



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

INHIBICIÓN DE *Candida albicans* MEDIANTE
EXTRACTOS NATURALES.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

EDGAR NOE FLORES CERVANTES

TUTORA: Dra. LIA ALIOTH HOZ RODRÍGUEZ

ASESOR: Dr. ENRIQUE ROMO ARÉVALO



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.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por su paciencia para para formarme personal y profesionalmente

Al Programa de Apoyo a proyectos de investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM y proyecto IA203518 y IA202618.

Al Dr. Higinio Arzate por permitirme entrar al Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados y brindar la confianza para hacer uso de las instalaciones, del equipo. Y a sus integrantes: María de Jesús Salinas Nájera, El Dr. Mikado Nidome, la M. en C. Sonia López Letayf, la Dra. Rita Arroyo Cruz, el Dr. Gonzalo Montoya Ayala, la Dra. Claudia Patricia Pedraza Zamora, a Dina Avendaño, Kevin López Barrios y Ali Sosa.

A la Dra. Lia Alioth Hoz Rodríguez por su apoyo incondicional.

Al Dr. Enrique Romo Arévalo por su apoyo científico durante la realización de este trabajo.

A todo el personal de la Facultad de Odontología que me apoyaron en todo momento.

A mis amigos con los que formo un equipo dentro y fuera de la clínica: Arturo Lagunes, Alejandro Ávila, Eduardo Galván, Miguel Ornelas, Luis Nava, Eduardo Montoya, Carlos Venegas, Francisco Lina, Rodrigo García, Alejandro González, Adelfo Estrada, Arturo Carranza, Pedro Ortiz, Rodrigo García.

A mi mamá

Dedicatorias:

Dedico este trabajo a mi hermana **Janet S. Flores Cervantes.**

Índice

I.	Resumen.....	1
II.	Marco teórico.....	3
	2.1 <i>Candida albicans</i>	3
	2.1.1 Genero <i>Candida</i>	3
	2.1.2 Taxonomía del género <i>Candida</i>	4
	2.1.3 Estructura y morfología.....	4
	2.1.4 Factores de patogenicidad.....	5
	2.1.5 Importancia en cavidad bucal.....	5
	2.1.6 Resistencia a antimicrobianos, a antifúngicos en específico.....	5
	2.2 Generalidades de Candidosis.....	6
	2.3 Cultivo.....	7
	2.3.1 Cultivo en Placa.....	7
	2.3.2 Medios de cultivo para <i>Candida albicans</i>	7
	2.3.3 Técnica de estriado en placa.....	8
	2.4 Extractos de Aceites Esenciales.....	8
	2.4.1 Composición.....	9
	2.4.2 Propiedades esenciales de los Aceites Esenciales.....	9
	2.4.3 Uso como antimicrobianos.....	10
	2.5 Aceite esencial de Menta.....	10
	2.5.1 Composición de aceites esenciales de menta.....	11
	2.5.2 Uso como antifúngico.....	11
	2.6 Extracto de semillas cítricas.....	12
	2.6.1 Composición de los extractos cítricos.....	12
	2.6.2 Uso como antimicrobianos.....	12
	2.7 Concentración Mínima Inhibitoria.....	13
	2.8 Fluconazol.....	13
III.	Planteamiento del problema.....	14
	3.1 Pregunta de investigación	14
IV.	Justificación.....	14
V.	Objetivos.....	15
	5.1 Objetivos generales.....	15

	5.2 Objetivos específicos.....	15
VI.	Hipótesis.....	15
VII.	Metodología.....	16
	7.1 Material para cultivo microbiológico.....	16
	7.2 Microorganismo y soluciones experimentales.....	16
	7.3 Preparación de medio de cultivo.....	17
	7.4 Obtención de Cepa de <i>Candida albicans</i>	17
	7.5 Obtención de los aceites esenciales.....	17
	7.6 Preparación de las disoluciones.....	17
VIII.	Resultados	20
IX.	Discusión.....	35
X.	Conclusiones.....	36
XI.	Referencias Bibliográficas.....	37

I. Resumen

Introducción: Dentro de la microbiota humana y en específico en la cavidad bucal podemos encontrar a *Candida albicans* como uno de los microorganismos residentes; también presente en otras zonas del cuerpo como por ejemplo tracto vaginal. Tiene la capacidad de generar (candidiasis) en las circunstancias adecuadas, principalmente en pacientes lactantes y adultos mayores desdentados, personas inmunodeprimidas y en portadores de prótesis bucales y catéteres médicos, entre otros. Es considerada como un hongo oportunista, aerobio facultativo.

Objetivo: Comprobar el efecto inhibitorio del aceite esencial de menta y de un desinfectante comercial a base del extracto de semillas cítricas sobre el crecimiento de *C. albicans*.

Metodología: Se sembraron 100 microlitros de una solución de la sepa de *C. albicans* ATCC40028 (O.D. 1 a 600 nm) sobre placas de agar dextrosa Sabouraud y posteriormente se colocaron discos de papel filtro estériles de 3.5 mm impregnados con aceite esencial de menta y desinfectante de semillas de cítricos utilizando diferentes concentraciones. Las placas de agar con el microorganismo y los discos con las soluciones se incubaron durante 24 horas a 37°C. El experimento se realizó en tres ocasiones diferentes. La primera como una prueba piloto para determinar que los extractos cuentan con propiedades inhibitorias para el crecimiento de *C. albicans*, la segunda vez con el objetivo de corroborar lo observado en la prueba piloto y en la tercera prueba se busca establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se observaron las placas bajo el microscopio estereoscópico y la imagen completa mediante fotografías con cámara réflex.

Resultados: Tanto el aceite esencial de menta como el desinfectante natural a base de semillas de cítricos mostraron efectividad contra el crecimiento de *Candida albicans*. Las concentraciones que mostraron la formación de halos de inhibición más grandes fueron menta al 100% y para el desinfectante cítrico fue de 0.20%. Se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 0.10% para el extracto de semillas cítricas y del 25% para el aceite esencial de menta.

Se usó un microscopio óptico Carl ZEISS con un lente de 40x para observar las biopelículas formadas por *C. albicans* compuesta por una red polimórfica de tipos celulares múltiples tales como células redondas u ovaladas de levaduras y células de posibles pseudohifas. Se observó una red compleja de microcolonias formando una matriz celular madura limitada por halos de inhibición.

Conclusiones: El efecto inhibitorio del extracto de semillas cítricas y del aceite esencial de menta muestra ser efectivo para inhibir el crecimiento de *C. albicans*, estos resultados pueden ayudar a desarrollar un protocolo de mantenimiento de las prótesis dentales, prótesis auriculares así como ser un método antiséptico.

II. Marco teórico

2.1. *Candida albicans*

Candida albicans es una levadura de la clase de los hemiascomicetos. Forma parte de la microbiota de los seres humanos así como de algunos animales; bajo ciertas circunstancias puede generar candidiasis por lo que se le considera un microorganismo oportunista. La especie se considera parte de la microbiota normal en seres humanos. Sin embargo, cuando ocurre un cambio en las condiciones normales del huésped, se denomina patógeno oportunista; alrededor del 78% de las infecciones a nivel nosocomial es el principal agente etiológico y se encuentra en un 10% dentro de las infecciones por otras patologías no asociadas a este hongo¹.

2.1.1. Género *Candida*

El género *Candida* son levaduras con ausencia de pigmento capaz de producir pseudomicelio, excepto *C. tropicalis* que sí produce un micelio verdadero. *Candida* es un microorganismo unicelular globoso u ovoide, de 3 a 7 μm y que forma yemas gemantes², incluye un variado número de especies cerca de 200, pero solo 58 son oportunistas en animales y humanos, de éstas, 6-8 especies son las que presentan más infecciones humanas sobresaliendo *Candida albicans*².

2.1.2. Taxonomía del género *Candida*.

Clase	<i>Ascomycetes</i>
Subclase	<i>Hemiascomycetes</i>
Orden	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetes</i>
Género	<i>Pichia, hansenula, arxiozyma</i> (estados telemórficos)
Especies	A los estados anamórficos se les denomina <i>Candida</i> y los ejemplos más importantes son: <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapsilosis</i> (<i>sensu stricto</i>), <i>C. orthopsilosis</i> , <i>C. metapsilosis</i> y <i>C. dubliniensis</i> Las especies de <i>Candida</i> reportadas con menor frecuencia son <i>C. ciferri</i> , <i>C. kefyri</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. norvegensis</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. Zeylanoides</i> , entre otras

(Cuadro 23.4 Taxonomía del género *Candida*)³.

2.1.3. Estructura y morfología

Son levaduras con ausencia de pigmentos, forma celular variable, es decir, las células pueden ser elípticas, globosas, cilíndricas y triangulares de 3-6 μm ; tiene pared celular con dos capas; su reproducción es por gemación y pueden formar pseudohifas³.

C. albicans es de forma oval posee un diámetro de 3-6 μm y su reproducción es a través de blastoconidios, dando colonias blanquecinas y lisas¹.

2.1.4. Factores de patogenicidad

Es necesaria la presencia de factores oportunistas para que se desarrolle una candidiasis. Los factores de oportunismo para una micosis/infección endógena propiamente son cambios tópicos, variación en el pH, aumento de nutrientes, disminución de bacterias comensales o bien debido a una respuesta inmune inadecuada.

Los factores de oportunismo para una micosis/infección exógena son dependientes de un inoculo grande como sondas, catéteres, agujas, respiradores artificiales.

2.1.5. Importancia en cavidad bucal

La cavidad oral humana normalmente esta colonizada por un rango amplio de microorganismos incluyendo bacterias, hongos, archaeas, protozoarios y virus.

Candida albicans forma parte del microbioma residente de la cavidad bucal y normalmente no produce daño excepto que se presente la oportunidad, que puede ser dada por factores endógenos o exógenos.

Varios estudios han demostrado que algunas bacterias orales que se adhieren a *C. albicans* pueden modular su patogenicidad ya que la presencia de *C. albicans* puede influir en su comportamiento bacteriano.

2.1.6. Resistencia a antimicrobianos, a antifúngicos en específico

El tratamiento puede ser tópico o sistémico según la forma clínica que se trate, de los tópicos tenemos la nistatina, ketoconazol, miconazol, clotrimasol, sulconazol, bifonazol, isoconazol; de los sistémicos anfotericina B, ketoconazol, fluconazol e itraconazol. En general corregir los factores de oportunismo que favorecieron para que se instalará *Candida*². Los antifúngicos atacan la pared celular, que es la cubierta exterior de la

levadura, es una estructura de 100 a 200 nm de espesor, que constituye el 25% de la masa seca de la levadura, protege a la célula de ataques enzimáticos, proporcionando estructura, sostén, soporte mecánico y forma a la célula⁴. Está compuesta por cuatro principales moléculas: β -1,3-glucano, β -1,6-glucano, manoproteínas y quitina⁴. Siendo la β -1,3-glucano uno de los dos objetivos en específicos de los antimicóticos actualmente, el otro es la biosíntesis de ergosterol en la membrana celular o plasmática que es una bicapa lipídica, en la cual se anclan las proteínas, que pueden tener diversas funciones. Como el anclaje del citoesqueleto, la síntesis de la pared celular⁵ entre otras.

2.2. Generalidades de Candidiasis

La candidiasis es un padecimiento cosmopolita sin predilección de edad o sexo² es producida por hongos que en condiciones normales no generan enfermedad. Para que exista una micosis por hongos patógenos oportunistas se deben presentar condiciones apropiadas, tanto del hospedero como del hongo mismo, estas pueden ser: un desequilibrio en el microbioma bucal por cambios en el pH o un acúmulo de nutrientes, una disminución de bacterias por el uso de antibióticos que favorezca al incremento de levaduras; o bien por una enfermedad o proceso debilitante como diabetes, tuberculosis, hepatitis³.

Los hongos son organismos eucariontes con núcleos organizados cuya membrana nuclear está bien definida; son aerobios, heterótrofos y en general no motiles³. Las levaduras con células esféricas u ovals unicelulares con un diámetro de 5-7 μm aproximadamente. En ocasiones las levaduras y su progenie se adhieren entre sí para formar cadenas o "seudohifas"⁶.

2.3. Cultivo

Un material nutritivo preparado para el crecimiento y multiplicación de un microorganismo en un laboratorio se denomina medio de cultivo⁷.

2.3.1. Cultivo en placa

Todas las muestras se cultivan en medios para hongos o bacterias, a temperatura ambiental o a 37°C. Las colonias de levaduras se estudian en busca de pseudohifas. *C. albicans* se identifica por la producción de tubos germinativos o clamidoesporas⁸.

A diferencia de las células en medio líquido, las células en un medio de gel se encuentran inmóviles. Por lo tanto si se colocan pocas células cada célula prolifera en una colonia aislada. El material ideal para la formación de gel para la mayor parte de los medios de cultivo microbiológico es el agar, un polisacárido ácido extraído de ciertas algas rojas, para prepararlo se usa una suspensión de 1.5 a 2% en agua, se disuelve a 100°C, posteriormente se pone a enfriar a temperatura ambiente, el medio puede soportar hasta -50°C³.

2.3.2. Medios de cultivo para *Candida albicans*

Las diversas especies de *Candida* crecen en la mayor parte de medios de cultivo habituales, como son: Sabouraud dextrosa agar, gelosa sangre, infusión de cerebro, corazón y extracto de levadura agar. Es importante saber que *C. albicans* y *C. dubliniensis* crecen en los medios de Sabouraud dextrosa agar más antibióticos³.

2.3.3. Técnica de estriado en placa

Este método consiste en crear estrías de la suspensión original de la cepa de *C. albicans* sobre una placa de agar con un asa bacteriológica o un hisopó estéril, conforme se hacen las estrías, cada vez queda menor número de células⁸.

2.4. Extractos de aceites esenciales

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes, principios activos y aditivos)⁹.

Son llamados así los constituyentes odoríferos o “esencias” de una planta. El termino aceite, se origina del hecho que el aroma de una planta existe en las glándulas o entre las células en forma líquida el cual al igual que los aceites grasos son inmiscibles con el agua^{10, 11}.

Los aceites esenciales son compuestos de naturaleza compleja formados por varias sustancias orgánicas volátiles, solubles en solventes orgánicos no polares, su densidad es generalmente menor a la del agua, con olor característico fuerte y son sintetizados por los distintos órganos de las plantas: semillas, flores, hojas, tallos, raíces y ramas, y se almacenan en canales, células epidérmicas o en tricomas glandulares para su posterior secreción. Los aceites esenciales pueden ser alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos. Su presión de vapor es suficientemente alta para volatilizarse a temperatura ambiente^{12, 13}.

Los aceites esenciales son mezclas homogéneas de compuestos químicos orgánicos, constituidos principalmente por terpenoides. En condiciones ambientales, son líquidos menos densos y más viscosos que el agua y poseen un color amarillo hasta ser transparentes en algunos casos. Sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes¹⁴.

2.4.1. Composición

Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastres con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas⁹.

Los aceites esenciales de menta son sustancias lipofílicas químicamente formadas por monoterpenos y algunos sesquiterpenos y compuestos aromáticos¹⁰ como fenilpropanos.

Los compuestos más activos derivan biológicamente del ácido mevalónico y se les cataloga como terpenos, siendo los más abundantes los monoterpenos y los sesquiterpenos¹⁵. Los perfumes de muchas plantas provienen de compuestos volátiles llamados terpenos que se forman a partir del isopentilpirofosfato, por ejemplo, el limoneno que procede del aceite de limón, el mirceno que procede de las hojas de laurel, algunos terpenos como el geraniol del geranio y el mentol del aceite de menta, son alcoholes y otros como el citronelal que procede del aceite de citronela son aldehídos¹⁶.

2.4.2. Propiedades generales de los aceites esenciales:

- Líquidos a temperatura ambiente
- Volátiles
- Aromáticos
- Incoloros o amarillentos
- Menos densos que el agua
- Insoluble en agua
- Lipófilos
- Solubles en disolventes orgánicos
- Solubles en alcoholes de alta concentración
- Índice de refracción elevado
- Extraíbles por arrastre de vapor de agua o expresión
- Poder rotatorio (quirales)¹⁷

2.4.3. Uso como antimicrobianos

La acción de los aceites esenciales sobre los dermatofitos es destruir la pared celular y la membrana citoplasmática; lo cual resulta en un rompimiento de citoplasma y su coagulación^{18, 19}.

Se ha probado que los terpenos, son los principales responsables de la actividad microbiana está basado en su habilidad para dañar las biomembranas. En función de sus características lipofílicas interactúan con las enzimas de la membrana e interfieren procesos vitales como la osmosis, la síntesis de esteroides y fosfolípidos²⁰.

2.5 Aceite esencial de Menta

La clasificación del género *Mentha* fue publicada hace más de un siglo por Briquet (1896), quien definió 17 especies y 33 subespecies dentro de dos géneros (*Mentha* y *Preslia*), dos subgéneros, cinco secciones y siete subsecciones²¹.

2.5.1 Composición de aceites esenciales del extracto de menta

El compuesto aislado del aceite esencial de menta es el Mentol y se ha probado su actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*. El efecto más alto se observó contra el *S. mutans*. Además el mentol logró una actividad antifúngica considerable contra la levadura *C. albicans*, la zona de rango de inhibición fue de 7.1 mm a 18.5 de diámetro²¹.

El mentol es un sólido cristalino (alcohol/monoterpeno) que funde alrededor de los 40°C y que se emplea mucho en medicina y farmacia porque es oloroso y por sus propiedades curativas; este se obtiene sintéticamente a partir de la planta de menta (*Mentha piperita*) la cual pertenece a la familia de las Labiadas y es originaria de las regiones Asiáticas como la Antigua Mesopotamia y se cultiva bastante en Alemania, Francia, Inglaterra, Rusia, India, Japón. El origen de su nombre deriva del nombre de la ninfa griega –*Mintha* y del latín –*piper* que significa “pimienta” y se refiere al sabor picante particular de esta planta²².

2.5.2. Uso como antifúngico

El aceite de menta es eficaz para inhibir el crecimiento de los hongos patógenos *Pythium sp.* y *Fusarium sulphureum*. Anteriormente en un estudio sobre las propiedades antimicóticas del aceite de menta demostró actividad contra una serie de levaduras que deterioran los alimentos. El aceite de menta causa retraso en la aparición de pseudomicelio. En un ensayo anterior se ilustra el efecto antifúngico *in vitro* del aceite de menta, en varios hongos patógenos aislados de pollos muertos, para la industria avícola. En un breve informe sobre la bioactividad del aceite de menta, mostraron que las bacterias Gram-positivas fueron significativamente más inhibidas que los organismos Gram-negativos. El aceite de menta se usó

en una serie de experimentos para demostrar la acción antifúngica contra *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* y *Cladosporium sp.*, *A niger*, *Mucor sp.*, *Penicillium crysogenum* y *Rhizopus sp.*, los resultados demostraron una adecuada eficacia contra estos microorganismos.

Se descubrió que la menta japonesa, conocida también como la menta de maíz, es un agente antimicótico eficaz cuando se usa con los patógenos humanos *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *Sporothrix schenckii*²¹.

2.6 Extracto de semillas cítricas

Los desinfectantes a diferencia de los antisépticos son sustancias que solo se aplica sobre superficies inertes u objetos inanimados ya que puede dañar la piel y otros tejidos. El desinfectante usado en este experimento es El desinfectante a base de extracto de semillas cítricas (Members Mark QUALITY GUARANTEED®)

2.6.1 Composición del extracto de semillas cítricas

Es un desinfectante natural hecho a base de extractos de semillas de cítricas al 0.20%.

2.6.2 Uso como antimicrobiano

En estudios anteriores se han evaluado los aceites aromáticos, también llamados volátiles o esenciales, que son sustancias obtenidas a partir de flores, hojas, semillas, raíces y otros componentes de plantas como la naranja, el limón, la canela. La hidrofobicidad es una característica importante de estos compuestos

ya que les permite insertarse entre los lípidos de la membrana citoplasmática bacteriana donde la alteración de su permeabilidad provoca la salida de moléculas muy importantes y de iones, provocando así la muerte del microorganismo.

Desinfecta frutas, verduras, carnes (pollo, mariscos y carnes rojas) y utensilios. Elimina bacterias, virus, hongos y esporas.

2.7 Concentración inhibitoria mínima (MIC)

Mide la habilidad de un microorganismo para proliferar en caldo de cultivo en presencia de diversas diluciones de antibióticos²³. Se define como la concentración más baja de aceites y extracto que inhibe el crecimiento de un microorganismo.

2.8 Fluconazol

Molécula. Ditriazol, altamente soluble en agua. Mecanismo de acción. Fungistático. A nivel de la membrana celular, su mecanismo de acción es igual al de todos los triazólicos³ Se ha reportado resistencia con ciertas especies de *Candida*, como *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* y algunas cepas de *C. albicans*³.

III. Planteamiento del problema

Candida albicans es una levadura patógena oportunista que desencadena un proceso infeccioso llamado candidiasis en pacientes inmunocomprometidos y/o portadores de prótesis bucales totales. Este hongo bajo ciertas circunstancias (tratamiento antimicótico incorrecto, lesiones recurrentes e infecciones crónicas agravadas con otros hongos) puede generar resistencia a los antimicóticos convencionales y comprometer la salud del paciente.

3.1 Pregunta de investigación

¿Los aceites esenciales de extracto de semillas cítricas y de menta son capaces de inhibir el crecimiento de cepas de *Candida albicans in vitro* a 24 horas?

IV. Justificación

Es importante estudiar nuevas alternativas para inhibir y controlar el crecimiento de *C. albicans* sin que generen resistencia a los tratamientos antimicóticos convencionales, que estos puedan ser coadyuvantes efectivos del tratamiento antimicótico y que puedan ser empleados de manera rutinaria en las prótesis totales para apoyar al paciente a mantener una adecuada calidad de salud libre de la posibilidad de desarrollar candidiasis.

V. Objetivos

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de menta y de un desinfectante a base de extracto de semillas cítricas sobre el crecimiento de una cepa de *C. albicans in vitro*.

5.2 Objetivos Específicos

Evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial de menta a concentraciones del 100%, 50% y 25% en placas de agar con *C. albicans* por 24 horas *in vitro*.

Evaluar la actividad antifúngica del desinfectante natural a base del extracto de semillas cítricas a concentraciones del 0.2%, 0.1% y 0.05% en placas de agar con *C. albicans* por 24 horas *in vitro*.

Determinar la concentración mínima inhibitoria de ambas soluciones.

VI. Hipótesis

El aceite esencial de menta y el desinfectante a base de semillas cítricas tienen un efecto inhibitorio sobre *C. albicans*.

VII. Metodología

7.1 Materiales para cultivo microbiológico:

- Aza microbiológica
- Caja de Petri
- Campana de flujo laminar
- Incubadora
- Hisopo bacteriológico
- Tubos Eppendorf de 1.5ml
- Micropipetas de volumen variable
- Papel filtro
- Autoclave
- Guantes
- Balanza granataria

7.2 Microorganismo y soluciones experimentales:

- *Candida albicans* (ATCC40028)
- Extracto de menta AVANT aromatherapy MENTA aceite esencial
Mentha arvensis
- Extracto de semillas cítricas Members Mark QUALITY
GUARANTEED, DESINFECTANTE NATURAL, EXTRACTO DE
SEMILLAS CÍTRICAS DE ORIGEN BOTÁNICO.

7.3 Preparación de medios de cultivo

Se prepararon cajas de Petri con agar dextrosa Sabouraud.

Procedimiento: se prepararon 150 ml del medio de cultivo, se pesaron 4.5 gramos de agar dextrosa Sabouraud 150 ml de agua esterilizado por autoclave durante 20 minutos posteriormente se dejó enfriar y se colocó una porción de la solución en cada caja de Petri donde se dejó gelificar a temperatura ambiente.

7.4 Obtención de la cepa de *C. albicans*

Las cepas de *C. albicans* ATCC40028 fue donada por el Laboratorio de Investigación en Virología del INER, se utilizó una solución previamente ajustada de dicho microorganismo a una densidad óptica de 1 a 600 nm, la cual se encontraba en criopreservación a -80°C. De dicha solución se tomaron 100 µl para realizar el sembrado por estría triple en las placas de agar.

7.5 Obtención de aceites esenciales

El extracto de menta así como el extracto de semillas cítricas son de uso comercial, el extracto de menta es un ejemplar de MENTA aceite esencial, *Mentha arvensis* de la casa comercial AVANT aromatherapy (www.avantaromaterapia.com) y el desinfectante cítrico.

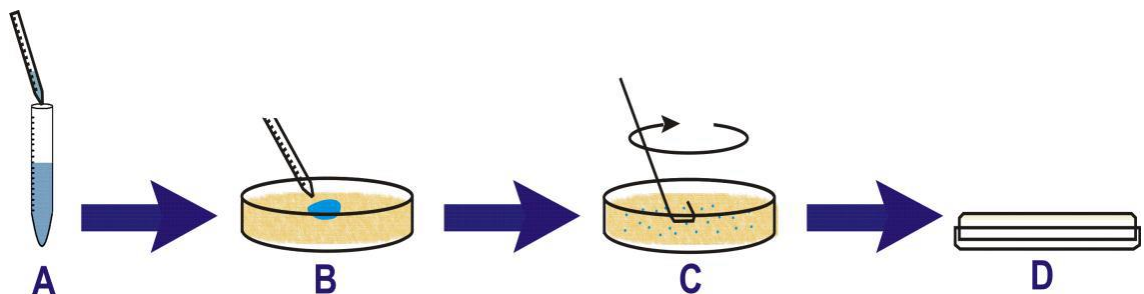
7.6 Preparación de las disoluciones

Se prepararon disoluciones de 300 µl de cada extracto en tubos Eppendorf de 1.5 ml, se preparó un tubo con 300 µl de extracto de menta sin alterar y un tubo con 300 µl de extracto de semillas cítricas. También se preparó una

disolución de extracto de menta al 50% con 150 μl de agua y 150 μl de extracto de menta, se preparó una disolución de extracto de menta al 25% con 225 μl de agua y 75 μl de extracto de menta. Se preparan disoluciones de extracto de semillas cítricas de la misma manera.

Con la micropipeta extraer 100 μl del inoculo en este caso la cepa de *C. albicans* (ATCC 40028) y colocarlo en una placa de agar dextrosa Sabouraud. Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril o un hisopo estéril, esparcir el inóculo de manera homogénea de derecha a izquierda de la parte superior de la placa a la parte más inferior, girar un cuarto de vuelta y esparcir.

Es importante incubar las placas en posición invertida. Se dejan durante 24 horas en una estufa a 37°C. La posición invertida evitará que el agua producto de la condensación se deposite sobre el medio de cultivo, dificultando la obtención de colonias aisladas²⁴.



(Proceso de inoculación de la cepa atcc40028 con medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud)

Se procedió a colocar sensidiscos de aceite esencial de menta al 100% y 50% en las placas de agar dextrosa Sabouraud. Se dejó incubar a 37°C durante 24 horas.

Se evaluó el crecimiento de la levadura *C. albicans* en agar dextrosa Sabouraud, *in vitro*, con respecto a los sensidiscos previamente embebidos en aceite esencial de menta y extracto de semillas cítricas a

concentraciones de 0.2% y 0.1% y 0,5% para el extracto de semillas cítricas y de 100%, 50% y 25% para el extracto de menta.

Se determinó el efecto antimicrobiano del extracto de menta y el extracto de semillas cítricas sobre el crecimiento de cepas de *C. albicans*.

Se llevó a cabo la medición del radio de inhibición de los extractos a diferentes concentraciones para comparar el halo de inhibición formado por los discos de papel filtro embebido en los respectivos extractos para determinar su acción inhibitoria.

Con el propósito de determinar la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales el experimento se realizó de nuevo teniendo ahora en los tubos Eppendorf para el aceite esencial de menta una concentración máxima del 0.20% y 0.10%. Mientras que para el aceite esencial de menta se manejaron concentraciones del 25%, 12% y del 6%. Se embebieron los sensidiscos y se llevaron a la incubadora durante 24 horas

VIII. Resultados:

24 horas después de llevar las placas a la incubadora, podemos observar el efecto antifúngico mediante las siguientes fotografías:

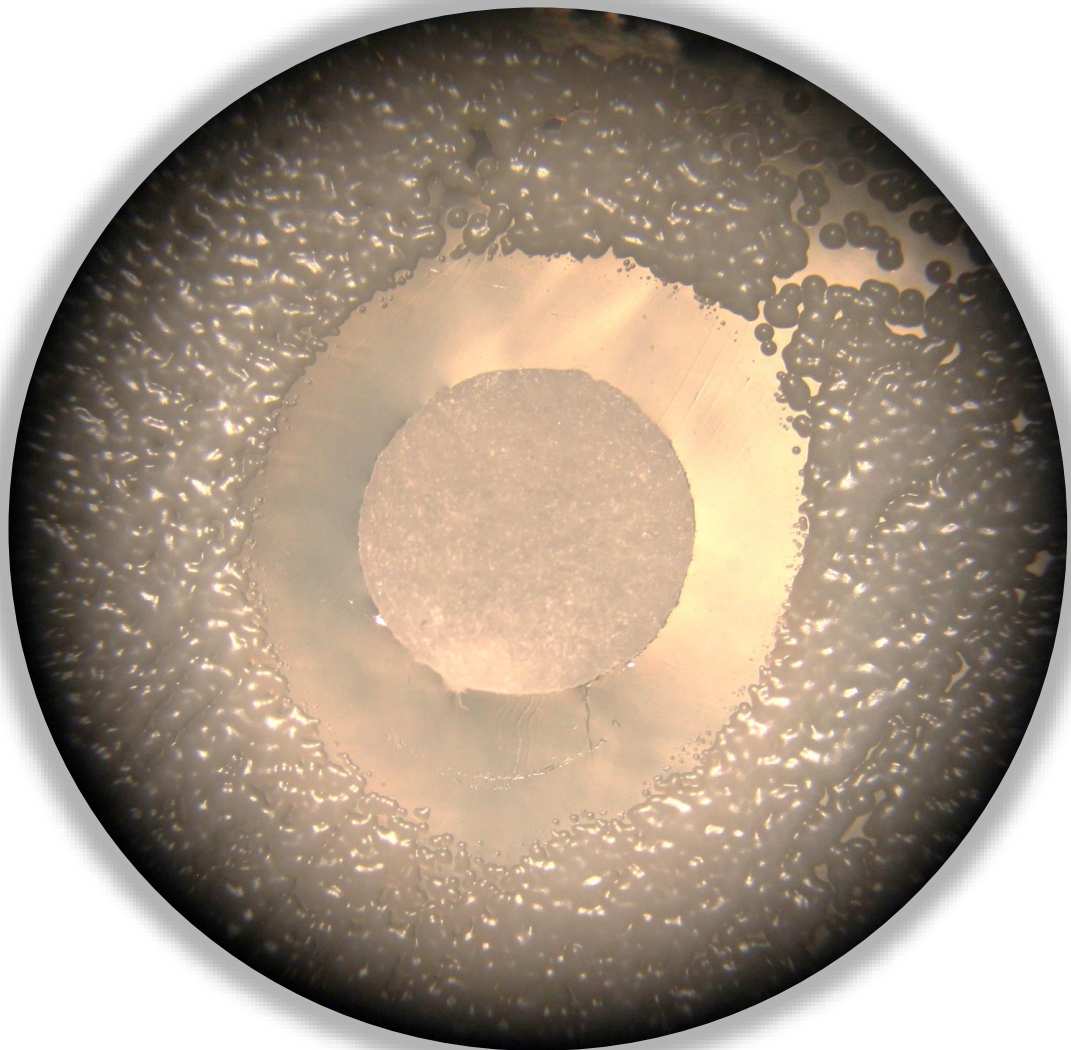


Figura 1. Fotomicrografía en la que se observa la forma, color y textura de *C. albicans*.

Pudimos observar colonias de *C. albicans* posterior a la incubación por sus características de crecimiento como: ovaladas, circulares, convexas, húmedas, elevadas, opacas, de color blanco cremoso/ blanquecino, de textura lisa y limitadas. Microscópicamente presentaron típicas formas de

levaduras ovoides. Observamos halos de inhibición de diferentes diámetros dependiendo del extracto natural que usamos.



Figura 2. Fotomicrografía de cultivo de *C. albicans* en medio agar dextrosa Sabouraud donde se colocaron discos con la solución del extracto de semillas cítricas a concentraciones de 0.10% y 0.20%.

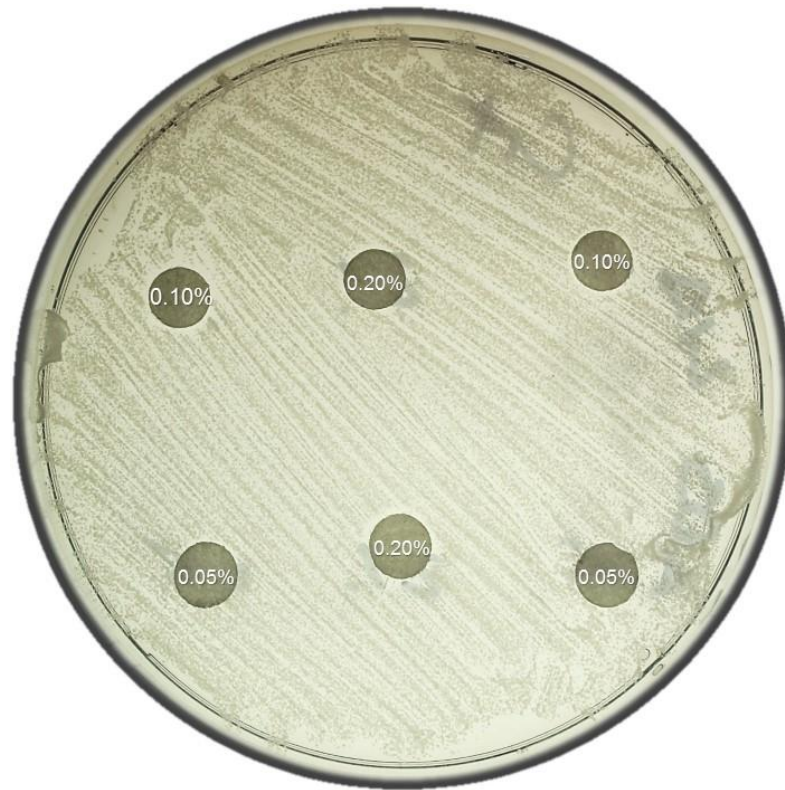


Figura 3. Fotomicrografía de cultivo de *C. albicans* en medio de agar dextrosa Sabouraud para determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto de semillas cítricas. Discos con concentraciones de 0.20%, 0.10% y 0.05%.

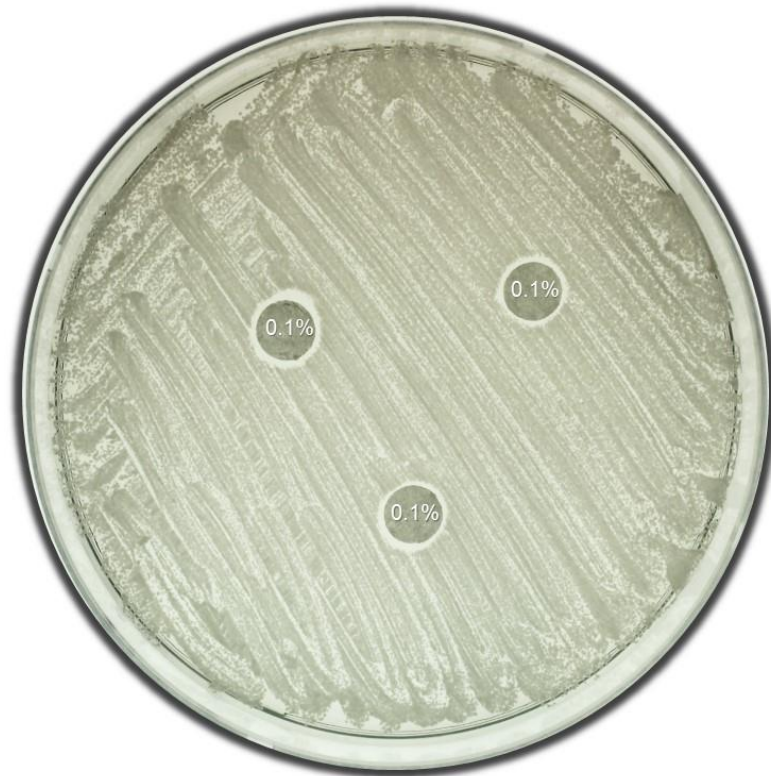


Figura 4. Fotomicrografía de cultivo de *C. albicans* en medio de agar dextrosa Sabouraud, se observar la prueba de extracto de semillas cítricas para determinar la CMI.

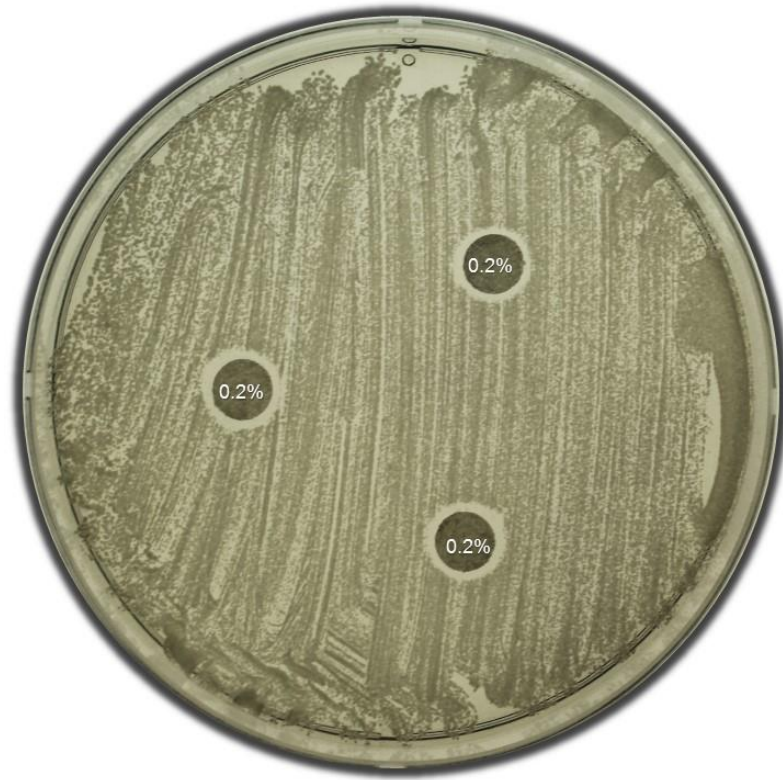


Figura 5. Fotomicrografía de cultivo de *C. albicans* en medio de agar dextrosa Sabouraud, se observa la prueba de extracto de semillas cítricas para determinar la CMI.



Figura 6. Fotomicrografía de cultivo de *C. albicans* en agar dextrosa Sabouraud, se observa la prueba de la actividad antifúngica del fluconazol.



Figura 7. Fotomicrografía de cultivo de *C. albicans* en agar dextrosa Sabouraud, se observa la prueba de aceites esencial de Menta.

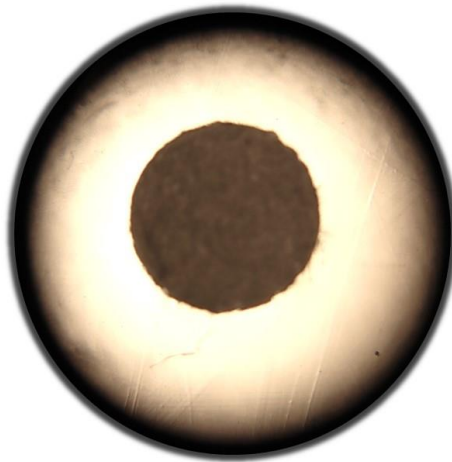


Figura 8. Fotomicrografía del sensidisco con aceite esencial de menta al 100%.



Figura 9. Fotomicrografía del sensidisco con aceite esencial de menta al 50%.



Ilustración 10. Fotomicrografía del sensidisco con aceite esencial de menta al 25%.



Figura 11. Fotomicrografía de cultivo de *C. albicans* en medio agar dextrosa Sabouraud, se observa la prueba para determinar la CMI del aceite esencial de menta. Discos con concentraciones de 25%, 12.5%, 6%, 3%, 0.2%, 0.1%.



Figura 12. Fotomicrografía de cultivo de *C. albicans* en medio agar dextrosa Sabouraud, se observa la prueba final para determinar la CMI del aceite esencial de menta (Experimento 1)

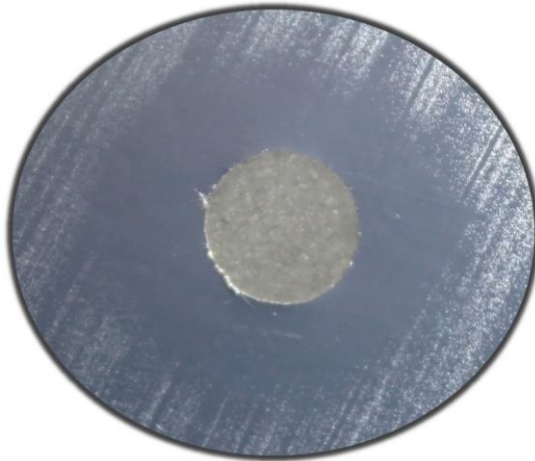


Figura 13. Fotomicrografía del sensidisco con aceite esencial de menta al 25% (Experimento 1)

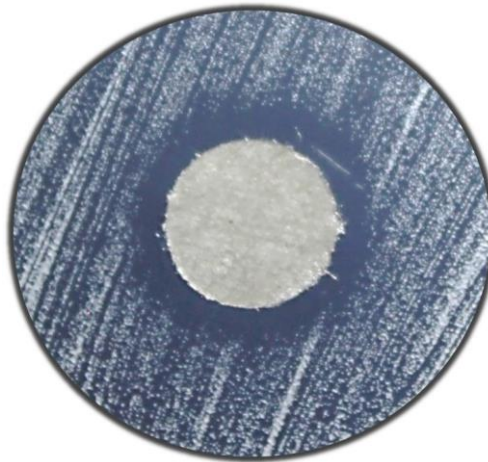


Figura 14. Fotomicrografía del sensidisco con aceite esencial de menta al 12%(Experimento 1)

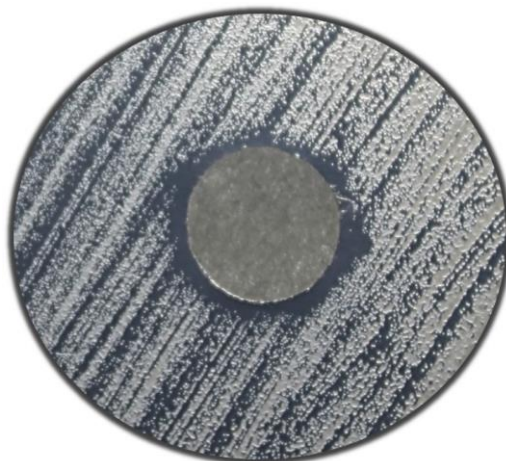


Figura 15. Fotomicrografía del sensidisco con aceite esencial de menta al 6% (Experimento1)



Figura 16. Fotomicrografía de cultivo de *C. albicans* en medio agar dextrosa Sabouraud, se observa la prueba para determinar la CMI del aceite esencial de menta. (Experimento 2)

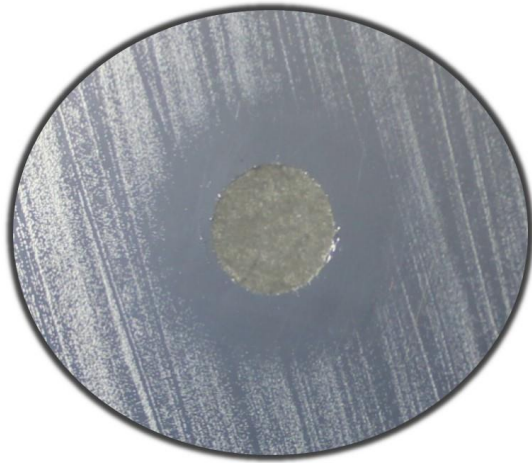


Figura 17. Fotomicrografía del sensidisco con aceite esencial de menta al 25%. (Experimento 2)

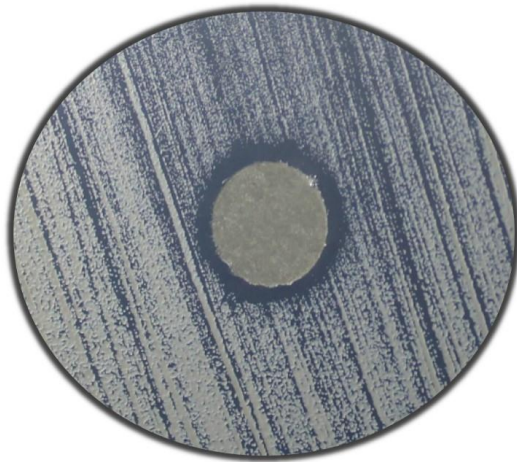


Figura 18. Fotomicrografía del sensidisco con aceite esencial de menta al 12% (Experimento 2)

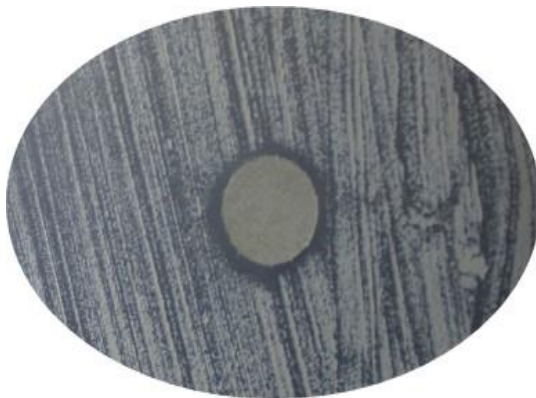


Figura 19. Fotomicrografía del sensidisco con aceite esencial de menta al 6% (Experimento 2)



Figura 20. Fotomicrografía de cultivo de *C. albicans* en medio agar dextrosa Sabouraud, se observa la prueba determinar la CMI del aceite esencial de menta. (Experimento 3)

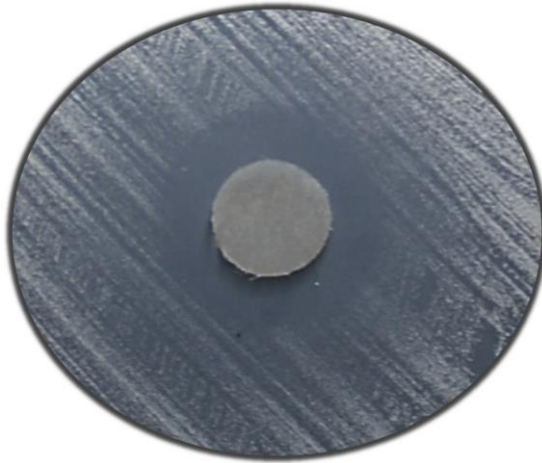


Figura 21. Fotomicrografía del sensidisco con aceite esencial de menta al 25% (Experimento 3)

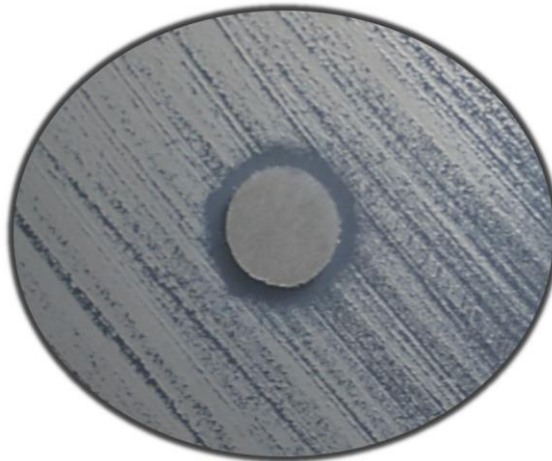


Figura 22. Fotomicrografía del sensidisco con aceite esencial de menta al 12% (Experimento 3)



Figura 23. Fotomicrografía del sensidisco con aceite esencial de menta al 6%. (Experimento 3)

IX. Discusión:

En contraste con otros experimentos respecto al efecto antimicrobiano de los aceites esenciales y sus compuestos que han sido estudiados en ensayos de inhibición de crecimiento de hongos y bacterias anteriormente que dieron como resultado un efecto fungicida y fungistático, en el presente estudio se demostró que el aceite esencial de menta así como el desinfectante comercial a base de semillas cítricas pueden ser una opción viable para el control y/o tratamiento de un cuadro de candidiasis por *C. albicans*.

En los últimos años ha crecido el interés por desarrollar nuevas alternativas para el control y tratamiento de hongos por medio de productos naturales, hasta el momento solo se había reportado la actividad antimicrobiana del aceite esencial de menta y del extracto de semillas cítricas de manera general, incluso se han realizado experimentos para probar la eficacia de estos agentes sobre diferentes especies de *Candida*. El presente trabajo se ha enfocado en probar la actividad antifúngica de dichas sustancias y se ha llevado a cabo con éxito, se demostró que pueden ser útiles en el tratamiento y control de una micosis.

Bajo las mismas condiciones *C. albicans* mostro mayor susceptibilidad al aceite esencial de menta y una menor susceptibilidad al efecto del extracto de semillas cítricas, sin embargo ambos inhibieron el crecimiento durante un periodo de 24 horas.

En una investigación que realizo el laboratorio Profeco a soluciones desinfectantes, se comprobó que la eficiencia de los desinfectantes a base de extracto de semilla cítricas en la eliminación de parásitos es nula por lo que confirma los resultados de nuestros experimentos.

X Conclusiones:

El objetivo general de evaluar el efecto antifúngico de los extractos naturales se cumplió satisfactoriamente

El aceite esencial de menta es resultado ser un excelente antifúngico ya que presenta un mayor efecto inhibitorio en comparación con el extracto de semillas cítricas.

El desinfectante comercial a base del extracto de semillas cítricas presenta una menor actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *C. albicans*.

Se logró además de probar la capacidad antifúngica determinar una concentración mínima inhibitoria para el aceite esencial de menta así como para el desinfectante a base de semillas cítricas que servirá como base para su posterior aplicación o mejora en cuestiones de investigación.

El presente estudio valida el uso del aceite esencial de menta y el desinfectante a base de extracto de semillas cítricas como coadyuvante para el tratamiento preventivo de candidiasis.

XI Referencias bibliográficas:

- 1 Dumitru, R.; Hornby, J. M.; Nickerson, K.W. Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2004**, 29, 357-370.
- 2 Roberto Arenas. Micología Medica Ilustrada, 5ª edición.
- 3 Bonifaz, Alexandro (2010). Micología Medica Básica, 5ª edición, ed. Mc Graw Hill, México, D.F.
- 4 Felmann, H. (2012). *Yeast: Molecular and Cell Biology: Second Edition*.
- 5 van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anaraku, Y., Poolman, B., & Koning, W. N. (1995). The plasma membrane of *Saccaromyces cerevisiae*: structure, function, and biogénesis. *Microbiological Reviews*, 59(2), 304-322. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7603412>
- 6 Tratado de microbiología con inclusión de Inmunología y genética molecular, 2ª edición, R.D. Davis, R. DULBECCO H. N. Eisen, H.S. GINSBERG.
- 7 Tortora, Funke, Case. Introducción a la Microbiología, 12ª edición.
- 8 Microbiología MÉDICA, Jawetz, Melnick & Adelberg, 27ª edición.
- 9 Martínez, A, *Aceites esenciales*. Universidad de Antioquia, Medellin, 2003. [34 paginas]
- 10 Lock Olga. Investigación Fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales. 2ª ed. Lima: Fondo Editorial PUCP. 1994.p. 23-34.
- 11 Domínguez X. Métodos de Investigación Fitoquímica. 3ª ed. Meéxico: Limusa S.A. 1985.p. 229-238.
- 12 Hernández, S.P. (2001). Encapsulación de aceite esencial de clavo para su aplicación en la industria alimentaria. Tesis doctoral. Facultad de ciencias de la salud, de la actividad física y del deporte. Universidad católica san Antonio Murcia.
- 13 Medina, A.M. (2011). Aceites esenciales: usos, composición química y actividades biológicas. Tesis de biología. Facultad de Estudios superiores Iztacala. UNAM. México.

- 14 Contreras puentes, E., & Ruiz Pérez, J. D. (2012). Estudio de dos métodos de extracción para el aceite esencial presente en la cáscara de Pomelo (*Citrus máxima*). Universidad de Cartagena. Recuperado a partir de <http://repositorio.unicartagena.edu.co:8080/jspui/handle/11227/108>
- 15 Valdés, R.K.C. (2014). Desarrollo de un envase activo liberador de antifúngico para el control de antracnosis en chirimoya (*Annona cherimola* Mill). Tesis de ingeniería en alimentos. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. México.
- 16 Jeremy M. Berg, *Johns Hopkins University School of Medicine.* , John L. Tymoczko *Carleton College*. Bioquímica 5ª Edición.
- 17 Kuklinski Claudia, Farmacognosia, Editorial Omega, 2003, Barcelona, España.
- 18 D. Kalemba And A. Kunicka, Intitute of General Food Chemistry, Tecnical University of Lodz, Poland Institute of Fermentation Technology & Microbiology, Technical University of Lodz, Poland. Antibacterial and Antifungal Propierties of Essential Oils Current Medical Chemistry, 2003, 10, 813-829.
- 19 Mesa Arango AC, Bueno Sánchez JG, Betancur Galvis LA. Productos naturales con actividad antimicótica. Rev Esp Quimioterap 2004: 17(4):325-331.
- 20 Montes 2009. Montes-Belmont, R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Revista mexicana de micología. 29:73-82.
- 21 Mint The Genus *Mentha*, Edited By Brian M. Lawrence, Medical and Aromatic Plants- Industrial Profiles, CRC Press, Tylor & Francis Group.
- 22 Shah, P., Jin, J., D'Mello, P., *A review of medicinal uses and pharmacological effects of Menthe piperita*. Departament of Pharmacognosy and Phytochemistry, College of Pharmacy, Mumbai, 2008. [8 Páginas]

- 23 Microbiología MÉDICA, Jawetz, Melnick & Adelberg, 27ª edición
- 24 Reduca (Biología). Serie Microbiología. 5(5):79-93,2012. ISSN1989-3620.