

---

**Universidad Autónoma de San Luis Potosí**  
**Facultad de Enfermería y Nutrición**  
**Licenciatura en Enfermería**



Tesis

Que para obtener el grado de Licenciada en Enfermería

**Presenta:**

PLESS. Díaz Palma Rosa María

**“Efecto del acetato de linalilo sobre *C. albicans*, *E. coli* y en la línea celular de Cáncer Cervicouterino *SiHa*”**

**Directora de tesis**

PhD. Gallegos García Verónica

**Asesores:**

PhD. Alcántara Quintana Luz Eugenia

PhD. Aldama Aguilera Cristóbal

PhD. Terán Figueroa Yolanda

San Luis Potosí, S.L.P., México      Junio 2018

## **Agradecimientos**

A Dios por su infinito amor y bondad hacia mí desde el primer día en este proceso de formación, por acompañarme en cada paso y en cada caída, por darme fuerzas y motivos para seguir proponiéndome nuevas metas y sobre todo por abrirme paso en este camino de bendiciones acompañada de las mejores personas. Gracias a la mujer más fuerte que conozco, por acompañarme, cuidarme, apoyarme y aconsejarme durante este proyecto, por ser un ejemplo de trabajo y esfuerzo constante, gracias a mi madre por siempre.

A mis hermanos Angélica y Adán a quienes les agradezco cada risa, cada broma y cada palabra de aliento, sin ustedes este proceso no hubiera sido divertido, gracias a mi sobrina Ximena por cada sonrisa y muestra de amor sincero, indispensables para cada uno de mis días. A mis amigos Edgar y Omar por no solamente darme lecciones científicas sino de vida.

Gracias a mi directora de tesis la Dra. Verónica, por su paciencia, apoyo y confianza durante todo el proceso, por sembrar esa motivación de alcanzar metas y continuar por el camino de la investigación, quien además de ser una excelente investigadora, profesora y coordinadora, es una persona llena de bondad y respeto.

Y gracias Luis, que confiaste en mí incondicionalmente, por estar ahí en los días buenos y permanecer en los malos, por el tiempo, el amor y la paciencia que me ofreciste en todo este andar, por esa mano y ese hombro que me levantaron y mantuvieron firme, gracias amor.



Universidad Autónoma de San Luis Potosí  
Facultad de Enfermería y Nutrición  
Licenciatura en Enfermería



**“Efecto del acetato de linalilo sobre *C. albicans*, *E. coli* y  
en la línea celular de Cáncer Cervicouterino SiHa”**

**Tesis**

Que para obtener el grado de:

**Licenciada en Enfermería**

**Presenta**

PLESS. Díaz Palma Rosa María

**Sinodales**

PhD. Paola Algara Suárez

Presidente

MSP. Pedro Reyes Laris

Secretario

PhD. Gallegos García Verónica

Vocal

San Luis Potosí, México

Junio 2018



Universidad Autónoma de San Luis Potosí  
Facultad de Enfermería y Nutrición  
Licenciatura en Enfermería



**“Efecto del acetato de linalilo sobre *C. albicans*, *E. coli* y en la línea celular de Cáncer Cervicouterino SiHa”**

**Tesis**


Que para obtener el grado de:

**Licenciada en Enfermería**


**Presenta**

PLESS. Díaz Palma Rosa María


**Directora**

  
PhD. Gallegos García Verónica

**Asesores:**

  
PhD. Alcántara Quintana Luz Eugenia

  
PhD. Aldama Aguilera Cristóbal

  
PhD. Terán Figueroa Yolanda

San Luis Potosí, México

Junio 2018

# Índice

|  |    |
|--|----|
| I. Introducción.....                       | 1  |
| II. Planteamiento del problema.....        | 4  |
| III. Pregunta de investigación.....        | 7  |
| IV. Marco teórico.....                     | 8  |
| 4.1 <i>Cándida albicans</i> .....          | 8  |
| 4.1.1 Clasificación taxonómica.....        | 8  |
| 4.1.2 Características micológicas.....     | 8  |
| 4.1.3 Candidiasis en el ser humano.....    | 9  |
| 4.2 <i>Escherichia coli</i> .....          | 10 |
| 4.3 Líneas celulares.....                  | 12 |
| 4.3.1 Línea celular <i>SiHa</i> .....      | 13 |
| 4.3.2 Línea celular <i>HatCat</i> .....    | 13 |
| 4.4 <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray..... | 14 |
| 4.4.1 Clasificación taxonómica.....        | 14 |
| 4.5 Acetato de linalilo.....               | 16 |
| V. Hipótesis.....                          | 17 |
| VI. Objetivos.....                         | 18 |
| 6.1 General.....                           | 18 |
| 6.2 Específicos.....                       | 18 |
| VII. Metodología.....                      | 19 |
| 7.1 Descripción del estudio.....           | 19 |
| 7.2 Tipos celulares.....                   | 19 |
| 7.3 Medios de cultivo.....                 | 19 |
| 7.4 Recolección de material vegetal.....   | 19 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 7.5   | Extracción de aceite esencial .....   | 20 |
| 7.6   | Interacción del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray sobre <i>C. albicans</i> durante 24h.....                  | 20 |
| 7.7   | Interacción del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray sobre <i>C. albicans</i> durante la fase logarítmica.....  | 21 |
| 7.8   | Interacción del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray sobre <i>C. albicans</i> durante la fase estacionaria..... | 22 |
| 7.9   | Ensayos de acetato de linalilo en interacción con <i>C. albicans</i> durante 24h, fase estacionaria y fase logarítmica.....     | 22 |
| 7.10  | Ensayos de acetato de linalilo en interacción con <i>E. coli</i> .....  | 22 |
| 7.11  | Ensayos de acetato de linalilo en interacción con células <i>SiHa</i> .....   | 23 |
| 7.12  | Pruebas estadísticas.....   | 24 |
| VIII. | Resultados.....   | 25 |
| 8.1   | Efecto de la interacción del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray sobre <i>C. albicans</i> .....                | 25 |
| 8.2   | Efecto de la interacción del acetato de linalilo sobre <i>C. albicans</i> .....   | 26 |
| 8.3   | Efecto de la interacción del acetato de linalilo sobre <i>E. coli</i> .....   | 27 |
| 8.3.1 | Efecto del etanol al 70% en interacción con <i>E.coli</i> .....   | 27 |
| 8.3.2 | Efecto del acetato de linalilo sobre <i>E. coli</i> .....   | 27 |
| 8.3.3 | CL <sub>50</sub> de <i>E. coli</i> con acetato de linalilo.....   | 27 |
| 8.4   | Citotoxicidad del acetato de linalilo en células <i>SiHa</i> observado con el colorante azul tripán.....                        | 29 |
| 8.5   | Citotoxicidad del acetato de linalilo en células <i>SiHa</i> observado con prueba fotolorimétrica en presencia de MTT.....      | 31 |
| 8.6   | Citotoxicidad del acetato de linalilo en células <i>HatCat</i> observado con prueba fotolorimétrica en presencia de MTT.....    | 33 |
| 8.7   | Microscopía de las células <i>SiHa</i> en interacción con acetato de linalilo.....  | 34 |
| IX.   | Discusión.....  | 36 |

|   |    |
|---|----|
| <b>X.</b> Conclusiones.....                 | 42 |
| <b>XI.</b> Perspectivas .....               | 43 |
| <b>XII.</b> Referencias bibliográficas..... | 44 |

## Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Células utilizadas en este estudio..... | 19 |
|---|----|



## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.</b> Representación de la morfogénesis en <i>C. albicans</i> .....  | 9  |
| <b>Figura 2.</b> Candidiasis oral pseudomembranosa.....   | 10 |
| <b>Figura 3.</b> Vaginosis.....   | 10 |
| <b>Figura 4.</b> <i>E. coli</i> .....   | 11 |
| <b>Figura 5.</b> Adherencia localizada de EPEC sobre cultivo de células epiteliales Hep-2 <i>in vitro</i> .....   | 12 |
| <b>Figura 6.</b> Línea celular <i>SiHa</i> .....  | 13 |
| <b>Figura 7.</b> Línea celular <i>HatCat</i> .....  | 13 |
| <b>Figura 8.</b> Distribución de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray.....   | 14 |
| <b>Figura 9.</b> <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray.....   | 15 |
| <b>Figura 10.</b> Estructura química secundaria de acetato de linalilo.....   | 16 |
| <b>Figura 11.</b> Preparación de los cultivos de <i>C. albicans</i> en presencia del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray.....                            | 21 |
| <b>Figura 12.</b> Ensayo de microdilución.....  | 21 |
| <b>Figura 13.</b> Crecimiento de <i>C. albicans</i> en medio YPD sólido.....  | 21 |
| <b>Figura 14.</b> Lectura de placa de 24 pozos.....   | 24 |
| <b>Figura 15.</b> Efecto fungicida del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray sobre <i>C. albicans</i> .....  | 25 |
| <b>Figura 16.</b> Efecto fungicida del acetato de linalilo sobre <i>C. albicans</i> .....   | 26 |
| <b>Figura 17.</b> Lectura de placa de 24 pozos con las diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Chrysactinia mexicana</i> Gray sobre <i>C. albicans</i> ..... | 35 |

## Índice de gráficas

|  |    |
|--|----|
| <b>Grafica 1.</b> Efecto del etanol al 70% en el crecimiento de <i>E. coli</i> .....   | 27 |
| <b>Grafica 2.</b> Efecto del acetato de linalilo sobre <i>E. coli</i> .....  | 28 |
| <b>Grafica 3.</b> CL <sub>50</sub> del acetato de linalilo en <i>E. coli</i> .....   | 28 |
| <b>Grafica 4.</b> Viabilidad de células <i>SiHa</i> a las 24h con uso de colorante de exclusión azul tripán.....   | 29 |
| <b>Grafica 5.</b> Viabilidad de células <i>SiHa</i> a las 48h con uso de colorante de exclusión azul tripán.....   | 30 |
| <b>Grafica 6.</b> Viabilidad de células <i>SiHa</i> a las 72h con uso de colorante de exclusión azul tripán.....   | 30 |
| <b>Grafica 7.</b> Curva dosis respuesta del porcentaje de viabilidad metabólica de las células <i>SiHa</i> respecto a las concentraciones utilizadas de acetato de linalilo..... | 31 |
| <b>Grafica 8.</b> Viabilidad de células <i>SiHa</i> en interacción con acetato de linalilo a las 72h con uso de la prueba colorimétrica MTT.....                                 | 32 |
| <b>Grafica 9.</b> Viabilidad de células <i>HatCaT</i> en interacción con acetato de linalilo a las 72h con uso de la prueba colorimétrica MTT.....                               | 33 |

## Resumen

**Introducción:** El 80% de la población mundial depende del uso de la medicina tradicional, en especial de los remedios herbolarios. Existen cerca de 250,000 plantas con metabolitos secundarios a los que se les atribuyen actividad farmacológica, con efectos antiproliferativos, bactericidas, anticolinérgicos, bactericidas y antifúngicos por mencionar algunos, dichos metabolitos se encuentran en gran porcentaje en los aceites esenciales de las plantas.

**Objetivo:** Evaluar el efecto del acetato linalilo sobre *Candida albicans*, *Escherichia coli* y la línea celular de cáncer cervicouterino *SiHa*.

**Metodología:** Se utilizó la técnica de microdilución en placa de 96 pozos para conocer la concentración mínima inhibitoria del acetato de linalilo y del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre *Candida albicans*. Se realizaron curvas de crecimiento de *Escherichia coli* en presencia del acetato de linalilo para calcular su CL<sub>50</sub>. Se utilizó un método colorimétrico cuantitativo para determinar la viabilidad de las células *SiHa* en presencia de acetato de linalilo.

**Resultados:** El acetato de linalilo y el aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray afectan totalmente la formación de colonias de *candida albicans* en fase estacionaria logarítmica y en ensayo de 24h. Se muestra una CL<sub>50</sub> de 71.19mg/ml del acetato de linalilo sobre *Escherichia coli*. El acetato de linalilo favorece la viabilidad de las células *SiHa* a las 72h. **Conclusiones:** El acetato de linalilo tiene efecto antifúngico sobre *Candida albicans* en ensayos de 24h, fase estacionaria y fase logarítmica. El acetato de linalilo tiene efecto bactericida sobre *Escherichia coli*. El acetato de linalilo no tiene efecto antiproliferativo sobre la línea celular de cáncer cervicouterino (*SiHa*).

Palabras clave: *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *SiHa*, acetato de linalilo, aceite esencial.

## I. Introducción

En el mundo los sistemas de salud arrojan datos que apuntan a un aumento en las enfermedades infecciosas lo que ocasiona un aumento en los costos para la atención sanitaria pública, aunado a esto la situación actual en los servicios de salud vuelven atractiva a la medicina tradicional como una opción eficaz para tratar las enfermedades, prevenirlas, mejorar y mantener el estado de salud. Debido al gran interés por la medicina tradicional a nivel mundial con el paso del tiempo, la Organización Mundial de la Salud desde 1988 propone implementar programas nacionales y ampliar investigaciones para el desarrollo de conocimiento que respalden su utilización segura y eficaz, de igual manera fortalecer su relación con los sistemas de salud<sup>1</sup>.

Los medicamentos herbarios dentro de la medicina tradicional son ampliamente estudiados, en Estados Unidos representan al menos el 25% del total de medicamentos prescritos por recetas médicas<sup>2,3</sup>. Sin embargo, son particularmente sus principios activos quienes encabezan una larga lista de investigaciones, ya que presentan actividad farmacológica y se les atribuyen efectos terapéuticos. Dichos compuestos se encuentran en gran porcentaje en los aceites esenciales de las plantas, estos son mezclas volátiles caracterizadas por un fuerte aroma, provenientes del metabolismo secundario de las plantas y en su mayoría están constituidas por terpenos, a los que se les atribuyen efectos antiproliferativos, bactericidas, anticolinérgicos, bactericidas y antifúngicos por mencionar algunos, los cuales han sido utilizados en la medicina tradicional<sup>4,5</sup>.

Un ejemplo de planta utilizada en la medicina tradicional es *Chrysactinia mexicana* Gray a la que se le atribuyen efectos terapéuticos sobre enfermedades respiratorias, infecciones de la piel e incluso existen antecedentes que demuestran su actividad antibacteriana, antifúngica entre otros<sup>6,7</sup>. Sin embargo ha sido poco estudiado el efecto del aceite esencial de esta planta, así como de alguno de sus principales compuestos que se encuentran en mayor concentración en el aceite esencial tales como piperitona, eucaliptol y acetato de linalilo.

En el presente estudio se muestra el efecto del acetato de linalilo sobre diferentes tipos celulares reportados con cierto nivel de resistencia hacia los medicamentos de elección para su tratamiento y que a pesar de los intentos de la industria farmacéutica para crear nuevos fármacos, los cambios genéticos que experimentan los diferentes tipos celulares les han permitido sobrevivir y se ha convertido en un hecho alarmante en materia de salud, como es el caso de bacterias como *Escherichia coli*, hongos como *Candida albicans* o células cancerígenas<sup>8, 9</sup>.

Diversas publicaciones muestran que *Candida albicans* es el principal agente etiológico aislado del total de las infecciones fúngicas a nivel mundial con un 43%. Con respecto a *Escherichia coli* existen diversos serotipos capaces de desarrollar procesos infecciosos y evolucionar hasta tres síndromes con sintomatología y severidad diferentes, afectando a grandes grupos de población vulnerable, debido a su fácil contagio. *Escherichia coli* y *Candida albicans* son microorganismos reportados como resistentes a ciprofloxacino, clotrimazol y anfotericina B respectivamente, lo cual representa un problema importante de salud pública<sup>10, 11, 12, 13, 14, 15, 16</sup>.

Por otro lado, las investigaciones en células cancerígenas a lo largo del tiempo ha sido a través del uso de líneas celulares como modelo de estudio *in vitro* para probar diferentes compuestos derivados de las plantas con la finalidad de conocer un posible efecto antiproliferativo. La línea celular *SiHa* proveniente de carcinoma epidermoide de cérvix humano y es un modelo de estudio para el cáncer cervicouterino (CaCu) dada su importancia, ya que a nivel mundial en el año 2012 se estima que hubo unos 445 000 casos nuevos (84% de los nuevos casos mundiales), ocupaba el cuarto lugar entre los cánceres en las mujeres y el segundo más frecuente en América latina,. El Sistema Nacional de Salud en México en el año de 2006 brindó atención médica aproximadamente a 9,000 casos de CaCu invasor y se registrón 4,000 muertes anualmente<sup>17, 18, 19</sup>.

Por todo lo anterior el presente estudio se enfocó en evaluar el efecto del acetato de linalilo sobre *Candida albicans*, *Escherichia coli* y en la línea celular *SiHa*. Se conoce que el acetato de linalilo es un monoterpeno que no solamente se encuentra como componente mayoritario de *Chrysactinia mexicana* Gray, también está presente en algunas plantas como en *Lavandula angustifolia* y en *bergamota*. Tiene diversas aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, sin embargo se le atribuyen algunas actividades biológicas, entre ellas antiinflamatorias, fungicidas y bactericidas<sup>20</sup>.

## II. Planteamiento del problema

Se calcula que en el mundo aproximadamente más de 300 millones de personas al año sufren una infección fúngica grave, las cuales provocan 1, 350,000 defunciones<sup>20</sup>. Sin embargo las infecciones más frecuentes son aquellas que afectan a mucosas y piel, provocadas principalmente por el género *Candida*, de las cuales la especie *Candida albicans* es responsable del 70% del total de las infecciones por este género<sup>13, 21</sup>.

Para el año 2016 *Candida albicans* fue el patógeno que origino la mayoría de los casos de candidiasis sistémica o candidemia con una incidencia de 0.96 casos por 1000 ingresos en Estados Unidos, en Europa se estima una incidencia de 0.38 casos por cada 1000 ingresos, mientras que en América latina se encuentra la incidencia más alta de 1.96 casos por cada 1000 ingresos con una tendencia a seguir aumentando; la mortalidad oscila entre 38 y 52%, lo cual llevo a un uso extremo y generalizado del limitado número de fármacos para su tratamiento y prevención, originando resistencia a múltiples fármacos antifúngicos, principalmente a la clase de fármacos de los azoles. Además de que los costos por cada episodio de candidemia se estiman entre 34,000 y 45.000 dólares<sup>22, 23, 24, 25</sup>.

Las infecciones fúngicas no son el único problema a resolver para la salud pública, ya que para principios del año 2017 las enfermedades diarreicas se posicionan en la segunda causa de muerte de niños menores de cinco años, provocando cerca de 525,000 defunciones en niños cada año. Se calcula que mundialmente se producen 1700 millones de casos de enfermedades diarreicas<sup>26</sup>. De estos casos *Escherichia coli* es de los principales agentes causales de estas enfermedades originando complicaciones graves, ya que algunas cepas como la enterohemorrágica tiene la capacidad de producir en un 2 a 7% del total de las personas que la portan Síndrome Hemolítico Urémico (SHU), dejando secuelas importantes como insuficiencia renal crónica o hipertensión arterial en un 30% de los pacientes, con un letalidad de hasta el 10%<sup>27</sup>.

La facilidad de contagio de esta bacteria es una de las preocupaciones, ya que la falta de seguimiento en las prácticas básicas de higiene de los alimentos es la principal fuente de infección<sup>16</sup>. En México poco más de 25.4 millones de personas carecen de acceso a los servicios básicos, los cuales son extremadamente necesarios para evitar el contagio y desarrollo de las enfermedades diarreicas producidas por las diferentes cepas de *Escherichia coli*<sup>28</sup>.

Estos dos microorganismos antes mencionados se encuentran en la flora normal del ser humano, que en la mayoría de los casos en condiciones normales por si solo se encarga de limitar su invasión y diseminación. Pero en ambos casos, la gravedad y el tipo de infección dependerá en gran parte de las características del huésped ya que son una causa importante de morbimortalidad en pacientes con sistema inmunológico comprometido, como son los pacientes hospitalizados por tiempos prolongados, con algún tipo de trasplante, corticoterapia crónica, adultos mayores, neonatos, pacientes oncológicos por mencionar algunos<sup>13, 26, 28, 29,30,31</sup>.

Se ha demostrado que en pacientes bajo tratamiento de quimioterapia los microorganismos más frecuentes asociados a infecciones son hongos como *Candida albicans* y bacterias principalmente gramnegativos como *Escherichia coli*, esta última presentando resistencia a las fluoroquinolonas, siendo resistente en más de la mitad de los pacientes en los que se administra en diferentes partes del mundo<sup>30, 32</sup>.

*Candida albicans* por su parte es considerada un desafío para el periodo perioperatorio siendo asociada con mortalidad y morbilidad durante este periodo<sup>29</sup>.

La resistencia de estos agentes infecciosos a algunos de sus tratamientos se vuelven un riesgo para el éxito de los tratamientos para el cáncer, principalmente en cirugías mayores y quimioterapias debido a la ausencia de antimicrobianos eficaces, lo que prolonga la estancia hospitalaria, requiriendo mayor cantidad de pruebas diagnósticas y mayor cantidad de fármacos,



volviéndose más costosa la atención sanitaria en pacientes con infecciones resistentes en comparación con la de los pacientes con infecciones no resistentes<sup>12</sup>.

El cáncer además de ser una enfermedad invasiva y dolorosa, el costo de su tratamiento alcanza hasta los 100,000 pesos por ciclo de quimioterapia, con una duración de 21 ciclos por 5 años aproximadamente, aunado a esto los tratamientos convencionales presentan efectos secundarios nocivos y agresivos hacia los pacientes dañando principalmente a órganos y sistemas importante como al sistema nervioso, gastrointestinal, sanguíneo entre otros<sup>33, 34,35</sup>.

Por todo lo anterior existe la necesidad de proponer e investigar nuevas alternativas terapéuticas para estas enfermedades en donde los microorganismos muestran resistencia a sus tratamientos de elección y los efectos adversos son agresivos con múltiples efectos secundarios, por lo que actualmente la investigación de la medicina tradicional ha tenido un gran auge para tratar, prevenir y mantener la salud frente a las principales enfermedades cuyos tratamientos no son suficientes o bien sus agentes infecciosos presentan resistencia<sup>34</sup>.

A pesar de los antecedentes científicos sobre los efectos de las plantas, de las 250,000 plantas de uso medicinal tan solo del 5 al 15% han sido estudiadas, entre ellas se encuentran la planta *Humulus lupulus*, *Galphimia glauca*, *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea* entre muchas otras por lo que es necesario potenciar la investigación de plantas de México y más aún nativas del estado de San Luis Potosí con el fin de crear nuevas propuestas para futuros medicamentos contra los agentes patógenos resistentes a sus tratamientos de elección y lograr disminuir los efectos secundarios nocivos de algunos fármacos, con el objetivo de tener al alcance tratamientos farmacológicos eficaces para evitar los tiempos prolongados en las hospitalizaciones, costos elevados y aportar una posible solución a un problema importante de salud pública<sup>36, 37,38</sup>.

En el presente trabajo se decido probar el acetato de linalilo uno de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray para conocer su posible efecto fungicida, bactericida y antiproliferativo. Los resultados obtenidos en este trabajo aportan a la generación de conocimiento de las ciencias básicas para una posible aplicación terapéutica en el futuro.

### **III. Pregunta de investigación**

¿Cuál es el efecto del acetato de linalilo sobre *C. albicans*, *E. coli* y en la línea celular de cáncer cervicouterino *SiHa*?

¿Cuál es el efecto del acetato de linalilo en interacción con los compuestos del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre *C. albicans*?

## IV.Marco Teórico

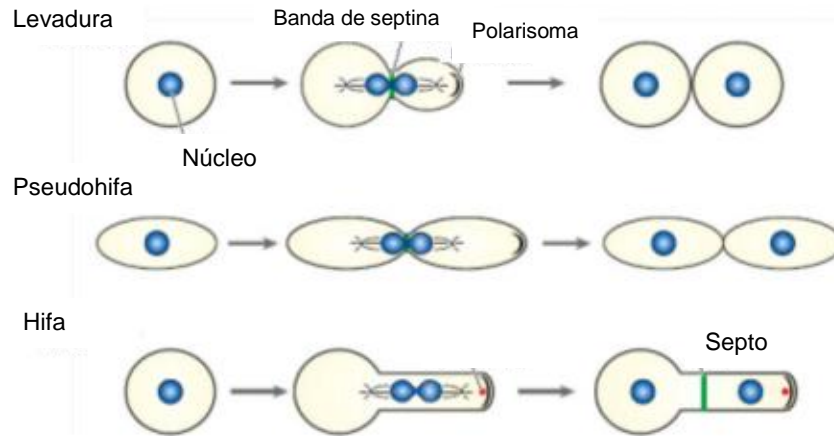
### 4.1 *Cándida albicans*

#### 4.1.1 Clasificación taxonómica<sup>39</sup>

- Dominio: *Eucarya*
- Reino: *Fungi*
- División: *Eumycota*
- Subdivisión: *Deuteromycotina*
- Clase: *Blastomycetes*
- Familia: *Cryptococaceae*
- Género: *Candida*

#### 4.1.2 Características micológicas

Es un hongo polimórfico capaz de realizar transiciones reversibles en sus tres morfologías debido a su capacidad de desarrollar pseudohifas, hifas y blastoconidios los cuales son células gemantes subesféricas de entre 3-8 x 2-7 nm de las cuales se generan un tipo de clamidosporas unicelulares, redondas u ovaladas con pared gruesa refringente de aproximadamente 8-16 nm. Sus colonias se caracterizan por un crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas con apariencia cremosa<sup>39, 40</sup>. Por otro lado las hifas son estructuras multicelulares que se caracterizan por su crecimiento hiperpolarizado y la inhibición de la separación celular originando filamentos en los que las paredes laterales permanecen paralelas respecto al septo. Las pseudohifas se encuentran como una forma intermedia entre las levaduras e hifas, caracterizando su crecimiento con un patrón de ramificaciones, siendo definida fenotípicamente por algunos autores como células levaduriformes alargadas que a su vez permanecen unidas<sup>41, 42</sup>. (Ver figura 1).



**Figura 1. Representación de la morfogénesis en *C. albicans***<sup>43</sup> Tiene la capacidad de crecer en tres formas morfológicas distintas *C. albicans*. Levaduras, pseudohifas e hifas verdaderas. Por un lado las células levaduriformes después de la citocinesis completan la separación, las formas en pseudohifas, comúnmente crecen con patrones ramificados y finalmente el crecimiento de las hifas verdaderas es continuo tras la citocinesis sin constricciones en la formación del septo en comparación con las pseudohifas.<sup>43</sup>

#### 4.1.3 Candidiasis en el ser humano

La candidiasis forma parte de las infecciones oportunistas con mayor frecuencia en los seres humanos, universalmente la especie *C. albicans* es responsable del 70% del total de las infecciones por este género. En el año 2016, *C. albicans* fue el patógeno que causó la mayoría de los casos de candidiasis sistémica o candidemia, presentando además resistencia a múltiples fármacos antifúngicos.

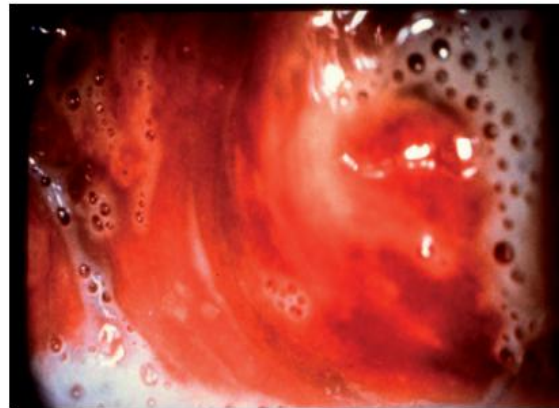
*C. albicans* es un importante patógeno oportunista comensal de los seres humanos que pueden infectar una amplia gama de tejidos del cuerpo (sistema gastrointestinal y mucosa oral) sin embargo cuando se enfrenta a un sistema inmunológico intacto y una flora microbiana normal, no es capaz de desarrollar algún tipo de infección<sup>13, 44</sup>.

Ciertos eventos críticos como tratamientos antibacterianos o alguna disfunción del sistema, son suficientes para que este hongo sobrepase la flora microbiana normal de las mucosas originando la infección<sup>45</sup>.

Las infecciones orales y vaginales producidas por *C. albicans* son las más comunes, incluso en pacientes comprometidos, aunque *C. albicans* también produce infecciones que afecten a piel, uñas y mucosas. En resumen, la piel húmeda, mucosas orales y vaginales son lugares donde la infección por este patógeno es frecuente <sup>42, 46</sup> (Ver figuras 2 y 3).



**Figura 2. Candidiasis oral pseudo-membranosa** <sup>45</sup>.



**Figura 3. Vaginosis** <sup>45</sup>.

Es importante mencionar que los factores de virulencia juegan un papel importante, ya que aparecen gracias a la expresión de un número determinado de genes en un momento específico, para conferir el fenotipo y virulencia de cada sitio de infección. Entre los genes conocidos asociados a la virulencia de *C. albicans* están el gen de la hexosaminidasa (HEX1), diversos genes de proteinasas aspárticas (SAP1, SAP2, SAP3 y SAP4) y un gen que confiere capacidad de producir tubos germinales y aumentar la adhesión ( $\alpha$ INT1) <sup>39</sup>. Algunos de estos factores incluyen su capacidad para sobrevivir como comensal, la adherencia a algunas células del hospedero, la secreción de enzimas degradativas y el cambio de morfología <sup>46</sup>.

## **4.2 *Escherichia coli***

Bacilo gramnegativo considerado como parte de la flora intestinal y principal anaeróbico facultativo (Ver figura 4). *E. coli* es una de las bacterias más abundantes en el intestino del ser humano y de algunos animales de sangre

caliente.<sup>47, 48</sup> Actualmente existen seis serotipos de esta bacteria causantes de diarreas de diferente gravedad en hospederos sanos, como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), adherente difusa (DAEC) y enteropatógena (EPEC)<sup>48</sup>. Los cuales pueden causar una variedad de enfermedades en el humano incluyendo septicemia, neumonía, meningitis, infecciones en vías urinarias, diarrea e incluso la muerte<sup>49</sup>.

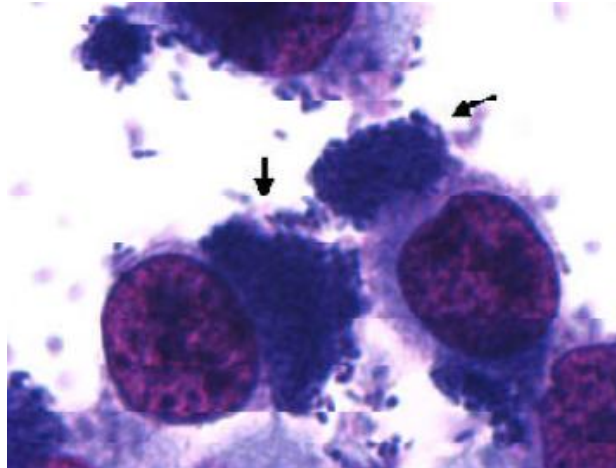


**Figura 4.** *E. coli*. bacilos cortos gramnegativos.<sup>49</sup>

La cepa EHEC se encuentra en el agua o alimentos contaminados, principalmente en la carne cruda o poco cocinada, la leche cruda y las hortalizas contaminadas por materia fecal. Tiene una relevancia importante en cuanto a su epidemiología clínica debido a su capacidad de producir SHU, ya que se asocia a la producción de toxina Shiga, responsable de graves enfermedades a través de los alimentos contaminados. Afecta principalmente a niños menores de 5 años, en su mayoría a lactantes (82%), con un 10% de letalidad y un 30% de probabilidad de causar secuelas graves, como insuficiencia renal crónica e hipertensión arterial<sup>16, 50</sup>.

Al igual que EHEC, EPEC infecta principalmente a niños menores de dos años, provocando diarreas de diversos grados, sin embargo a diferencia de ECEH, utiliza diversos factores de virulencia para causar el daño mediante complejos mecanismos. Induce la lesión A/E (adherencia y esfacelamiento) a nivel intestinal,

caracterizada por la degeneración de las microvellosidades del enterocito (Ver figura 5) <sup>51</sup>. La diarrea causada por esta cepa, se relaciona con la pérdida masiva de iones, consecuencia del desarreglo del citoesqueleto, la destrucción de las microvellosidades y la secreción de alguna enterotoxina<sup>52</sup>.



**Figura 5. Adherencia localizada de EPEC sobre cultivo de células epiteliales Hep-2 in vitro.** Las flechas indican la característica micro-colonia que forman las bacterias sobre la superficie de las células. <sup>53</sup>

### 4.3 Líneas celulares

Una línea celular se define como células de un tipo único (humano, animal o vegetal) que se han adaptado para crecer continuamente en el laboratorio y que se usan en investigación<sup>54</sup>.

Los ensayos *in vitro* son el método de estudio más empleado en las distintas áreas de investigación en los últimos años, especialmente en el estudio del cáncer. La técnica de cultivo de células se inició con Harrison desde 1907 y posteriormente con A. Cairel en 1912 y hasta la actualidad se ha vuelto indispensable para el desarrollo de pruebas de citotoxicidad de extractos vegetales sobre líneas celulares derivadas de neoplasias humanas para identificar nuevos principios activos. Debido a los resultados obtenidos con este método de investigación,

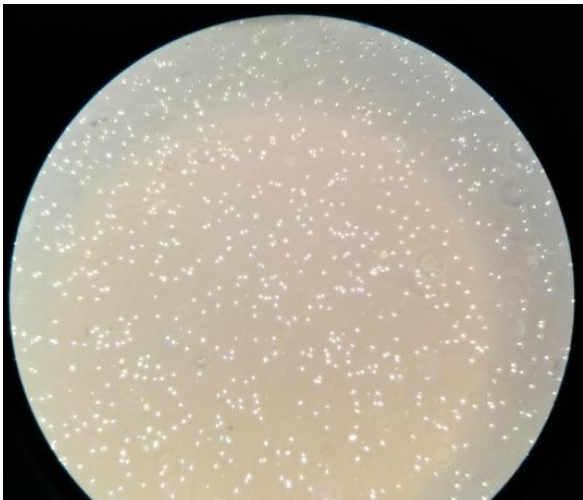
diversos autores lo consideran como una técnica sensible y sencilla, con la cual se logran obtener resultados reproducibles y estadísticamente válidos<sup>54, 55, 56</sup>.

#### 4.3.1 Línea celular *SiHa*

Línea celular derivada de tejido epitelial de cérvix con CaCu una sola copia de VPH 16, proveniente de mujer asiática de aproximadamente 55 años, tienen la característica de ser adherentes en su medio de cultivo<sup>57</sup> (Ver figura 6).

#### 4.3.2 Línea celular *HatCaT*

La línea celular *HatCaT* (Ver figura 7) utilizada en investigaciones científicas. Derivada de queratinocitos humanos inmortalizados de manera espontánea en medio de cultivo a temperatura levada y una disminuida concentración de calcio. Es utilizada en gran medida ya que es un modelo reproducible debido a su alta capacidad de diferenciación y proliferación *in vitro*<sup>58</sup>.



**Figura 6.** Línea celular *SiHa*, vistas en microscopio de campo claro a 40x. Fuente directa



**Figura 7.** Línea celular *HatCaT*. Fuente directa



#### 4.4 *Chrysactinia mexicana* Gray

##### 4.4.1 Clasificación taxonómica

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheobionta*

Filo: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Asteridae*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Género: *Chrysactinia*

Especie: Gray

*Chrysactinia mexicana* Gray es conocida a lo largo del país como hierba de San Nicolás, falsa damiana, damianita, calanca, Yeyepaxtle o romerillo. Se encuentra en el centro y norte del país (Ver figura 8). Se le han atribuido propiedades contra enfermedades respiratorias, infecciones de la piel, antifúngicas



**Figura 8.** Distribución de *Chrysactinia mexicana* en México

bactericidas, además se sabe que es altamente consumida y comercializada en América del Norte, en México y algunos países de América del Sur por sus propiedades antiespasmódicas locales, sudoríficas, diuréticas, antipiréticas, antirreumáticas, tónicas y estimulantes<sup>59, 60, 61</sup>.

*Chrysactinia mexicana* Gray en el estado de San Luis Potosí fue autenticada por el Taxónomo José García Pérez del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (Ver figura 9). Estudios previos determinaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas la composición química del aceite esencial, en donde fueron caracterizados diecisiete compuestos; de los cuales los mayoritarios son eucaliptol (41.3%), piperitona (37.7%) y acetato de linalilo (9.1%)<sup>62, 63</sup>.

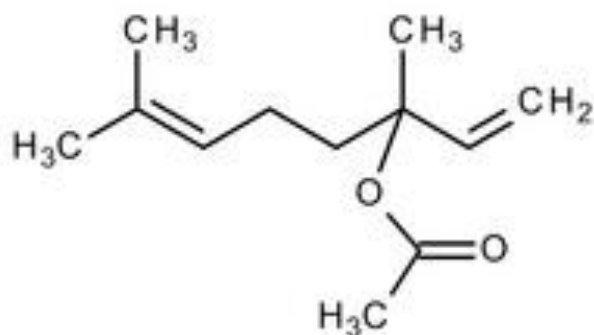


**Figura 9. *Chrysactinia mexicana* Gray.** Pequeño arbusto de entre 60cm, hojas de color verde oscuro, etapa de floración en el periodo de Abril - Octubre, caracterizada por sus flores. Fuente directa

#### 4.5 Acetato de linalilo.

Acetato de linalilo no solamente se encuentra como uno de los compuestos mayoritarios de *Chrysactinia mexicana* Gray, se encuentra también otras plantas como *Lavandula angustifolia*, *L. latifolia* y en *Bergamota*. Tiene diversas aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, sin embargo se le atribuyen algunas actividades biológicas, entre ellas bactericidas, antifúngicas y antiinflamatorias<sup>64,65</sup>.

Por su estructura química secundaria (ver figura 10) es considerado como un monoterpeno, es decir dos moléculas de un isopreno, con un peso molecular de 196.29 g/mol, fórmula molecular de C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub> o CH<sub>3</sub>COOC<sub>10</sub>H<sub>17</sub>.



**Figura 10.** Estructura química secundaria de acetato de linalilo<sup>65</sup>.

## V. Hipótesis

H<sub>1</sub>= El acetato de linalilo en interacción con los compuestos del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray tiene mayor efecto fungicida sobre *C. albicans*, en comparación que cuando se utiliza solo.

H<sub>0</sub>= El acetato de linalilo en interacción con los compuestos del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray no tiene mayor efecto fungicida sobre *C. albicans*, en comparación que cuando se utiliza solo.

H<sub>1</sub>= El acetato de linalilo tiene efecto fungicida sobre *C. albicans*.

H<sub>0</sub>= El acetato de linalilo no tiene efecto fungicida sobre *C. albicans*.

H<sub>1</sub>= El acetato de linalilo tiene efecto bactericida sobre *E. coli*.

H<sub>0</sub>= El acetato de linalilo no tiene efecto bactericida sobre *E. coli*.

H<sub>1</sub>= El acetato de linalino tiene efecto antiproliferativo sobre línea celular de cáncer cervicouterino *SiHa*.

H<sub>0</sub>= El acetato de linalino no tiene efecto antiproliferativo sobre línea celular de cáncer cervicouterino *SiHa*.

## VI. Objetivos

### 6.1 General

Evaluar el efecto del acetato linalilo sobre *C. albicans*, *E. coli* y la línea celular de cáncer cervicouterino *SiHa*.

### 6.2 Específicos

- Identificar la concentración mínima inhibitoria del acetato de linalilo en interacción con los compuestos del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre *C. albicans* en ensayos de 24h, en la fase estacionaria y logarítmica.
- Identificar la concentración mínima inhibitoria de acetato de linalilo sobre *C. albicans* en ensayos de 24h, en fase estacionaria y logarítmica.
- Conocer la CL<sub>50</sub> de acetato de linalilo sobre *E. coli*.
- Conocer el porcentaje de viabilidad celular de la línea celular *SiHa* en interacción con acetato de linalilo.

## VII. Metodología

### 7.1 Descripción del estudio

Se realizó un estudio cuantitativo, descriptivo de corte transversal.

### 7.2 Tipos celulares

Tabla 1. Células utilizadas en este estudio

| Tipo celular | Descripción  |
|--------------|--|
| Levadura     | <i>C. albicans</i> (SC5314)  |
| Bacteria     | <i>E. coli</i> (MC400)   |
| Mamífero     | Línea celular <i>SiHa</i> . (Carcinoma epidermoide de cérvix humano) |
| Mamífero     | Línea celular HatCaT (Queratinocitos humanos)                        |

### 7.3 Medios de cultivos y condiciones de crecimiento.

*C. albicans* creció en medio YPD (2% de peptona de caseína (BD Bioxon), 2% de dextrosa (Fermont), 1% de extracto de levadura (BD Bioxon)), a 28°C a 120 rpm. Para la preparación de medio YPD sólido se le añadió a la mezcla 10% de agar (BD Bioxon).

Los cultivos de *E. coli* se crecieron en medio Luria Bertani (LB) al 4% (SIGMA), a 38°C a 120rpm.

La línea celular *SiHa* se incubaron en medio Dulbecco's Modificado Eagle Medium: Nutrient Mixtures (D-MEM/F-12) (Gibco® lot# 1517884) suplementado al 2% de antibiótico (penicilina-estreptomicina-neomicina SIGMA Lot LSBB9310V) con suero fetal bovino al 10% (CORNING cellgro Lote I024-6) a 37°C a una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### 7.4 Recolección de materia vegetal.

La planta *Chrysactinia mexicana* Gray se recolecto en el kilómetro 5 del Municipio de Guadalcazar en el estado de San Luis Potosí. Fue secada por 72h a temperatura ambiente, posteriormente se separaron las hojas, tallos secundarios y flores, el resto fue desechado. Se trituraron de manera homogénea en licuadora

industrial y se cirnio hasta obtener un tamaño aproximado de partícula de 1750 micras.

### **7.5 Extracción de aceite esencial.**

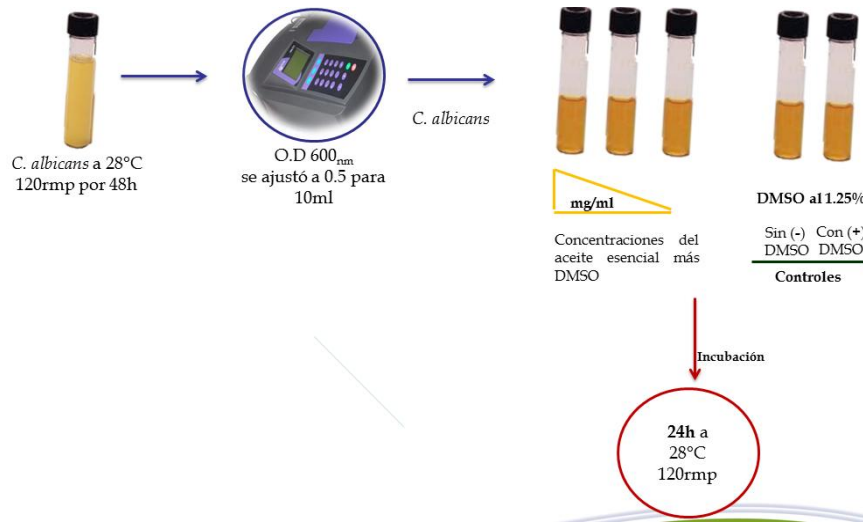
Se obtuvo el aceite esencial por el método de extracción por arrastre de vapor.<sup>65</sup> Se utilizó 50grs de materia vegetal en cada extracción de 8h de duración y el agua florar obtenida de la extracción de vapor fue colectada en un embudo florentino para separar por densidad el aceite esencial. El aceite esencial obtenido se almaceno en tubos eppendorf a 4C°. Un microlitro de aceite esencial equivale a 0.929mg.

### **7.6 Interacción del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre *C. albicans* durante 24h.**

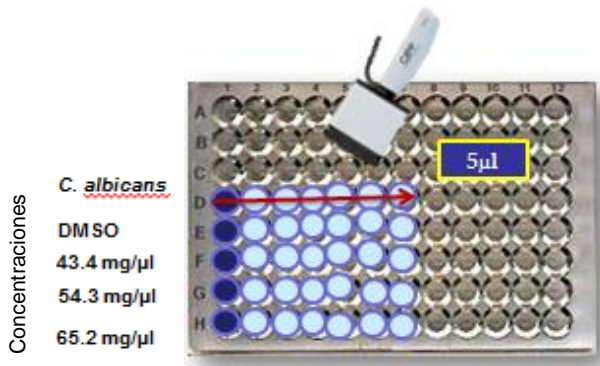
Se cultivó *C. albicans* 28°C con una agitación de 120rpm durante 48h en un tubo de ensayo con 10ml de medio YPD, posteriormente se midió la O.D<sub>600nm</sub> en espectrofotómetro (Biochrom 80-2115-10), y se ajustó a una O.D<sub>600nm</sub> de 0.5 para 10ml de medio además a cada tubo se les agregaron diferentes concentraciones en un rango de 3.71 a 5.57 mg/ml de aceite esencial, previamente diluido en Dimetil sulfóxido (DMSO) (D8418 Sigma-Aldrich) al 1.25%, se utilizaron dos tubos inoculados con *C. albicans* con y sin DMSO al 1.25% como controles. Los tubos se incubaron a 28°C a 120rpm durante 24h (Ver figura 11).

Posteriormente se realizó la técnica de microdilución en placa de 96 pozos, se tomaron 5µl de cada uno de los pocillos (Ver figura 12) y se colocaron sobre cajas petri con medio YPD agar (Ver figura 13) se incubaron a 28°C por 48h en incubadora de cultivo (WiseVen® modelo WOF-50), se observó el crecimiento a las 24 y 48h para identificar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y finalmente se tomaron fotos en fotodocumentador (Lab net). La CMI para este estudio corresponde al 100% de la inhibición del crecimiento. Los ensayos se realizaron por triplicado.

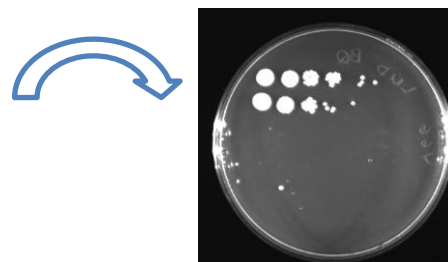
**Figura 11.** Preparación de los cultivos de *C. albicans* en presencia del aceite esencial.



**Figura 12. Ensayo de microdilución.** D) Sin DMSO; E) Con DMSO; F-H) Diferentes concentraciones del compuesto más el diluyente



**Figura 13.** Crecimiento de *C. albicans* en medio YPD sólido.



### 7.7 Interacción del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre *C. albicans* durante la fase logarítmica.

Se utilizó la misma metodología que en el punto 7.6, con la diferencia en el tiempo de interacción de las células con el aceite esencial, en este ensayo permanecieron en interacción por 7h, y las concentraciones de aceite esencial fueron los mismos rangos de 3.71 a 5.57 mg/ml.



## **7.8 Interacción del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre *C. albicans* durante la fase estacionaria.**

Se partió de un cultivo en fase estacionaria de *C. albicans* de 48h de incubación a 28°C a 120rpm en un matraz erlenmeyer con 150ml de medio YPD. Se midió la O.D<sub>600nm</sub> para posteriormente ajustar a una O.D<sub>600nm</sub> de 0.5 para 10ml de medio que provenía de fase estacionaria, cada tubo contenía diferentes concentraciones de aceite esencial en un rango de 3.71 a 5.57 mg/ml de aceite esencial diluido en DMSO al 1.25%. Se incluyeron como control dos cultivos de *C. albicans* con y sin DMSO. Los tubos se incubaron en condiciones de 28°C a 120rpm por 3h; Después de las tres horas de interacción de las células con el aceite esencial se realizó la misma metodología para la técnica de microdilución en placa de 96 pozos y el monitoreo de crecimiento celular a las 24h y 48h sobre cajas de YPD agar de acuerdo al punto 7.6. Los ensayos se realizaron por triplicado.

## **7.9 Ensayos de acetato de linalilo en interacción con *C. albicans* durante 24h, fase estacionaria y fase logarítmica.**

El acetato de linalilo se obtuvo de manera comercial (SIGMA Lote MKCB 2368V) fue diluido en etanol al 70%, con una concentración final de 901 mg/ml, en una relación de 5:1, con esta mezcla se realizaron ensayos de *C. albicans* de interacción de 24h, de 3h para fase estacionaria y 7h para fase logarítmica con las mismas metodologías utilizadas para el aceite esencial (apartados 7.6 y 7.8), con la diferencia de haber realizado un lavado de las células con agua destilada estéril antes de crecer en YPD sólido. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los rangos utilizados para determinar la CMI fueron de 20, 40, 60 y 80mg/ml.

## **7.10 Ensayos de acetato de linalilo en interacción con *E. coli***

Se partió de un precultivo de *E. coli* crecido durante 12h a 37°C a 120rpm en medio LB (Both SIGMA lot#SLBB9239v), se tomó la cantidad necesaria para una OD<sub>540nm</sub> de 0.05 en 50 ml de medio LB contenido en un matraces de 150 ml, a cada uno de ellos se le agregó concentraciones diferentes (20, 40, 60 y 80 mg/ml) de acetato de linalilo, se incluyó como control del experimento otros cultivos de *E.*

*coli* con y sin etanol al 70% como diluyente del compuesto, los volúmenes utilizados fueron de 300 y 640µl de etanol al 70%. Los matraces se incubaron por 6 h a 38°C a 120 rpm, después del tiempo de interacción las células fueron lavadas con agua estéril para eliminar el resto del compuesto para medir O.D<sub>450nm</sub>, los valores de la curvas de crecimiento se registraron. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### **7.11 Ensayos de acetato de linalilo en interacción con células *SiHa***

El compuesto acetato de linalilo se disolvió en DMSO grado biología molecular (SIGMA lote#SHBG5286V) a una relación de 5:1, posteriormente se realizaron diluciones seriadas con DMSO de [1000], [500], [250] [100], y se obtuvo como concentraciones finales 7.5mg/ml; 15.01mg/ml; 37.54mg/ml; 75.08mg/ml respectivamente del acetato de linalilo, de en una placa de 24 pozos se adicionaron 500 µl/pozo de cada dilución, se utilizaron cultivos confluentes (80-90%) de la línea celular *SiHa*, como control del experimento se usaron cultivos de la línea celular *HatCaT*, el ensayo se realizó por triplicado y las células fueron observadas al microscopio de campo claro con un aumento de 40X.

.Se calculó el número de células con membrana plasmática viable a través del colorante de exclusión azul de tripan observadas a microscopio a 40X. Se colocaron 50,000 células/pozo en un volumen de 1ml de medio DMEM en microplacas de 24 pozos (NUNCLON®), que contenía 500µl de cada dilución mencionada anteriormente, posteriormente se incubaron 72h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en incubadora de cultivo (LUZEREN®) Como controles de los experimentos se utilizaron células con DMSO y células sin DMSO.

Se realizó conteo celular a las 24, 48 y 72 h, utilizando azul tripan. A las 72h se removió el medio, adicionando 1ml de tripsina EDTA 1x/pozo (SIGMA lote SLBL2552V), se incubaron por 15min en atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, posterior a esto se agregaron 100µl de medio DMEM/pozo, obteniendo una suspensión celular que se contó en cámara de Neubauer mediante el método de exclusión con

azul de tripano. Se adiciono 200  $\mu$ l de Thiazolyl Blue Tetrazolium Bormide 98% (MTT)/pozo (SIGMA Lote MKBX0151V) y las células fueron incubadas nuevamente durante 4h en atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C, al término de este tiempo fueron leídas a una O.D<sub>570nm</sub> en un lector de microplacas BIO-RAD (Benchmark Plus) (Ver figura 14).



**Figura 14. Lectura de placa de 24 pozos.** Diferentes concentraciones de acetato de linalilo en presencia de MTT (Fuente directa)

## 7.12 Pruebas estadísticas

Para el análisis de los resultados de las líneas celulares se utilizó el programa GraphPad V.5 en donde se realizó un ANOVA de una vía con un intervalo de confianza de 95% con una significancia estadística de 0.05, y un análisis de Shapiro–Wilk para contrastar la normalidad de los datos.

## VIII. Resultados

### 8.1 Efecto de la interacción del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre *C. albicans*

Se observó que *C. albicans* en fase logarítmica es más sensible al efecto del aceite esencial, obteniendo la CMI en 3.71mg/ml, *C. albicans* en fase estacionaria así como en ensayos de 24h de crecimiento, la CMI fue en 4.64mg/ml (Ver figura 15).

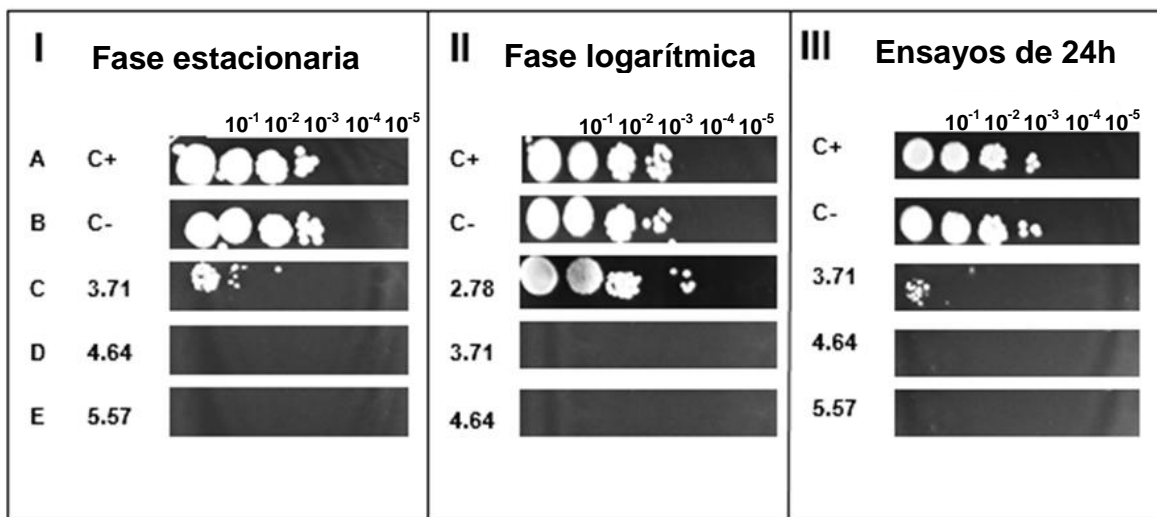
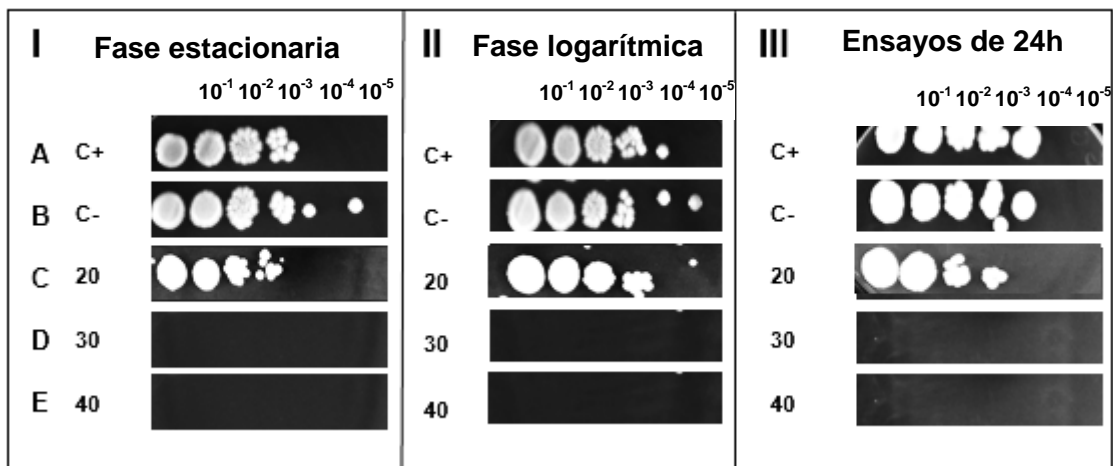


Figura 15. Efecto fungicida del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre *C. albicans*.

Crecimiento de *C. albicans* sobre YPD agar a las 48h. Ensayos realizados por triplicado. En las líneas se observa el crecimiento *C. albicans*: **A)** sin DMSO (-); **B)** con DMSO, en las líneas **C, D y E** en presencia de aceite esencial (mg/ml); diluido con etanol (+) 70%.

## 8.2 Efecto de la interacción de acetato de linalilo sobre *C. albicans*

Los resultados muestran que la CMI para los ensayos en fase estacionaria, logarítmica y ensayos de 24h de *C. albicans* en interacción con el acetato de linalilo corresponde a la misma concentración de 30mg/ml (Ver figura 16).



**Figura 16. Efecto fungicida de acetato de linalilo sobre *C. albicans*.** Crecimiento de *C. albicans* sobre YPD agar a las 48h. Ensayos realizados por triplicado. En las líneas se observa el crecimiento *C. albicans*: **A)** sin DMSO (-); **B)** con DMSO (+), en las líneas **C, D y E** en presencia de aceite esencial (mg/ml) diluido con etanol al 75%.

### 8.3 Efecto de la interacción del acetato de linalilo sobre *E. coli*

#### 8.3.1 Efecto del etanol al 70% en interacción con *E. coli*

Se realizaron ensayos con diferentes cantidades del diluyente utilizado para el acetato de linalilo que fue etanol al 70%, y se observa que este no tiene efecto sobre el crecimiento de las células de *E. coli*. (Ver gráfica 1)

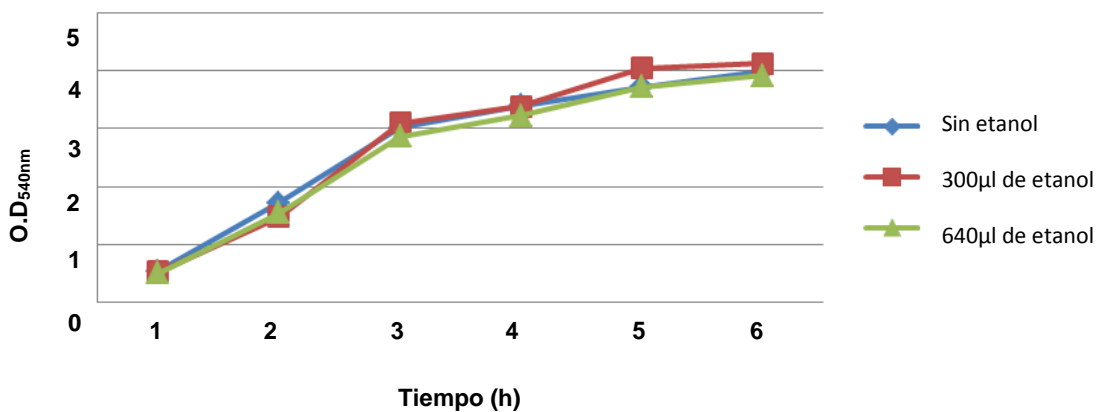
#### 8.3.2 Efecto del acetato de linalilo sobre *E. coli*

Se observa el crecimiento de *E. coli* en interacción con diferentes concentraciones del acetato de linalilo, mostrando un menor crecimiento en los ensayos con la concentración de 80mg/ml (Ver gráfica 2).

#### 8.3.3 CL<sub>50</sub> de *E. coli* con acetato de linalilo

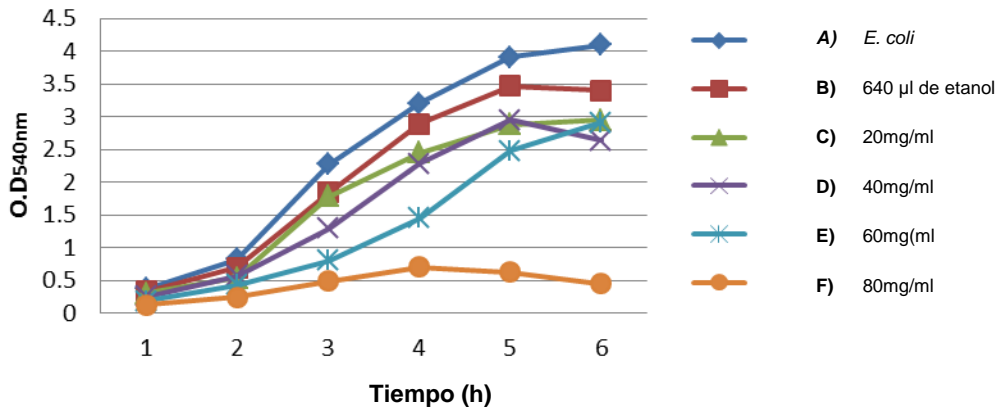
Se observa la línea de regresión lineal en la cual se muestra la concentración capaz de matar al 50% de la población, que corresponde a 71.19mg/ml.

Gráfica 1. Efecto del etanol al 70% en el crecimiento de *E. coli*

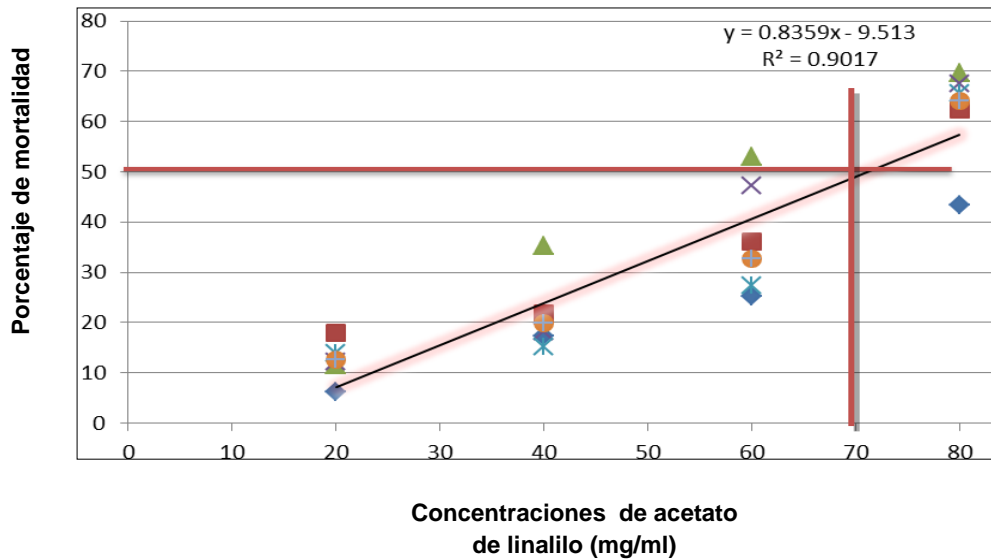


**Gráfica 2. Efecto del acetato de linalilo en el crecimiento de *E. coli*.**

En las curvas **A** y **B** se observa el crecimiento de *E. coli* (controles para este experimento); A) Sin etanol, ni acetato de linalilo; B) Con 640µl de etanol sin acetato de linalilo. En las líneas C, D y E el crecimiento de *E.coli* en interacción con las diferentes concentraciones del acetato de linalilo. C) 20mg/ml, D) 40mg/ml, E) 60mg/ml, F) 80mg/ml.



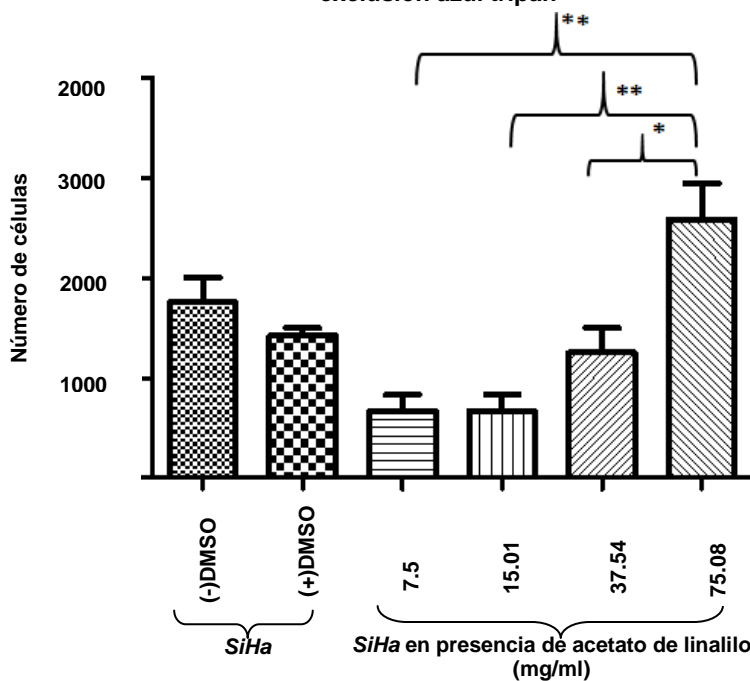
**Gráfica 3. CL<sub>50</sub> del acetato de linalilo en *E. coli*.**



#### 8.4 Citotoxicidad del acetato de linalilo en células *SiHa* observado con el colorante azul tripán.

En las gráficas 4, 5 y 6 se observa la cantidad de células durante las 24, 48 y 72h en interacción con acetato de linalilo. Mostrando una tendencia a incrementar la cantidad de células con respecto al aumento de la concentración del compuesto utilizado en las diferentes diluciones, se observa un mayor número de células significativo con la mayor concentración utilizada del compuesto (75.08mg/ml) en comparación con la menor concentración (7.05mg/ml), así mismo existe una diferencia significativa a las 24 y 48h de la mayor dilución del compuesto (75.08mg/ml) respecto a la dilucion menor (7.5mg/ml) con una significancia de 0.1 y un nivel de confianza de 95%. Para las 72h no existió diferencia significativa con valor de .062 entre las diferentes concentraciones .Por otro lado los controles con DMSO muestran no tener efecto citotxico significativo en ninguno de los casos. Observandose el acetato de linalilo favorable para la viabilidad de esta linea celular.

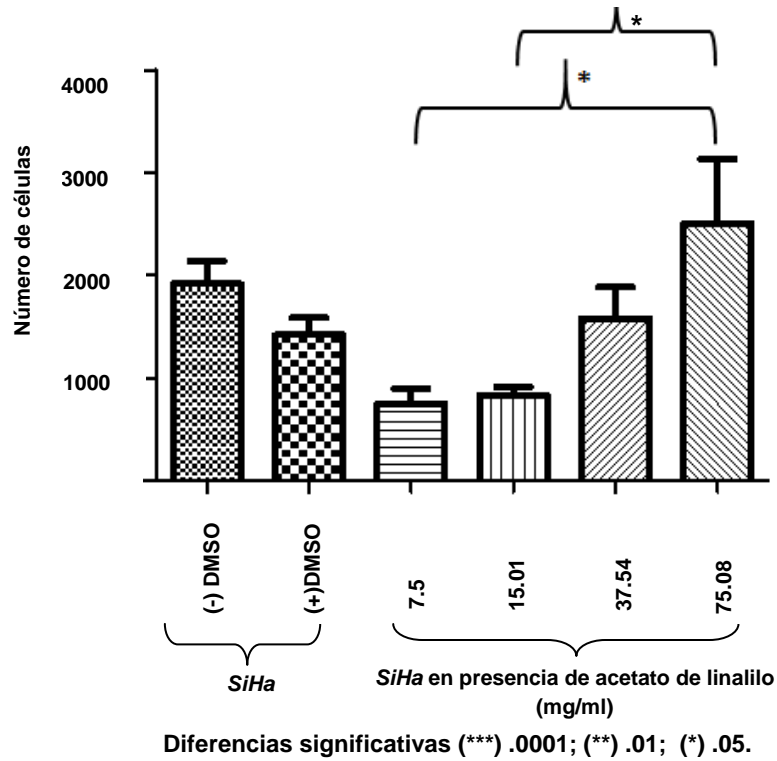
Gráfica 4. Viabilidad de células *SiHa* a las 24h con uso de colorante de exclusión azul tripán



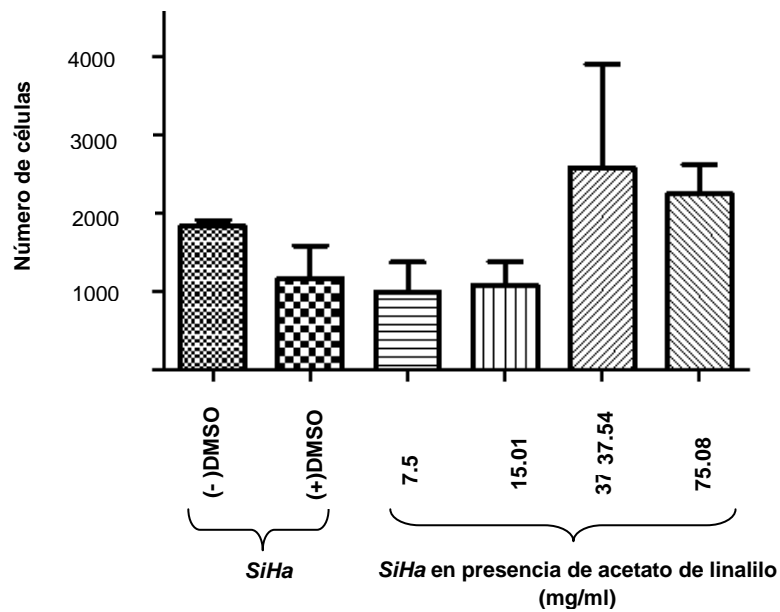
Diferencias significativas (\*\*\*) .0001; (\*\*) .01; (\*) .05.



Gráfica 5. Viabilidad de células *SiHa* a las 48h con uso de colorante de exclusión azul tripán



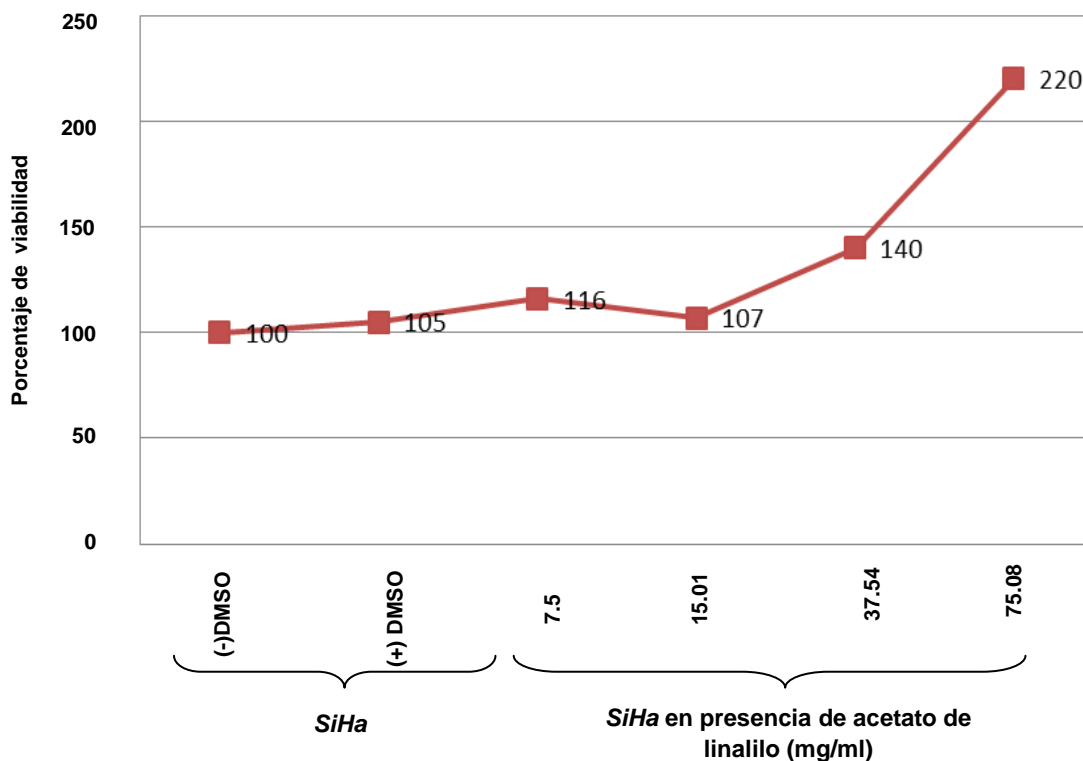
Gráfica 6. Viabilidad de células *SiHa* a las 72h con uso del colorante de exclusión azul tripán



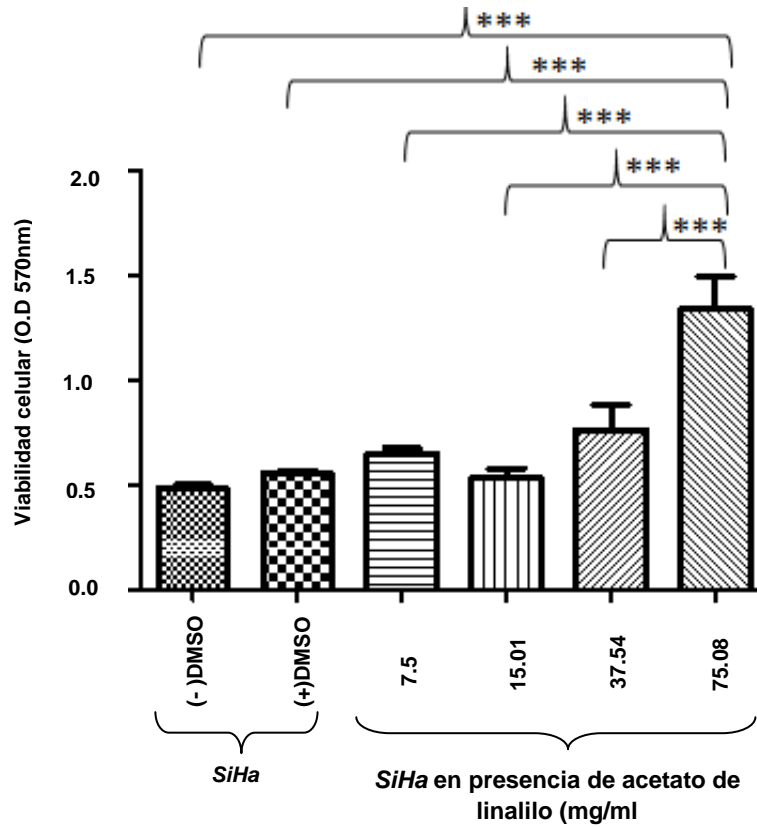
### 8.5 Citotoxicidad del acetato de linalilo en células *SiHa* observado con prueba fotocolorimétrica en presencia de MTT.

La curva dosis respuesta del porcentaje de células metabólicamente viables se observa en la gráfica 7 y 8 coincidiendo con lo reportado anteriormente con el uso del colorante de exclusión azul tripán, los valores de absorbancia obtenidos en la lectura de placa de 24 pozos muestra la tendencia, a mayor cantidad de compuesto mayor viabilidad metabólica celular, se observa una cantidad significativa mayor de .0001 de células viables con 75.08mg/ml de acetato de linalilo con respecto a las células control; Por lo que el acetato de linalilo muestra un efecto proliferativo en la línea celular *SiHa*.

**Gráfica 7. Curva dosis respuesta del porcentaje de la viabilidad metabólica de las células *SiHa* respecto a las concentraciones utilizadas de acetato de linalilo**



Gráfica 8. Viabilidad de células *SiHa* en interacción con acetato de linalilo a las 72h con uso de la prueba colorimétrica MTT

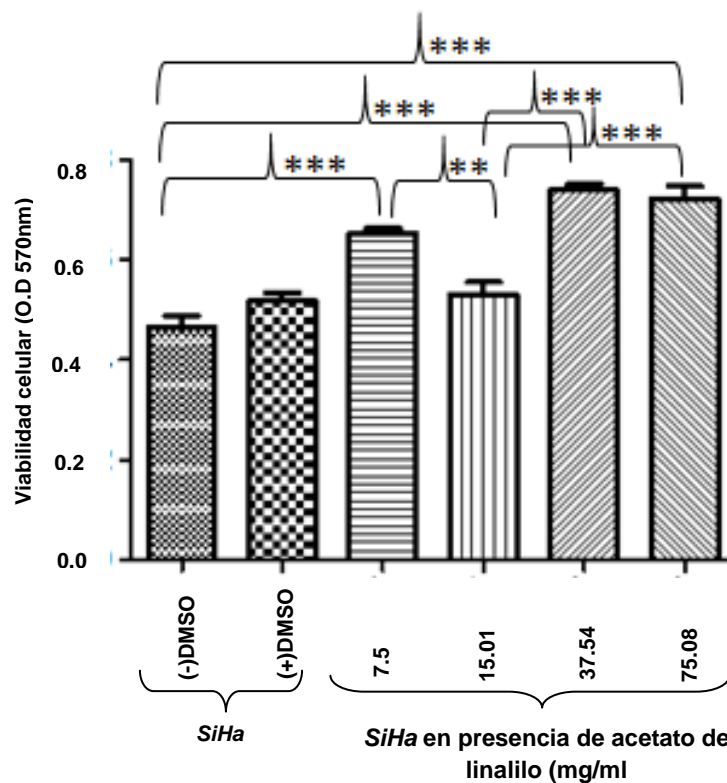


Diferencias significativas (\*\*\*) .0001; (\*\*) .01; (\*) .05.

## 8.6 Citotoxicidad del acetato de linalilo en línea celular *HatCaT* observado con prueba fotocolorimétrica en presencia de MTT

En la gráfica 9 se muestra el efecto del acetato de linalilo en las células *HatCaT*, se observa que a mayor concentración del compuesto aumenta el número de células, mostrando una diferencia significativa de .0001 entre las células control y la concentración de 75.08mg/ml

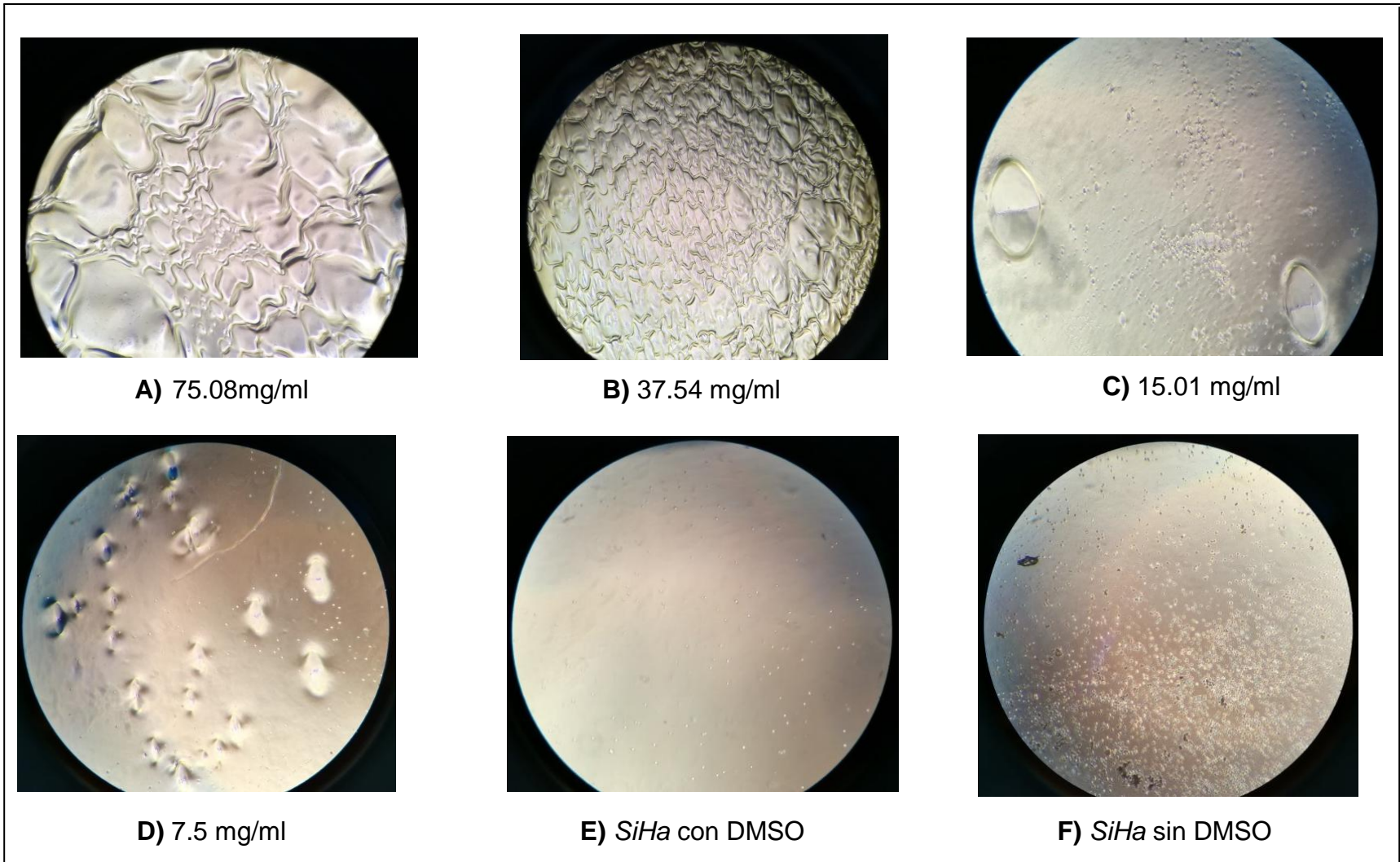
Gráfica 9. Viabilidad de células *HatCaT* en interacción con acetato de linalilo a las 72h con uso de la prueba colorimétrica MTT



Diferencias significativas. (\*\*\*) .0001; (\*\*) .01; (\*) .05.

### **8.7 Microscopia de las células *SiHa* en interacción con acetato de linalilo**

Se observaron al microscopio de campo claro las células *SiHa* contenidas en la placa de 24 pozos, cada uno con las diferentes concentraciones del compuesto, y se obtuvo una mezcla homogénea del compuesto en el medio descartando la formación de micelas. A partir de 15.01mg/ml se aprecian a las células rodeadas por el compuesto (Ver figura 17).



**Figura 17. Células *SiHa* en interacción con el acetato.** Células *SiHa* observadas en microscopio de campo claro a un aumento de 40x. La flecha indica las células rodeadas por el compuesto.

## IX. Discusión

El vestigio del implemento de sustancias de origen natural como tratamiento ante enfermedades de etiología infecciosa se encuentra desde hace poco más de 60,000 años, sin embargo eran empleadas desde el punto de vista empírico, posteriormente comenzó la investigación científica de las propiedades antimicrobianas de las plantas para fines terapéuticos. Sin embargo a pesar de las aproximadamente 250,000 especies de plantas utilizadas por su actividad biológica, únicamente del 5 al 15% han sido estudiadas con el objetivo de lograr ser consideradas como tratamiento farmacológico ante algunas enfermedades, o bien procesar de manera sintética alguno de sus componentes principales<sup>66</sup>.

Como es el caso del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray así como alguno de sus compuestos mayoritarios, planta que ha sido utilizada de diversas maneras basadas en conocimiento empírico, como baños de infusión utilizando su raíz para el tratamiento de problemas estomacales o entuertos, o en otros casos usaban tallos, hojas y flores de esta planta contra infecciones de la piel, respiratorias o incluso para infecciones en los ganados, por lo que actualmente ha sido estudiada de manera científica siendo objeto de estudio en esta investigación<sup>66, 67, 78, 69, 70, 71</sup>.

Se han logrado identificar de la especie *Chrysactinia mexicana* Gray 17 compuestos mayoritarios por cromatografía de gases y espectrometría de masas, de los cuales eucaliptol (41,3%), piperitona (37,7%) y acetato de linalilo (9,1%) fueron los que se observaron en mayor proporción. De ahí que diferentes investigadores decidieron continuar con el estudio de las propiedades antimicrobianas de esta género encontrando actividad antifúngica en los diferentes extractos obtenidos por percolación y maceración de esta planta sobre *Aspergillus flavus* Link, con varianzas en las dosis respecto a los diferentes métodos de extracción, ya que se ha demostrado que dependiendo el método de extracción la cantidad de

compuestos presentes será diferente y por lo tanto las propiedades funcionales también se reflejarán distintas.<sup>8, 72</sup>

Mismo caso con la investigación por Salazar R. y cols en donde probaron los extractos de las hojas, tallos, raíces flores y corteza de *Chrysactinia mexicana* Gray obtenidos de manera independiente por maceración directa con metanol, mostrando no tener efecto fungicida sobre *C. albicans*.<sup>73</sup>

Mendoza C. en el año 2016 demostró la actividad antifúngica del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre aislados clínicos de *C. albicans* en ensayos de 24h en donde se observó inhibición en su crecimiento a concentraciones superiores a las utilizadas en este estudio, esto podría deberse a la exposición de los aislados clínicos a diversos fármacos, generando una posible resistencia, tal como lo sugiere Selmecky A y cols, en donde menciona que *C. albicans* ha evolucionado en sus mecanismos de defensa, no solo para tolerar sino también para generar la variación genética a gran escala como medio de adaptación.<sup>74, 75</sup>

Por otro lado *C. albicans* mostró tener mayor resistencia en fase estacionaria que en fase logarítmica a la exposición del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray, lo que podría explicarse con lo reportado por Takeo K. en donde induce la deformación de la membrana plasmática de *C. albicans* a través del antibiótico filipina en ambas fases, demostrando en fase logarítmica numerosas protuberancias de aproximadamente 30nm de diámetro, además de la deformación de las membranas vacuolares, mientras que en fase estacionaria la membrana plasmática no muestra cambios apreciables, deduciendo un posible acoplamiento denso de proteína en la membrana plasmática en fase estacionaria a un tipo de restricción hasta el momento desconocido.<sup>76</sup>

Dentro de las investigaciones previas de aceites esenciales, se encuentra también reportado el efecto antifúngico de *Melaleuca alternifolia* conocida también como árbol de té, siendo efectiva principalmente en *C. albicans*.<sup>20</sup>



Está comprobado que acetato de linalilo es uno de los dos compuestos que se encuentran en mayor proporción (37.34%) en el aceite esencial de *Lavandula angustifolia* el cual fue probado en seis hongos diferentes, mostrando nulo efecto antifúngico e incluso favoreció el desarrollo de *Penicillium italicum*, hongo que afecta a cultivos y frutas, resultados contrarios a los encontrados en esta investigación con el uso del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray<sup>20, 76</sup>

Blasko A. y cols probaron los componentes mayoritarios de *Salvia sclarea*, acetato de linalilo (57.94%) y linalool (24.1%) sobre *C. albicans* a través del ensayo de microdilución utilizado de igual forma en nuestra investigación, en donde determinaron la CMI al 80% a concentraciones parecidas a las usadas en este estudio, mostrando su efecto fungicida. Además identificaron que el acetato de linalilo retraso 5h la entrada a fase logarítmica, por lo que el efecto fungicida del acetato de linalilo es altamente reproducible.<sup>64</sup>

Por otro lado, los aceites esenciales se constituyen principalmente por terpenoides (grupo al que pertenece el acetato de linalilo), a los cuales se les atribuye particularmente la actividad antimicrobiana, siendo los responsables del compromiso de la integridad estructural y funcional de las membranas bacterianas, lo que podría explicar el efecto encontrado del acetato de linalilo utilizado en nuestro estudio.<sup>77</sup>

Carson C. et al en el año 1920 identificaron que acetato de linalilo causó lisis de las células de *E.coli* (bacteria gramnegativa) resultado contrario en *S.aureus* (bacteria grampositiva), a diferencia de un estudio en el que se probaron los aceites esenciales de romero, cúrcuma y tomillo en este último encontrando dentro de sus compuestos mayoritario a acetato de linalilo en el que no demostraron ningún efecto significativo sobre bacterias gramnegativas entre ellas *E.coli* a diferencia de las bacterias grampositivas como *S. aureus* observando un porcentaje de inhibición de un 60%, lo que

difiere con los resultados de nuestro estudio en donde acetato de linalilo inhibió el crecimiento de *E. coli* hasta en un 77%. Estos resultados muestran el efecto de acetato de linalilo solo y en interacción con otros compuestos dentro de los aceites esencial, en donde se puede observar que los efectos potenciadores o inhibidores de este compuesto podrían depender de los metabolitos secundarios con los que se relaciona<sup>77</sup>.

Carson C. y cols demostraron el mecanismo de acción de diversos compuestos probados en *E. coli*, relacionados con los efectos dañinos a la membrana bacteriana como resultado de la interacción de los compuestos de los aceites esenciales (en su mayoría con los terpenos), perturbando a la homeostasis particularmente a la respiración dependiente de glucosa y finalmente afectando su morfología permitiendo la pérdida de material intracelular.<sup>77</sup>

En otra investigación sobre los mecanismos de acción del acetato de linalilo se encuentra lo reportado por Trombetta y cols, en donde muestran el efecto de tres monoterpenos, mentol, timol y acetato de linalilo sobre *S. aureus* y *E. coli* y sugieren que la actividad antimicrobiana de los monoterpenos entre los que se encuentran acetato de linalilo, puede ser el resultado del daño de la fracción lipídica de la membrana plasmática, al evaluar la liberación de un marcador fluorescente de vesículas unilaminares con diferentes composiciones lipídicas, lo que podría explicar el mecanismo de acción del acetato de linalilo sobre la cepa de *E. coli*.<sup>78</sup>

Se han observado mayores efectos en microorganismos en fase logarítmica en comparación con los que se encuentran en fase estacionaria, esto se puede explicar debido a algunas investigaciones sobre *E. coli* en fase estacionaria en donde se observa que el volumen del espacio periplasmático aumenta en relación al espacio citoplasmático, ya que en la pared aumenta el grosor del peptidoglicano, mientras que en la membrana externa aumenta la cantidad de lipopolisacáridos o endotoxinas. En general

la regularización en su metabolismo, el mayor aprovechamiento de compuestos y la osmoprotección, así como la remodelación de la envoltura celular y la expresión diferencial de genes contribuyen a que las células en fase estacionaria se vean favorecidas en cuanto a su viabilidad mostrando mayor resistencia a diversos factores de estrés. Por su parte los ensayos de *E. coli* en nuestro estudio muestran la sensibilidad al acetato de linalilo hasta las 6h, lo que cobra gran importancia realizar ensayos en fase estacionaria para observar el comportamiento y comprobar si efectivamente muestra resistencia a las mismas concentraciones<sup>79</sup>.

Lo anteriormente mencionado muestran algunos de los múltiples fines y usos de los compuestos derivados de las plantas, sin embargo existen otros grandes ejemplos como es el caso de paclitaxel y docetaxel diterpenos aislados de la corteza de *Taxus brevifolia* dicha corteza ha sido utilizada por las tribus norteamericanas como desinfectantes, para provocar el aborto y contra el cáncer de piel, por lo que se realizaron estudios para aislar estos dos compuestos y posteriormente observar su toxicidad en células de leucemia, nombrando a uno de los compuestos Taxol, medicamento actual utilizado en 1993 en el tratamiento del cáncer de ovario, de pulmón, sarcoma de Kaposi, y cáncer de mama.<sup>80</sup>

Otros compuestos extraídos de plantas que con modificaciones sintéticas en la actualidad son utilizados con fines terapéuticos se encuentran la Vinblastina y Vincristina (Oncovir), esta última empleada con otros medicamentos para tratar leucemia linfocítica infantil aguda, cáncer cervicouterino, de colon, de mama, entre otros carcinomas<sup>81</sup>.

Regon G. et al en el año 2008 probaron 16 extractos metanólicos de diversas plantas del estado de Yucatán en las líneas celulares *SiHa*, *HeLa*, *KB*, *Hep-2*, evaluados de igual manera a través de método, en el que observaron un efecto citotóxico de 12 compuestos en las células *SiHa*, resultados contrarios a los obtenidos en nuestra investigación.<sup>82</sup>

De igual manera García L. et al en el año 2010 encontraron que un extracto del orujo de uva mostro un efecto antiproliferativo sobre la línea celular *SiHa* a través del método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo. (DPPH) <sup>83</sup>. Se sabe que los compuestos utilizados en la actualidad como tratamientos contra diversos carcinomas son alcaloides que se unen a la tubulina evitando la polimerización de los dímeros de tubulina evitando la formación de los microtúbulos, indispensables para la formación del huso en la célula que entrará en mitosis, mecanismo de acción que se le atribuye a algunos de los extractos con efecto antiproliferativo.<sup>84</sup>

Contrario a lo encontrado en este estudio que lejos de tener un efecto antiproliferativo, favorece la proliferación de las células, por la motivo cobra una importante relevancia al estudio de los metabolitos de las plantas para garantizar una práctica de la medicina tradicional segura, libre de riesgos.

Al realizar un análisis con acetato de linalilo *in silico* con la predicción de los espectros de actividad para las sustancias (por sus siglas en ingles *PASS*) (Way2drug, 2011) se encontró que el acetato de linalilo pudiera funcionar como estimulante del factor de transcripción NF Kappa B, con un valor de 0.661, siendo que mientras más cercano se encuentre el valor a 1.0 más probabilidades tiene de realizar esta función. Por lo tanto si actúa a nivel de este factor, se relaciona con la supervivencia de la célula, ya que diversos autores han descrito el papel del NF-κB en la inhibición de la apoptosis o muerte celular programada, la cual se lleva a cabo a través de la secreción de una serie de proteínas antiapoptóticas, las cuales subsisten el ciclo celular, como resultado la inflamación crónica y la sobreestimulación del NF-κB logran causar desarrollo y crecimiento celular incontrolado, lo que podría explicar el comportamiento de la línea celular *SiHa* y *HatCat*.<sup>85</sup>

Existen pocos datos del efecto de acetato de linalilo sobre líneas celulares, por lo que es necesario continuar con investigaciones acerca de su efecto.

## X. Conclusiones

El aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray tiene efecto antifúngico en *C. albicans* en fase logarítmica, fase estacionaria y en los ensayos de 24h, siendo más resistente en fase estacionaria.

El acetato de linalilo tiene efecto antifúngico sobre *C. albicans* en ensayos de 24h, fase estacionaria y fase logarítmica.

El acetato de linalilo tiene efecto bactericida sobre *E.coli*.

El acetato de linalilo no tiene efecto antiproliferativo sobre la línea celular de cáncer cervicouterino (*SiHa*).

## XI.Perspectivas

- Analizar la composición química del lote del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray a través de cromatografía de gases y espectrometría de masas
- Realizar ensayos de *E. coli* en fase estacionaria con el aceite esencial y acetato de linalilo.
- Probar el efecto del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray sobre células *SiHa* y *HaTCaT*.

## XII. Referencias bibliográficas

- 1- Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. [Internet]. Catalogación por la Biblioteca de la OMS. 2013 [consultado Octubre 16 2016]. Disponible en: <https://www.ukessays.com/search.php?q=http%3A%2F%2Fapps.who.int%2Fmedicinedocs%2Fdocuments%2Fs21201es%2Fs21201es.pdf&sa=>
- 2- Moron F, Jardines J. La medicina tradicional en las universidades médicas. Rev Cubana Plant Med [Internet]. 1997 [Consultado Octubre 16 2016];2(1):5. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47961997000100008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47961997000100008)
- 3- OMS | Medicina tradicional: definiciones [Internet]. Who.int. 2016 [Consultado Octubre 20 2016]. Disponible en: [http://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/)
- 4- Stashenko E. Aceites esenciales. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander; 2009.
- 5- Introducción a la Industria de los Aceites Esenciales extraídos de Plantas Medicinales y Aromáticas [Internet]. Sistema de biblioteca SENA. 2003 [consultado Octubre 25 2016]; Disponible en: [http://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/1144/1/Aceites\\_Esenciales\\_Extraidos\\_De\\_Plantas\\_Medicinales\\_Y\\_Aromaticas.Pdf](http://repositorio.sena.edu.co/bitstream/11404/1144/1/Aceites_Esenciales_Extraidos_De_Plantas_Medicinales_Y_Aromaticas.Pdf)
- 6- Bakkali F, Averbeck S. Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology. 2008; 46: 447-453.
- 7- Martínez, M. Las Plantas Medicinales De México, 6th Ed.; Ediciones Botas: Mexico, D.F., Mexico, 1968; Pp 136-137.
- 8- Cárdenas N. Actividad antifúngica de seis plantas sobre *Aspergillus flavus* Link. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2005; 36 (3): 21-25.
- 9- Paulo A, Duarte A, Gomes E. In vitro antibacterial screening of *Cryptolepis sanguinolenta* alkaloids. Journal of Ethnopharmacology. 1994; 44 (2):127-130.
- 10- Nascimento G, Locatelli J, Freitas P, Silva G. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Brazilian Journal of Microbiology. 2006; 31(4).
- 11- Stashenko E. Aceites esenciales. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander; 2009.
- 12- Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2017 [consultado Noviembre 3 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- 13- CANDIDIASIS - Recursos en Micología - UNAM [Internet]. Facmed.unam.mx. 2016 [consultado Noviembre 3 2016]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/candidosis.html>
- 14- Mandras N, Nostro A, Roana J. Liquid and vapour-phase antifungal activities of essential oils against *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida*. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2016; 16(1):1-5.

- 15- Infecciones por *escherichia coli* - Recursos en Bacteriología - UNAM [Internet]. Facmed.unam.mx. 2015 [consultado Noviembre 15 2016]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>
- 16- E. coli [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2016 [consultado Noviembre 23 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- 17- Cuéllar Ponce de León L. Infecciones en huéspedes inmunocomprometidos. Revista Médica Herediana. 2013; 24 (2): 156.
- 18- GLOBOCAN Cancer Fact Sheets: Cervical cancer [Internet]. Globocan.iarc.fr. 2012 [consultado Noviembre 24 2016]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>
- 19- Salud S. Programa de Acción Específico Prevención y Control del Cáncer de la Mujer 2013 - 2018 [Internet]. gob.mx. 2015 [consultado Noviembre 26 2016]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/programa-de-accion-especifico-prevencion-y-control-del-cancer-de-la-mujer-2013-2018-9275>
- 20- Victores Monroy A. Estudio de una formulación fitoterapéutica para aplicación tópica con aceite esencial del Árbol del Té (*Melaleuca alternifolia*). [Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México; 2012.
- 21- Pemán J e. Antifungal drug resistance mechanisms. - PubMed - NCBI [Internet]. Ncbi.nlm.nih.gov. 2009 [consultado Noviembre 28 2016]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400764>
- 22- Pozuelo de Felipe M. Búsqueda de nuevas dianas antifúngicas: Identificación y caracterización de genes esenciales de *Saccharomyces cerevisiae* [Doctorado]. Universidad complutense de Madrid; 1998.
- 23- Cortés J, Reyes P. Clinical and epidemiological characteristics and risk factors for mortality in patients with candidemia in hospitals from Bogotá, Colombia. The Brazilian Journal of Infectious Diseases. 2014; 1 8(6):631-637.
- 24- Cortés J, Jaimes J, Leal A. Incidencia y prevalencia de candidemia en pacientes críticamente enfermos en Colombia. Revista chilena de infectología. 2013; 30 (6): 599-604.
- 25- Salavert Lletí M, Jarque Ramos I, Pemán García J. Los aspectos epidemiológicos cambiantes de la candidemia y sus implicaciones clinicoterapéuticas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2006; 24:36-45.
- 26- Court P, Liu H, Parker J. Proper Sterol Distribution Is Required for *Candida albicans* Hyphal Formation and Virulence. Genes|Genomes|Genetics. 2016 [Consultado Noviembre 30 2016]; 11(6):1-5.
- 27- Enfermedades diarreicas [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2017 [consultado Mayo 13 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>



- 28- BORIE C, MONREAL Z. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. Archivos de medicina veterinaria. 1997; 29 (2): 1-6.
- 29- Metodología de la medición de pobreza en México | CONEVAL [Internet]. Coneval.org.mx. 2008 [consultado Mayo 18 2017]. Disponible en: <http://www.coneval.org.mx/Medicion/MP/Paginas/Metodologia.aspx>
- 30- Tobar A E, Olivares C R. Candidiasis invasoras en el paciente crítico adulto. Revista chilena de infectología. 2011; 28(1):41-49.
- 31- Cuéllar Ponce de León L. Infecciones en huéspedes inmunocomprometidos. Revista Médica Herediana. 2013; 24(2):156.
- 32- Hidalgo Martínez A. El cáncer cérvico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna. Rev Biomed. 2018; 15(4):81-83.
- 33- García López J. conteo bacteriano en órganos del aparato digestivo de pollos infectados con *Salmonella typhimurium* CON ADICIÓN DE EXTRACTO DE *Chrysactinia mexicana* [Maestría]. Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 2009.
- 34- Quimioterapia para cáncer de cuello uterino [Internet]. Cancer.org. 2016 [consultado Junio 12 2017]. Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/tratamiento/quimioterapia.html>
- 35- Tratamiento del cáncer [Internet]. National Cancer Institute. 2015 [consultado septiembre 13 2017]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento>
- 36- Rueda X, Galvis L. Composición química y actividad biológica de aceites esenciales de *Calycolpus moritzianus* recolectado en el Norte de Santander, Colombia [Internet]. Revistas.uis.edu.co. 2010 [consultado septiembre 17 2017]. Disponible en: <http://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/696>
- 37- Rivas Morales C, Oranday Cárdenas M. Investigación en plantas de importancia médica. Nuevo León; 2016.
- 38- Ávalos García A, Pérez E. Metabolismo secundario de plantas. Reduca. 2010; 3 (2): 119-128.
- 39- Biasoli M. Candidiasis [Internet]. 2010 [consultado 29 June 2017]. Disponible en: [http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/materiales\\_2013/teoricos\\_2013/candidiasis\\_2013-1.pdf](http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/materiales_2013/teoricos_2013/candidiasis_2013-1.pdf)
- 40- *Candida albicans* [Internet]. Hongos-alergenicos.reviberoammicol.com. 2010 [consultado septiembre 23 2017]. Disponible en: <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/025.PDF>
- 41- De la calle Rodríguez N, Santa Velez C. Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados Por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. CES Medicina. 2012; 26 (1):43-47.
- 42- Bermejo Pulido G. Mecanismos de regulacion del represor Nrg1 en *C. albicans* [Doctorado]. Universidad de extremadura; 2015.

- 43- Hube B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. *Current Opinion in Microbiology* [Internet]. 2004 [consultado septiembre 15 2017];7(4):336-341. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15288621>
- 44- Bachewich C, Whiteway M. Morphogenesis in *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol*. 2007;61(2):10.1146/annurev.micro.61.080706.093341.
- 45- OPS/OMS México - Atlas de ITS. Manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento [Internet]. Paho.org. 2007 [consultado octubre 28 2017]. Disponible en: [http://www.paho.org/mex/index.php?option=com\\_docman&view=document&layout=default&alias=106-atlas-de-its-manifestaciones-clinicas-diagnostico-y-tratamiento&category\\_slug=ops-oms-mexico&Itemid=493](http://www.paho.org/mex/index.php?option=com_docman&view=document&layout=default&alias=106-atlas-de-its-manifestaciones-clinicas-diagnostico-y-tratamiento&category_slug=ops-oms-mexico&Itemid=493)
- 46- Perea E. Infecciones del aparato genital femenino: vaginitis, vaginosis y cervicitis [Internet]. Facmed.unam.mx. 2010 [consultado octubre 28 2017]. Disponible en: [http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Vaginitis\\_vaginosis\\_cervicitis\\_Medicine2010.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Vaginitis_vaginosis_cervicitis_Medicine2010.pdf)
- 47- Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública* [Internet]. 2018; 49 (5): 1-5.
- 48- Borie. C, Monreal Z. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. *Archivos de medicina veterinaria*.1997; 29 (2).
- 49- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia Coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(2): 123-140
- 50- Cunningham M., Fujinami R.. *Effects Of Microbes On The Immune System*. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins; 2000
- 51- Molina López J. Generalidades de bacterias - Recursos en Bacteriología - UNAM [Internet]. Facmed.unam.mx. 2015 [consultado Octubre 31 2017]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/generalidades.html>
- 52- Griffin P., Tauxe R. The Epidemiology Of Infections Caused By *Escherichia Coli*, And The Associated Hemolytic Uremic Syndrome, *Epidemiol. Rev.* 13: 60-98
- 53- Vidal J. *Escherichia Coli* Enteropatógena (EPEC): Una Causa Frecuente De Diarrea Infantil. *Salud en Tabasco*. 2003; 9(1): 189-192.
- 54- NIH. Cáncer en español [Internet]. National Cancer Institute. 2012 [consultado octubre 30 2017]. Available from: <https://www.cancer.gov/espanol>
- 55- Garza Ocañas L. Citotoxicidad in vitro: Estudio del potencial de diversas líneas celulares de la evaluación de toxicidad de sustancias [Doctorado]. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2000.

- 56- Juárez J. La sobreexpresión de los Genes Id es un marcador de progresión del cáncer cervicouterino. [Internet]. Repositorio.ipicyt.edu.mx. 2005 [consultado Octubre 30 2017]. Disponible en: <https://repositorio.ipicyt.edu.mx/handle/11627/215>
- 57- Vázquez G. Análisis de expresión global del cáncer cérvico uterino: rutas metabólicas y genes alterados. Rev invest clín. 2005; 57 (3):1-4.
- 58- Peropadre López A. Estudio in vitro de las respuestas celulares asociadas con la exposición a contaminantes emergentes [Doctorado]. Universidad Autónoma de Madrid; 2014
- 59- Cassani J, Alberto Ferreyra-Cruz O. Antidepressant-like and toxicological effects of a standardized aqueous extract of *Chrysactinia mexicana* A. Gray (Asteraceae) in mice. Journal of Ethnopharmacology. 2017;171:295-306.
- 60- Villaseñor J. El género *Chrysactinia* (Asteraceae, tribu Tageteae) en México. Rev Mex Biodiv. 2018; 80(1).
- 61- Zavala-Mendoza D, Grasa L. Antispasmodic Effects and Action Mechanism of Essential Oil of *Chrysactinia mexicana* A. Gray on Rabbit Ileum. Molecules. 2016; 21 (6):783.
- 62- Cárdenas N. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* gray. J Agric Food Chem. 2005; 53 (1).
- 63- Yepes A, Buckeridge M. Respuestas De Las Plantas Ante Los Factores Ambientales Del Cambio Climático Global - Revisión. Colombia Forestal. 2011;14 (2): 213.
- 64- Blasko A. Effects of clary sage oil and its main components, linalool and linalyl acetate, on the plasma membrane of *Candida albicans*: an in vitro EPR study. Apoptosis. 2016; 22 (2): 175-187
- 65- CAS No. 115-95-7 | Sigma-Aldrich [Internet]. Sigmaaldrich.com. 2018 [consultado Diciembre 21 2017]. Disponible en: [https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=115-95-7&interface=CAS%20No.&N=0&mode=partialmaxfocus=product&lang=es&region=MX&focus=product&gclid=CjwKCAjwhcjVBRBHEiwAoDe5x6wEVnb4QhA8NGHuFxBN2atnZqoKySJOU712XBWUj3wqlcOzgGgt7hoCXUwQAvD\\_BwE](https://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?term=115-95-7&interface=CAS%20No.&N=0&mode=partialmaxfocus=product&lang=es&region=MX&focus=product&gclid=CjwKCAjwhcjVBRBHEiwAoDe5x6wEVnb4QhA8NGHuFxBN2atnZqoKySJOU712XBWUj3wqlcOzgGgt7hoCXUwQAvD_BwE)
- 66- Biblioteca digital de la medicina tradicional. [Internet]. Medicinatradicionalmexicana.unam.mx. 2010 [consultado Noviembre 3 2017]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php>
- 67- Cervantes M. Las zonas áridas y semiáridas de México [Internet]. Fenix.cichcu.unam.mx. 1996 [consultado Noviembre 3 2017]. Disponible en: [http://fenix.cichcu.unam.mx/libroe\\_2006/0965822/05\\_c01.pdf](http://fenix.cichcu.unam.mx/libroe_2006/0965822/05_c01.pdf)
- 68- Reyes F. Vapores de aceites esenciales: alternativas antimicrobianos naturales. Temas selectos de ingeniería de alimentos. 2012; 6(1): 29-33.

- 69- Villavicencio Ó. La fitoterapia a través del tiempo [Internet]. Bvsde.paho.org. 1992 [consultado Noviembre 5 2017]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap1.pdf>.
- 70- Uruburu F. La Sociedad Española de Microbiología y el aseguramiento de la calidad microbiológica [Internet]. semicrobiología. 2010 [consultado Noviembre 4 2017]. Disponible en: <https://www.bing.com/cr?IG=CCFE51A798A64722983C8EEAFF31922C&CID=10BB32C1CEDB63E211F93949CF7462D1&rd=1&h=IQTwlhgu3UR9-bTMjasivEcYLDdYzWLo7E25AEmKptE&v=1&r=https%3a%2f%2fsemicrobiologia.org%2fpdf%2factualidad%2fSE>
- 71- Flores Vargas G. Análisis del perfil metabólico en Carica papaya durante estrés generado por sequía [Maestría]. Centro de Investigación Científica en Yucatán A.C; 2017.
- 72- Márquez Camarena M. Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica [Internet]. Riunet.upv.es. 2015 [consultado Noviembre 6 2017]. Disponible en: <https://riunet.upv.es/handle/10251/62057>
- 73- Salazar-Aranda R, Pérez-López L. Antimicrobial and Antioxidant Activities of Plants from Northeast of Mexico. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2011;2011:1-6.
- 74- Mendoza C. Efecto del aceite esencial de *Chrysactinia mexicana* Gray en aislados clínicos de *Candida albicans* de mujeres con neoplasia intrapitelial cervical [Licenciatura]. Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 2016.
- 75- Cruz S, Díaz P. Genome of *Candida albicans* and drug resistance. Salud Uninorte. 2017;33(3):438-450.
- 76- Takeo K. Resistance of the stationary phase plasma membrane of *Candida albicans* to filipin induced deformation. FEMS Microbiology letters. 1985; 27(1): 73-77
- 77- Carson C, Mee B. Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002; 46(6):1914-1920.
- 78- Trombetta D, Castelli F. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2005; 49(6):2474-2478.
- 79- Ramírez J. La fase estacionaria en la bacteria *Escherichia coli*. Revista Latinoamericana de microbiología [Internet]. 2005 [consultado Julio 13 2017];47(4):92-98.
- 80- Coy Barrera C, Eunice Acosta G. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. Rev Cubana Plant Med. 2013; 18 (2):1-5.
- 81- García R, Palou E. mecanismos de acción antimicrobina de timol y carvacol sobre microorganismos de interés en alimentos. Temas selectos de0020ingeniería de alimento. 2008; 2 (2): 41-48.

- 82- Mena-Rejon G, Caamal-Fuentes E. In vitro cytotoxic activity of nine plants used in Mayan traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; 121(3):462-465.
- 83- García L. Actividad biológica de un extracto de orujo de uva mexicana. *Redalyc*. 2010;41 (4):28-33.
- 84- Shu, Y.Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Natural Products*, 61(8), 1053-1071. <http://doi.org/10.1021/np9800102>
- 85- Escárcega R. El factor de transcripción nuclear kappa en las enfermedades humanas. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2010;1(48):55-57.