por el Herbario de Iztacala, fue fundamental su clasificación en este proyecto ya que existe una gran variedad de especies.

El método de extracción de los aceites esenciales fue el correcto y se confirmó al realizar el análisis IR, se demostró que no hay presencia de disolvente (acetato de etilo).

Por medio del medio agar MH + glucosa al 2 % se comprobó que el acetato de etilo no presenta inhibición, lo cual le da validez al método empleado, esto es importante ya que si el acetato de etilo interfiere en la prueba no se podría comprobar el efecto inhibitorio que tendría un aceite puro en las especies de *Candida*, en determinado momento si el aceite esencial hubiera estado contaminado con el acetato de etilo, los resultados obtenidos no serían confiables.

A partir del procesamiento e identificación de las 9 cepas de *Candida* proporcionadas por el Laboratorio 10 de la Unidad de Posgrado FESC, se identificó la capacidad inhibitoria de los aceites esenciales de clavo y canela sobre las especies del género *Candida* a través de una prueba cualitativa.

Los aceites esenciales tuvieron la capacidad de inhibir 100 % las especies de *Candida*, con diferencia en el diámetro de sus halos ya que algunos son mayores que otros, demostrando así que la onicomycosis causada por el género *Candida* puede reducirse a través de nuevos tratamientos que disminuyan su incidencia y prevalencia.

Este estudio cualitativo in vitro puede dar pie a prospectivos proyectos (pruebas cuantitativas) que logren establecer la concentración inhibitoria adecuada, para que sean tomados en cuenta por la industria farmacéutica

como un principio activo, eficaz y seguro que ayude a los tratamientos de onicomycosis y elimine esta patología tan frecuente y de difícil erradicación. Los antimicóticos de referencia (Fluconazol y Anfotericina B) ensayados confirmaron que Fluconazol es menos eficaz contra el género *Candida*, mientras que Anfotericina B sigue siendo un antimicótico con efecto inhibitor, por lo que este estudio plantea ampliar opciones terapéuticas alternas a las ya conocidas a través de los aceites esenciales ya que los resultados obtenidos fueron sumamente sensibles (S+++), siendo así el comienzo de un estudio prospectivo debido a sus resultados cualitativos.

Referencias

- AIST, N. I. (2016). *Spectral Data Base System for Organic Compounds (SBDS)*. Recuperado el 29 de Marzo de 2016, de Japón. Research Institute for Material and Chemical Measurement: <http://sdfs.db.aist.go.jp>
- Alvarado, A. e. (2014). Onicomiosis por Candida en las uñas. *Revista Dermatología*.
- Arenas, R. (2014). *Micología Médica Ilustrada*. México: MCGRAW HILL.
- Biasoli, M. (29 de Marzo de 2013). *Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmaceuticas*. Obtenido de Universidad Nacional de Rosario: http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/MATERIALES_2013/TEORICOS_2013/CANDIDIASIS_2013-1.pdf
- Bonifaz, A. (2015). *Micología Médica Básica*. México: MCGRAW HILL.
- Bouhdid, S., Abrini, J., Baudoux, D., Manresa, A., & Zhiri, A. (2012). Les huiles essentielles de l'origan compact et de la Cannelle de Ceylan: pouvoir antibactériene et mécanisme d'action. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 31(3), 141-8.
- Bravo, L. (2003). *Farmacognosia*. Madrid: ELSERVIER.
- Camacho, H. (2003). *Caracterización fisicoquímica del aceite esencial de la Musia (Minthostachyssetosa) y su estudio antibacteriano*. Peru: UNAC, Facultad de Ingeniería Química. Recuperado el 22 de Abril de 2016, de <https://es.scribd.com/doc/294456773/camacho-mh-pdf>
- Caminero, A. (2013). *RODERIC*. Recuperado el 22 de abril de 2016, de Repositori de Contingut Lliure: <http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/30114/Tesis%20doctoral.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Castañón, M. (2012). *Universidad Nacional de Colombia*. Recuperado el 29 de Marzo de 2016, de Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*), sobre la levadura (*Rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada.
- Castrillón, L. (2005). Factores de virulencia en *Candida* sp. *Dermatología Revista Mexicana*, 49(1), 13.
- Comité Nacional para la Vigilancia Epidemiologica. (2016). Actualización de la Situación de influenza durante la Temporada 2015-2016. *Boletín Epidemiologico*, 33(6), 1. Recuperado el 29 de Marzo de 2016, de <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/boletin/2016/BOL-EPID-2016-SE06.pdf>
- Delgadillo, I. (2016). *National Institute of Standards and Technology (NIST)*. Recuperado el 29 de Marzo de 2016, de Eurospec - Access to Research Spectroscopic Data and Associated Chemical Knowledge: <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C97530&Units=SI&Type=IR-sssSssSsSSsSPEC&Index=1#IR-SPEC>

- Enache-Angoulvant, A. (2007). Reglas de interpretación de las infecciones por Candida. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(4), 3.
- Forbes, B. A. (2007). *Diagnostic Microbiology*. Madrid: ELSEVIER MOSBY.
- Gutierrez, M. (2012). Estudio in vitro de antimicóticos contra cepas de Candida aisladas de pacientes del Hospital General de México OD. *Dermatología Revista Mexicana*, 56(2), 2.
- Hall, V., Rocha, M., Rodríguez, E., & CIMED, F. (2002). *Plantas Medicinales Volumen II*. Costa Rica: CIMED. Recuperado el 22 de Abril de 2016, de <http://sibdi.ucr.ac.cr/boletinespdf/cimed27.pdf>
- Hernandez, F. (2003). Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. *Revista Salud Pública de México*, 45(6), 5.
- Hyldgaard, M. (2012). Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components. *Frontiers in Microbiology*, 3(12), 12-13.
- Larruskain, J., Idígoras, P., & Mendiola, J. (2008). Onicomycosis: diagnóstico y tratamiento. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 32(3), 4.
- Lizardo, G. (2008). Presentación inusual de onicomycosis por Candida albicans. *REvista Medica de Honduras*, 80(2), 1.
- López, R., Méndez, L., Hernández, F., & Castañón, L. (2012). *Micología Médica: Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio* (3ra ed.). México: TRILLAS.
- Marisa, B. (2 de Mayo de 2016). Estructura y actividad de los antifúngicos. Buenos Aires, Argentina.
- Martinez, A. (2001). *Aceites Esenciales*. Medellín: UNIVERSIDAD DE ANTOQUIA.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. (2003). *Real Farmacopea Española* (2da ed.). Madrid: BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO.
- Molina, V. (2013). Onicomycosis de mano causada por tres especies de Candida. *DCMQ, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"*, 11(1), 1-2.
- Pappas, P. (2009). Clinical practice guidelines for the management of candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*, 48(5), 2.
- Pathasarathy, V. (2008). *Chemistry of Spice*. India: CABI INDIA.
- Pfaller, M. A., & Diekema, D. (2007). Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology*, 20(1), 137-138.
- Ravindran, P. (2004). *Cinnamon and Cassia. The genus Cinnamomum*. Boca Raton: CRC PRESS.
- Sardi, J. (22 de Abril de 2016). *Microbiology Society*. Obtenido de Microbiology Society: http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/jmm/62/1/10_jmm045054.pdf?expires=1462067076&id=id&accname=guest&checksum=6D06813256DD9ADB049577632A4935E4
- Secretaría de Salud. (2004). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (8va ed.). Mexico: Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

- Silva, S. (2009). Biofilms of non-Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition. *Medical Micology*, 47(7), 2.
- Tobar, E. (2011). Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. *Revista Chilena de Infectología*, 28(1), 1.
- Tránsito, L. (2004). Los aceites esenciales. Aplicaciones farmacológicas, cosméticas y alimentarias. *OFFARM*, 23(7), 89.
- Vásquez, O., Alenguer, A., & Marreros, J. (2001). Extracción y caracterización del aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale*). *UNAP, Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Revista Amazónica de Investigación Alimentaria*, 1(1), 1-2.

Anexos

24.1 Anexo 1: Identificación taxonómica de las especies en Herbario IZTACALA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

HERBARIO IZTACALA



FESI/IZTA/05/2016

KATERIN IVONNE REYES RAYA
Alumna de la Carrera de Bioquímica Diagnóstica
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Presente


Por este conducto me permito proporcionar a usted la identificación taxonómica del material botánico de respaldo del Proyecto de Tesis "Evaluación del efecto inhibitorio de extracto oleoso de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry (MYRTACEAE) (Clavo) y *Cinnamomum zeylanicum* Blume (LAURACEAE) (Canela) en diferentes especies de género *Candida*", que se realiza en el Laboratorio 10 de la Unidad de Posgrado, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, bajo la dirección de la Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo.

Asimismo, le informo que las plantas han sido integradas en la Colección Etnobotánica del Herbario Iztacala con los siguientes números de registro:

NOMBRE CIENTÍFICO	FAMILIA	NOMBRE POPULAR	No. REGISTRO
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	LAURACEAE	"Canela"	2480 IZTA
<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. Perry	MYRTACEAE	"Clavo"	2481 IZTA

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Los Reyes Iztacala, Estado de México, 08 de febrero de 2016


M. EN C. MA. EDITH LÓPEZ VILLAFRANCO
Responsable del Herbario IZTA



FOTOS DE HERBARIO DE CLAVO Y CANELA



HERBARIO IZTA	FLORA ÚTIL DE MEXICO	FES-IZTACALA
Nº REG. 2481	FAM.: MYRTACEAE	
N.C.: <i>Syzygium</i>	<i>aromaticum</i>	(L.) Merr. & L.M. Perry
N.P.: Clavo		
EDO. México	MPIO. Tlaxiácala	
LOC.: Casco La Providencia (Central de Abastos Tlaxiácala Mariano Escobedo)		
TIPO DE VEG.:		
COORD.	y	ALT.: m.s.n.m
OBS.: Tesis FES-Cuautitlán: Lic. Bioquímica Diagnóstica "Evaluación del efecto inhibitorio de extracto oleoso de <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. (MYRTACEAE) (Clavo) y <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume (LAURACEAE)		
COL. Katerin Ivonne Reyes Raya		
Nº DE COL: s.n.	FECHA: 12 /	Enero / 2016
DET.: Patricia Jáquez Ríos		
USOS: Medicinal (Antimicrobiano, analgésico, antiinflamatorio, antipirético, analgésico d		

Figura 52. Identificación taxonómica: Clavo (*Syzygium Aromaticum*)



HERBARIO IZTA	FLORA ÚTIL DE MEXICO	FES-IZTACALA
Nº REG. 2480	FAM.: LAURACEAE	
N.C.: <i>Cinnamomum</i>	<i>zeylanicum</i>	Blume
N.P.: Canela		
EDO. México	MPIO. Tlaxiálan	
LOC.: Casco La Providencia (Central de Abastos Tlaxiálan de Mariano Escobedo)		
TIPO DE VEG.:		
COORD.	y	ALT.: m.s.n.m
OBS.: Tesis FES-Cuautlálan: Lic. Bioquímica Diagnóstica "Evaluación del efecto inhibitorio de extracto oleoso de <i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M. (MYRTACEAE) (Clavo) y <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume (LAURACEAE)		
COL. Katerin Ivonne Reyes Raya		
Nº DE COL: s.n.	FECHA: 12 / Enero / 2016	
DET.: Patricia Jácuéz Ríos		
USOS: Medicinal (Antibacterial, fungistático, promueve la motilidad, antiulcérico, estimula)		

Figura 53. Identificación taxonómica: Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume)

24.2 Anexo 2: Análisis Organoléptico de los Aceites Esenciales

Características de Aceites Esenciales	Aceite esencial de clavo	Aceite esencial de canela
Olor	Muy aromático, característico a clavo	Muy aromático, característico a canela
Color	Amarillo fuerte	Amarillo claro
Sabor	Muy picante	Muy picante
Aspecto general	Líquido fluido transparente	Líquido fluido transparente

24.3 Anexo 3: Norma para Aceites Esenciales

ACEITES ESENCIALES. MGA-FH 0090. Utilizar un matraz bola de 1000 ml con 300 ml de agua como líquido de extracción. Proceder inmediatamente a la determinación en 100 g de la muestra troceada. Destilar a una velocidad de 2.0 ml a 3.0 ml por minuto durante 2 horas y media.

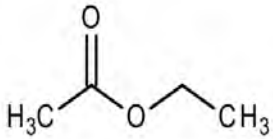
Para determinar el volumen de aceite, el material vegetal se destila con agua y el destilado se colecta en un tubo graduado. La porción acuosa se separa automáticamente y se regresa al matraz de destilación. Si los aceites esenciales poseen una densidad más alta o cercana a la del agua, o son difíciles de separar de la fase acuosa debido a la formación de emulsiones, se agrega entonces un disolvente con una densidad baja y un punto de ebullición adecuado al tubo de medición. Esto permite que los aceites esenciales se disuelvan en él, se separen y floten sobre la fase acuosa.

Llevar a cabo la determinación por destilación por arrastre de vapor. Colectar el destilado en un tubo graduado, usando xileno o el disolvente específico en la monografía correspondiente y permitir que la fase acuosa recircule en el matraz de destilación.

(Delgadillo, 2016) (Secretaría de Salud, 2004)

24.4 Anexo 4: Reactivos

Acetato de etilo

Sinónimo:	Formula:
<ul style="list-style-type: none">▪ Ester Etilico de ácido acético▪ Ester acético▪ Etanoato de Etilo▪ Acetoxietano▪ Ester Etil Acetico	$C_4H_8O_2$, $CH_3COOCH_2CH_3$
	
Peso molecular:	Pureza:
88.1 g/mol	99.8 %

24.5 Anexo 5: Equipo

Espectrómetro FT-IR Nicolet™ iS™ 10

- El espectrómetro FT-IR Nicolet iS10 es un completo sistema de espectroscopía infrarroja concebido para satisfacer las necesidades y características de análisis de rutina. Ofrece el máximo nivel de confianza en la identificación y verificación de materiales. Identificación de los ingredientes principales de las mezclas a través de innovadores análisis multicomponente. Analiza mezclas con biodiésel; análisis de cálculos renales; polímeros y plásticos; aseguramiento y control de la calidad; sector farmacéutico; medicina legal.

Intervalo espectral	Número de ondas: 400-7500 o 400-9000 (XT-KBr)
Longitud de onda de precisión:	0.01 cm ⁻¹ a 2000 cm ⁻¹
Velocidad Colección:	Variable de 0.16 cm / seg a 2,5 cm/seg
Velocidad máxima:	40 espectros por segundo a 16 cm ⁻¹ de solución
resolución espectral:	0.4 cm ⁻¹ , no apodizada
Detector:	DTGS (detector de sulfato de triglicina deuterado) KBr, 4 cm - 1 resolución espectral
Divisor de haz:	KBr
Fuente de luz:	Lampara de tungsteno / halógeno
Frecuencia de calibración:	Tubo láser de He-Ne
Tamaño :	550 mm x 570 mm x 250 mm (W x D x H)
Peso:	39 Kg



Figura 54. Espectrómetro FT-IR Nicolet™ iS™ 10, tomada en el Laboratorio de Química Medicinal y Teórica en Unidad de Posgrado FES Campo 1.

24.6 Anexo 6: Cepas aisladas de *Candida* spp.

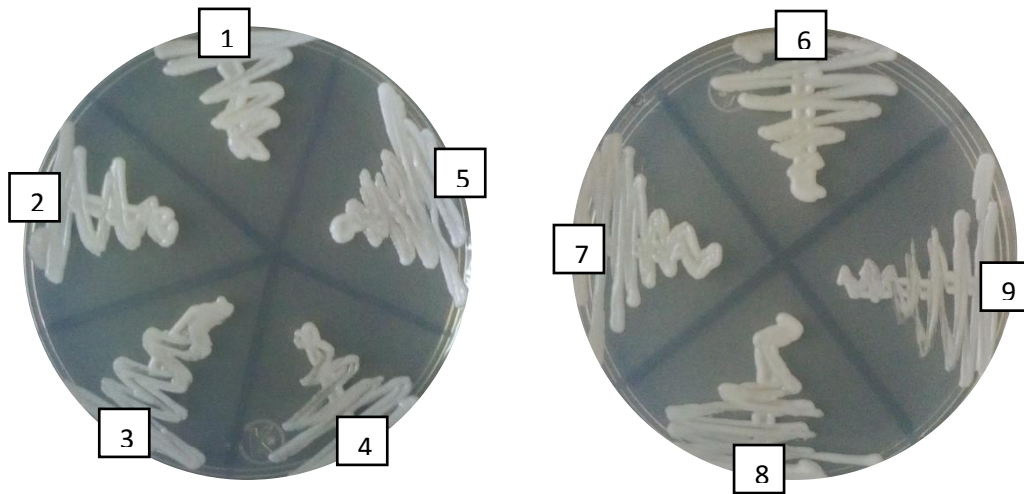


Figura 55. Especies de *Candida* en agar Dextrosa Sabouraud® MCD – LAB, tomada en el laboratorio 10 de Microbiología en la Unidad de Posgrado FES Campo 1;

1. *Candida famata*.
2. *Candida lusitaniae*,
3. *Candida krusei*,
4. *Candida tropicalis*,
5. *Candida glabrata*,
6. *Candida guilliermondii*,
7. *Candida albicans*,
8. *Candida stellatoidea*,
9. *Candida parapsilosis*.

24.7 Anexo 7. Resultados en AST® BIOXON de los aceites esenciales

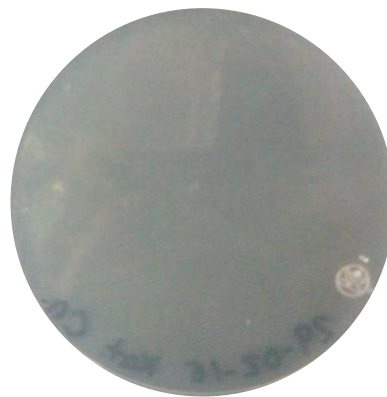
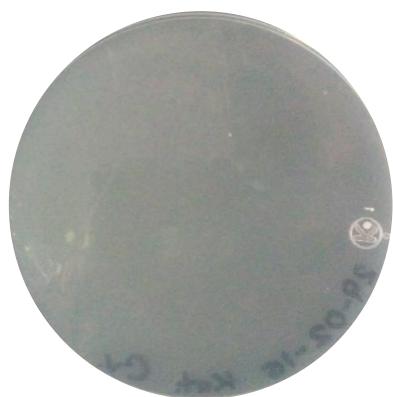


Figura 56. Control negativo sin contaminación en AE de clavo.

Figura 57. Control negativo sin contaminación en AE de canela.

Tomadas en el laboratorio 10 de Microbiología en la Unidad de Posgrado FES Campo 1.

24.8 Anexo 8. Resultados de Chromagar *Candida*® BD y agar Biggy® BIOXON

Fundamento de Chromagar *Candida*® BD:

BBL Chromagar Candida Medium es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de hongos. Con la inclusión de sustratos cromógenos en el medio, las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* producen colores diferentes, lo que permite la detección directa de estas especies de levaduras en la placa de aislamiento¹⁻⁶. Las colonias de *C. albicans* presentan un color de verde claro a mediano, las colonias de *C. tropicalis*, de azul verdoso a azul metálico y las colonias de *C. krusei*, rosado claro con borde blancuzco. Es posible que otras especies de levaduras produzcan su color natural (crema) o presenten un color rosado o malva de claro a oscuro (por ejemplo, *Candida* [*Torulopsis*] *glabrata* y otras especies). Una ventaja adicional del medio es la fácil detección de cultivos mixtos de levaduras, debido a los diferentes colores que presentan sus colonias. Peptonas especialmente seleccionadas suministran los nutrientes en BBL Chromagar Candida Medium. La mezcla cromógena patentada está formada por sustratos artificiales (cromógenos), que liberan compuestos de colores diferentes al ser degradados por enzimas específicas. De esta manera es posible diferenciar determinadas especies o detectar ciertos grupos de organismos con sólo un mínimo de pruebas de confirmación. El cloranfenicol inhibe la mayoría de los contaminantes bacterianos.

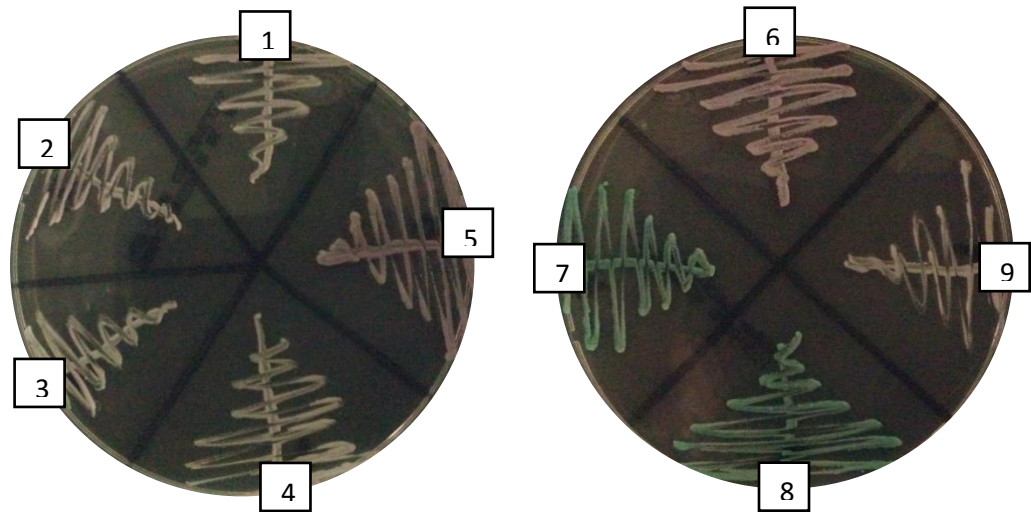


Figura 58. Especies de Candida en agar Chromagar Candida® BD, tomada en laboratorio 10 de Microbiología en la Unidad de Posgrado FES Campo 1;

1. *Candida famata*.
2. *Candida lusitanae*,
3. *Candida krusei*,
4. *Candida tropicalis*,
5. *Candida glabrata*,
6. *Candida guilliermondii*,
7. *Candida albicans*,
8. *Candida stellatoidea*,
9. *Candida parapsilosis*

Fundamento de agar Biggy ® BIOXON:

Es utilizado para aislamiento de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, y para diferenciar las especies según el método de Nickerson. Nickerson descubrió que *Candida albicans* se puede diferenciar de otras *Candidas* en este medio basándose en el color y morfología de las colonias.

El extracto de levadura es una fuente de vitaminas, en particular del Grupo de B esencial para el crecimiento. La glicina estimula el crecimiento. La dextrosa es el carbohidrato fermentable que proporciona el carbono y la energía.

Las especies de *Candida* reducen la sal de bismuto a bismuto y el sulfito a sulfuro, mediante un proceso de reducción de sustrato. El bismuto y el sulfuro se combinan en un precipitado de color amarronado a negro que tiñe las colonias y puede difundirse en el medio. Asimismo, los compuestos de bismuto y azufre inhiben numerosas bacterias, sin afectar el crecimiento de especies de *Candida*.

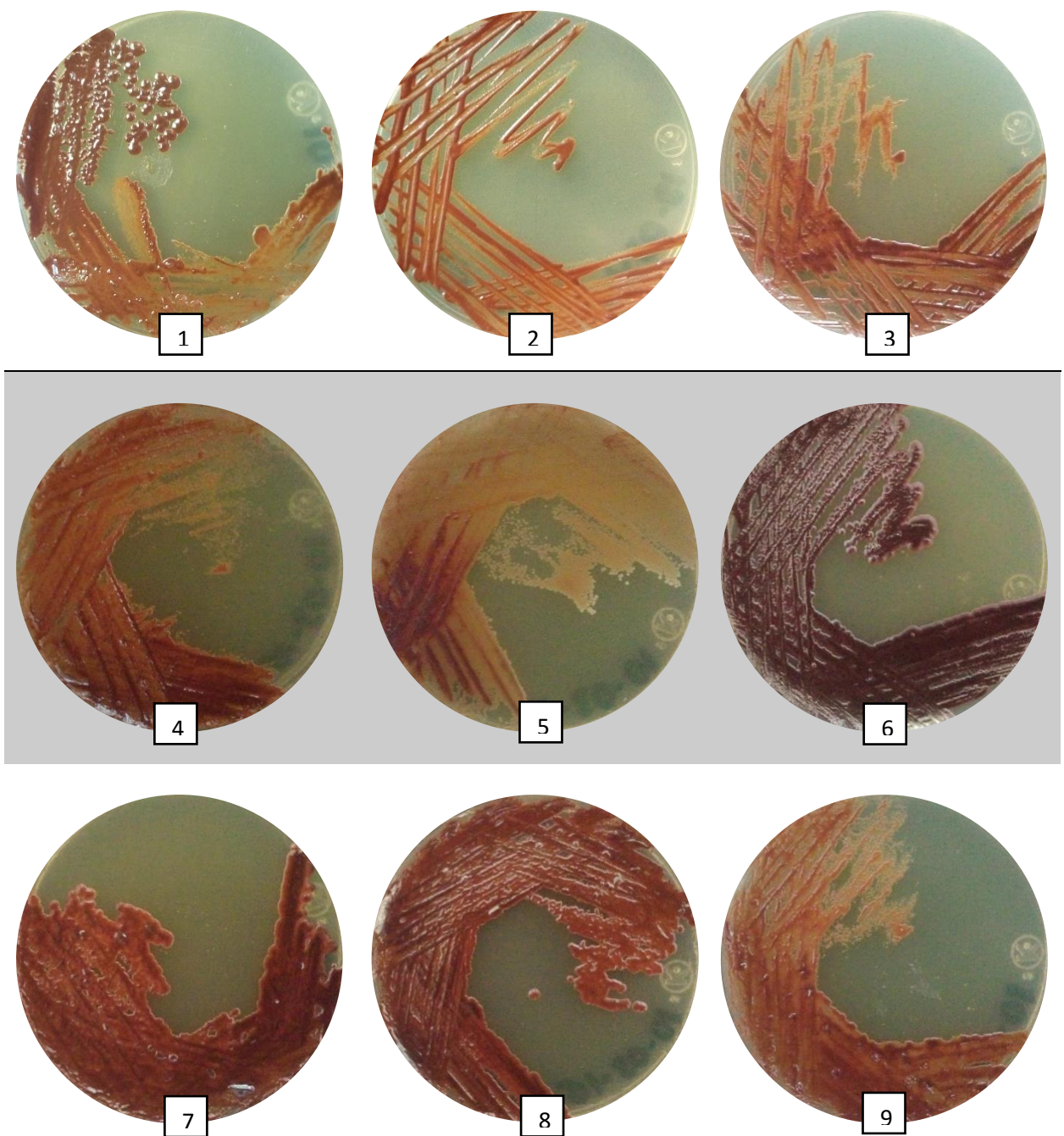


Figura 59. Especies de *Candida* en agar Biggy® BIOXON, tomada en el laboratorio 10 de Microbiología en la Unidad de Posgrado FES Campo 1; 1. *Candida famata*, 2. *Candida lusitanae*, 3. *Candida krusei*, 4. *Candida tropicalis*, 5. *Candida glabrata*, 6. *Candida guilliermondii*, 7. *Candida albicans*, 8. *Candida stellatoidea*, 9. *Candida parapsilosis*.

24.9 Anexo 9: Fundamento de Agar Mueller Hinton adicionado con glucosa al 2 %

La peptona de caseína ácida y la infusión de carne de res proporcionan los nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento, estos ingredientes tienen un bajo contenido en timina y timidina que evitan la interferencia en la determinación de la CIM para el trimetoprima con sulfametoxazol. El calcio y el magnesio se adicionan para una mejor determinación de la CIM. El procedimiento se basa en las sustancias antimicrobianas impregnadas en discos de papel que se difunden en el agar produciendo diámetros de inhibición que se correlacionan con un patrón de medición establecido (concentración mínima inhibitoria, CIM). La glucosa sirve como fuente de energía para los cultivos de hongos.

24.10 Anexo 10: Porcentaje de Rendimiento

$$\frac{4.2 \text{ ml de AE}}{700 \text{ g de Canela}} \times 100 = 0.6 \%$$

**Porcentaje de rendimiento en
Aceite Esencial de Canela**

$$\frac{6.3 \text{ ml de AE}}{700 \text{ g de Clavo}} \times 100 = 0.9\%$$

**Porcentaje de rendimiento en
Aceite Esencial de Clavo**

24.11 Anexo 11. Referencias de espectro IR

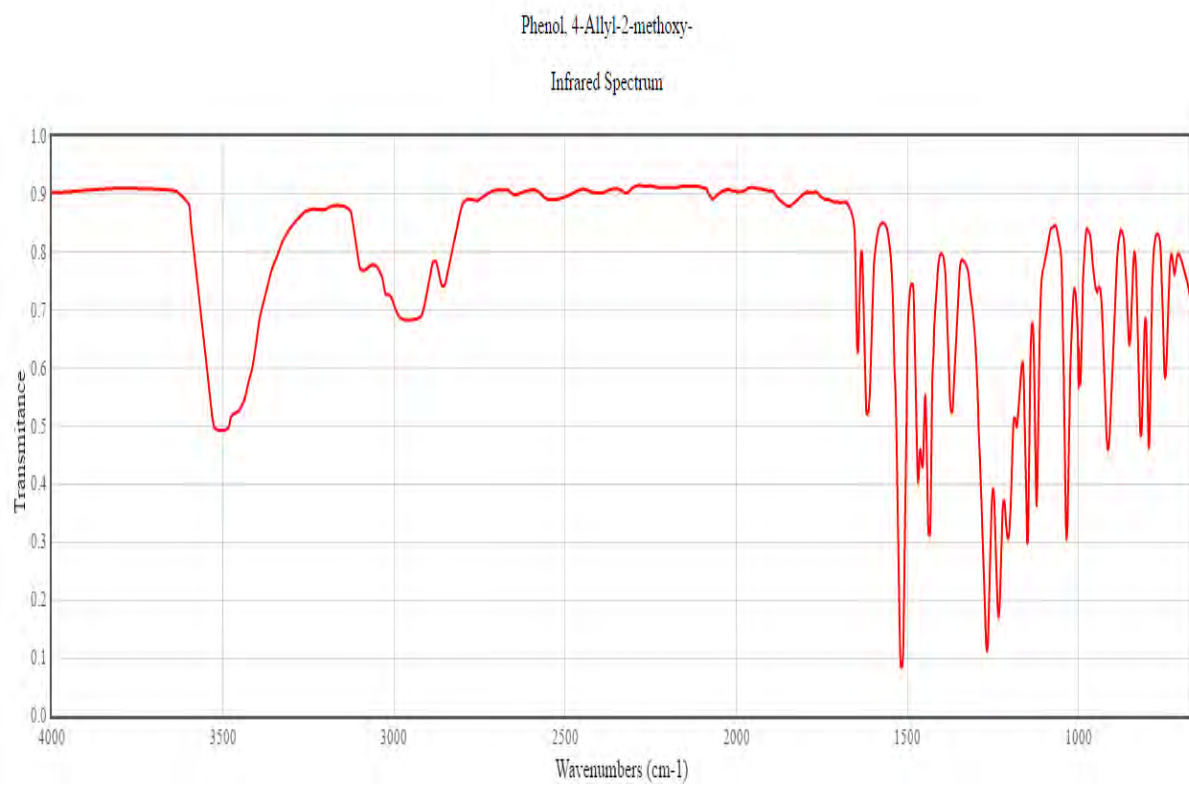


Figura 60. Espectroscopia infrarroja de referencia; Eugenol (Clavo) tomada de (Delgadillo, 2016).

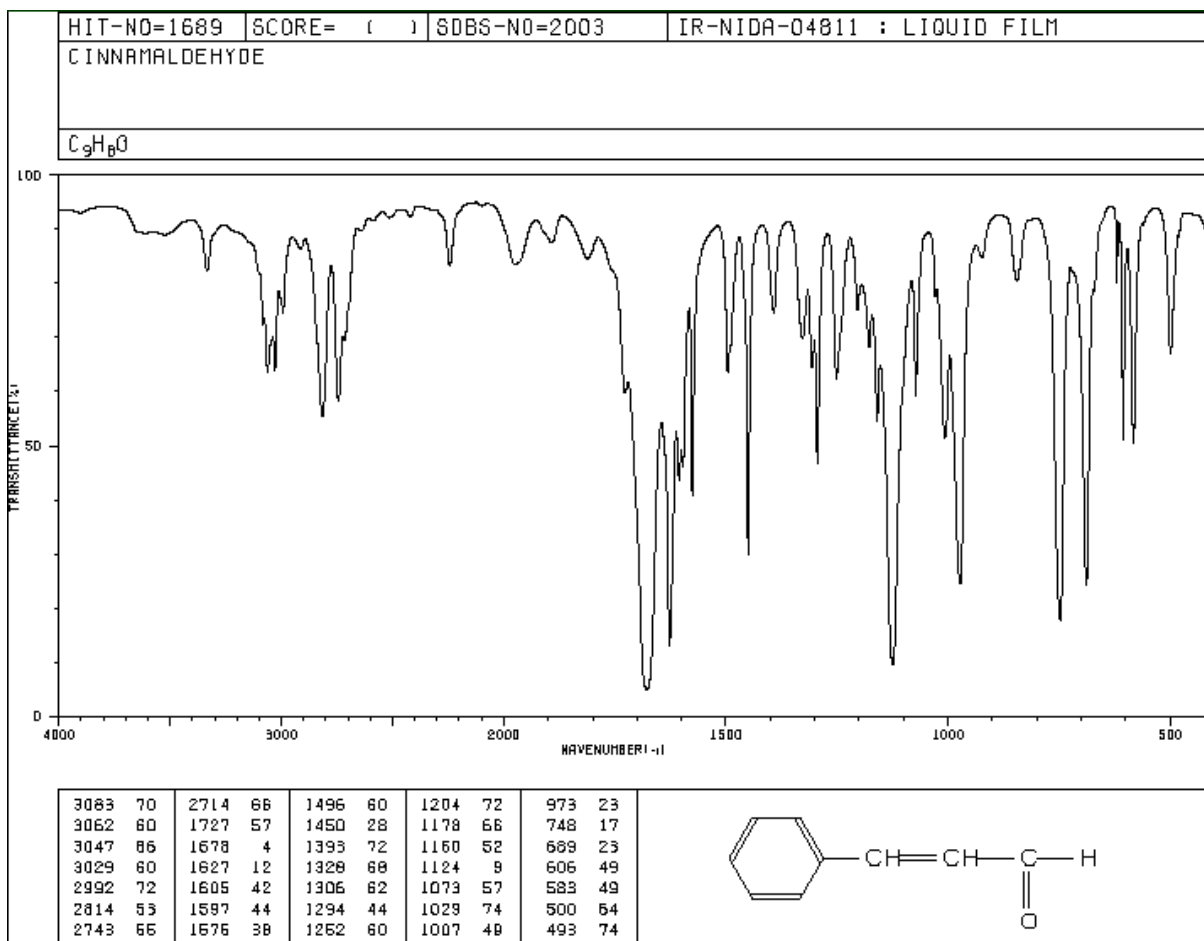


Figura 61. Espectroscopia infrarroja de referencia; Cinnamaldehydo (Canela) tomado de (AIST, 2016).

24.12 Anexo 12. Susceptibilidad de especies de *Candida spp.*

Especie	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazo	Posaconazol	Flucitosin	Anfotericin	Candinas
			I		a	a B	
<i>C. albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. tropicalis</i>	S	S	S	S	S	S	S
<i>C. parapsilosis</i>	S	S	S	S	S	S	S a R
<i>C. glabrata</i>	S-DD a R	S-DD a R	S-DD a R	S-DD a R	S	S a I	S
<i>C. krusei</i>	R	S-DD a R	S	S	I a R	S a I	S
<i>C. lusitanae</i>	S	S	S	S	S	S a R	S

NOTA. I, intermedicamente susceptible; R, resistente; S, susceptible; S-DD; susceptible dependiente de la dosis. La resistencia a las equinocandinas en las cepas aisladas de *C. parapsilosis* es poco frecuente.

(Pappas, 2009)

24.13 Anexo 13. Susceptibilidad de antimicóticos de referencia marca ® HIMEDIA

➤ Anfotericina B ® HIMEDIA (100 unidades/disco)

Organismos (ATCC)	Std. Zona de diámetro (mm)
<i>Candida albicans</i> (90028)*	10-17
<i>Candida parapsilosis</i> (22019)*	11-20
<i>Candida tropicalis</i> (750)*	8-12
<i>Candida krusei</i> (6528)*	9-14
<i>Candida albicans</i> (10231)	10-18

* = Q.C. Las cepas de CLSI

➤ Fluconazol ® HIMEDIA (25 mcg/disco)

Agente antimicrobiano	Interpretación por criterio	Resistencia mm o menos	S-DD (mm)	S mm o menos
Fluconazol 25 mcg	<i>Candida spp</i> s	14	15-18	19

S-DD = Susceptible - dependiente de la dosis

24.14 Anexo 14: Conservación de levaduras y medios de cultivo

<p>Agar Dextrosa Sabouraud ® MCD - LAB Fórmula aproximada* por litro de agua destilada</p> <p>Dextrosa 40.0 g Digerido pancreático de caseína 5.0 g Digerido péptico de tejido animal 5.0 g Agar bacteriológico..... 15.0 g pH 7.3 ± 0.2</p>	<p>Agar Soya Trypticaseína ® BIOXON Fórmula aproximada* por litro de agua destilada</p> <p>Peptona de caseína..... 15.0 g Peptona de soya..... 5.0 g Cloruro de sodio..... 5.0 g Agar..... 15.0 g pH 7.3 ± 0.2</p>
<p>CHROMagar Candida ® Becton, Dickinson Fórmula aproximada* por litro de agua destilada</p> <p>Cromopeptona..... 10.0 g Glucosa..... 2.0 g Mezcla cromógena..... 2.0 g Cloranfenicol..... 0.5 g Agar..... 15.0 g pH 5.9 ± 0.2</p>	<p>Agar Biggy ® BIOXON Fórmula aproximada* por litro de agua destilada</p> <p>Citrato de amonio y bismuto..... 5.0 g Sulfito de sodio..... 3.0 g Dextrosa..... 10.0 g Glicina..... 10.0 g Extracto de levadura..... 1.0 g Agar (desechado)..... 16.0 g pH 6.8 ± 0.2</p>
<p>Agar Mueller – Hinton ® DIBICO Agar..... 17.0 g Almidón.....1.50 g Infusión de carne de res..... 3.0 g Peptona de Caseína acida17.50 g pH 7.3 ± 0.1</p>	<p>D (+) – Glucosa (Monohidratada) ® MERCK Metales pesados (como Pb)..... 0.001 % Maltosa (DC)..... 0.2 % Agua..... 8 – 10 %</p>

24.15 Anexo 15: Disposición de residuos

R1: Medios de cultivo y materiales desechables

Inactivar el material por medio del calor húmedo en bolsas bien cerradas, utilizando autoclave, sometiendo los materiales a 121 °C con 15 libras de presión durante 40 min (cajas de Petri y otros dispositivos de plástico no reusables quedaran “derretidos” desechar en la basura municipal en una bolsa de plástico la canela molida.

R2: Recuperar Acetato de Etilo no contaminado de residuos biológicos

Separar el acetato de etilo del aceite esencial a través de un recuperador de solventes y resguardar en un frasco ambar con la finalidad de que se pueda reutilizar en alguna otra experimentación.

R3: Material de laboratorio contaminado con muestra biológica (Puntas, hisopos, tubos de ensaye)

Colocar durante 1 hora en un recipiente con benzal al 1 %, posteriormente inactivar el material por medio de calor húmedo en bolsas bien cerradas, utilizando el autoclave, sometiendo los materiales a 121 °C con 15 libras de presión durante 15 minutos, transferir el material a un recipiente con hipoclorito de sodio durante 1 hora, lavar finalmente con detergente y almacenarlo (puntas y tubos de ensayo), desechar en la basura municipal hisopos en bolsa cerrada.

R4: Material desechable no contaminado de residuos biológicos (guantes y servitoallas)

Desechar material en bolsa negra en la basura municipal.