

2002-A

090271725

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIÓLOGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. (romero) EN LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y EN LA RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA CONTRA *Candida albicans* RESISTENTE AL FLUCONAZOL

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLÓGIA
PRESENTA
GLORIA NAZDIRA ABURTO CANSINO

LAS AGUJAS, ZAPOPAN, JAL., MARZO DE 2003.

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
 PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN DE LA
 DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
 CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
 DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
 P R E S E N T E:

Por este conducto me permito poner a su consideración mi anteproyecto de titulación en la modalidad: Tesis

Titulado **EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. (romero) EN LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA Y EN LA RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA CONTRA *Candida Albicans* RESISTENTE AL FLUCONAZOL.**

el cual se anexa, para que sea turnado al Comité de Titulación de esta dependencia para su revisión y en su caso aprobación.

Asimismo pongo a su consideración a:

M. en C. Blanca Miriam de Guadalupe Torres Mendoza
 como Director de Tesis. Así mismo, como asesor (No indispensable, opcional) a:
 Dr. en C. Luis Huacuja Ruiz

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para reiterarle mi consideración más distinguida

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., 22 de agosto del 2002

Vo.Bo.

El Director
 NOMBRE Y FIRMA

Blanca Miriam de Guadalupe Torres Mendoza
 M. en C. Blanca Miriam Torres Mendoza

El Alumno
 NOMBRE Y FIRMA

Glوريا Nazajma Abusro Cansino
 Gloria Nazajma Abusro Cansino

El Asesor

Luis Huacuja Ruiz
 Dr. en C. Luis Huacuja Ruiz

El Asesor

Eduardo Vázquez Vallés
 M. en C. Eduardo Vázquez Vallés

COMITÉ DE
 TITULACIÓN



[Firma]
 RECIBIDO

8-11-02

EXCLUSIVO COMISION DE TESIS

SINODALES	APROBADO	FECHA
1. DR. ARTURO OROZCO BAROCCO	<i>[Firma]</i>	8/NOV 2002
2. DR. EDUARDO VAZQUEZ VALLS	<i>[Firma]</i>	11/11/02
3. Q.F.B. ADOLFO CARDENAS ORTEGA	<i>[Firma]</i>	29/10/02
SUPL. Q.F.B. MARGARITA BONILLA MORENO	<i>[Firma]</i>	2 NOV. 2002.

C. DRA. MÓNICA ELIZABETH RIOJAS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E.

Forma C

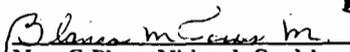
Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de titulación TESIS que realizó la pasante: **GLORIA NAZDIRA ABURTO CANSINO** con código 090271725 con el título: "**EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis L.* (romero) EN LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y EN LA RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA CONTRA *Candida albicans* RESISTENTE AL FLUCONAZOL**", Consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y, en su caso, programación de examen respectivo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 7 de febrero del 2003.

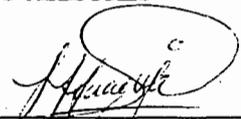
EL DIRECTOR DEL TRABAJO


M. en C. Blanca Miriam de Guadalupe
Torres Mendoza
NOMBRE Y FIRMA



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

LOS ASESORES


Dr. en C. Luis Huacuja Ruiz
NOMBRE Y FIRMA

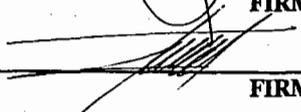

M. en C. Eduardo Vázquez Valls
NOMBRE Y FIRMA

SINODALES

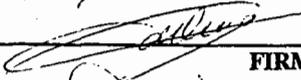
1. Dr. Arturo Orozco Barocio
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

2. Dr. Eduardo Vázquez Valls
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

3. Q.F.B. Adolfo Cárdenas Ortega
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

4. Q.F.B. Margarita Bonilla Moreno
NOMBRE COMPLETO


FIRMA

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
Biológicas y Agropecuarias



EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. (romero) EN LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y EN LA RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA CONTRA *Candida albicans* RESISTENTE AL FLUCONAZOL

ALUMNA: GLORIA NAZDIRA ABURTO CANSINO

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. BLANCA MIRIAM DE GUADALUPE TORRES MENDOZA

**ASESORES: DR. EN C. LUIS HUACUJA RUIZ
M. EN C. EDUARDO VÁZQUEZ VALLS**

DEDICATORIAS

A Dios por la oportunidad de vivir.
Ya que sin la vida no hubiera realizado este trabajo.

A mis **Padres** que son y serán el motor de mi vida para luchar y esforzarme en ser mejor, por su paciencia, sus palabras de apoyo, su comprensión, por creer en mí, por todas esas cosas que me dan muestra de su amor infinito e incondicional.

Y POR SER USTEDES A LOS QUE MÁS AMO.

GRACIAS:

ROBERTO Y MARGARITA

A BLANCA

Por su apoyo en trabajos, sentimientos y palabras como directora, tutora, maestra, compañera, amiga, mujer, en fin, por todo lo que me enseñó y me permitió aprender de ella, dándome a entender que no hay ser humano pequeño, sino solo grandes humanos.

Al maestro Luis, a Lucy, al maestro Eduardo por su paciencia y dedicación.

Gracias al Ing. Javier Arturo Franco Esqueda.

Por la obtención del material biológico (plantas) para la realización de este trabajo.

A mis amigos, compañeros, maestros, familiares, conocidos, desconocidos.

Que contribuyeron con una gota de sangre (como donadores), sudor (por el miedo o esfuerzo), saliva (con sus consejos), lagrimas (de dolor o apoyo), con sus oídos (para escuchar) o con su valioso tiempo en la realización y mejora de este trabajo, mil **gracias**.

Y para todos

Los que creen en este y otros trabajos de investigación para lograr certificar el uso de plantas o componentes derivados de estas, como una alternativa medicinal para mejorar la calidad de vida de los enfermos y para la prevención de las enfermedades teniendo una meta común que ya no existan mas enfermedades que erradicar.

COLABORADORES:

- Dr. en C. Luis Huacuja Ruiz.
Depto. de Biología Molecular
Centro Universitario de Ciencias de la Salud.
- M. en C. Ma. de la Luz Miranda Beltrán
Depto. de Biología Molecular
Centro Universitario de Ciencias de la Salud.
- Dr. en C. Ignacio Orozco Ávila
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y
Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
- Dr. en C. Jorge Alberto García Fajardo
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y
Diseño del Estado de Jalisco, A.C.
- M. en C. Fernando Velarde Rivera
Hospital "Juan I. Menchaca", OPD
- QFB. Elba Patricia Ascencio Esparza
Hospital "Juan I. Menchaca", OPD
- M. en C. Eduardo Vázquez Valls.
Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS.

LUGAR DE REALIZACIÓN:

- Centro de Investigación Biomédica de Occidente, IMSS
- Instituto de Patología Infecciosa y Experimental "Dr. Francisco Ruiz Sánchez", CUCS, Universidad de Guadalajara.
- Depto. de Biología Molecular, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara.

ÍNDICE

	Pág.
• INTRODUCCIÓN.....	7
• ANTECEDENTES.....	9
• HIPÓTESIS.....	26
• OBJETIVOS.....	27
• METODOLOGÍA.....	28
• RESULTADOS.....	41
• DISCUSIÓN.....	51
• CONCLUSIONES.....	56
• GLOSARIO.....	57
• BIBLIOGRAFÍA.....	58
• ANEXO.....	66

RESUMEN

La candidiasis es una micosis de distribución cosmopolita, la incidencia de esta enfermedad y su asociación a las tasas de mortalidad se han elevado durante los últimos 15 a 20 años.

El tratamiento de elección para la candidiasis es el fluconazol, su uso repetido y la profilaxis ha generado resistencia a este azol que deteriora la calidad de vida del paciente y eleva el costo del tratamiento, por lo que es necesario investigar otras sustancias con actividad antifúngica y sin efectos adversos para el paciente.

En este sentido, se ha demostrado que las plantas tienen un papel importante en particular los aceites esenciales como *Rosmarinus officinalis* L. poseen actividad antimicrobiana efectiva contra *Candida albicans*; aunque se desconoce su actividad en cepas resistentes al fluconazol y su efecto en la respuesta inmune inespecífica contra estos patógenos.

El propósito de este estudio fue investigar el efecto antifúngico del aceite esencial de *R. officinalis* L. obtenido por hidrodestilación; se probó contra cepas de *C. albicans* sensibles y resistentes al fluconazol valorando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Diluciones del aceite esencial de *R. officinalis* L. se utilizaron para preestimar a las células fagocíticas de sangre periférica de 15 individuos sanos y valorar su efecto fagocítico contra *C. albicans* sensible y 4 cepas resistentes al fluconazol (R1109, R1165, R1120 y R22).

El aceite esencial de *R. officinalis* L. inhibió con una CMI de 2.5 $\mu\text{l/ml}$ tanto a las cepas de *C. albicans* sensible como a las cepas resistentes al fluconazol.

El índice de ingestión, digestión y porcentaje de fagocitosis se incrementó al utilizar una dilución 1:32 del concentrado de 1 $\mu\text{l/ml}$, con una concentración final de 0.032 $\mu\text{l/ml}$ del aceite esencial de *R. officinalis* L. para estimular a los polimorfonucleares comparados con los del grupo control, con una diferencia significativa de $p \leq 0.001$, 0.05, 0.001 respectivamente, este efecto se observó en las cepas sensible y en las resistentes al fluconazol, excepto en la cepa 1165.

Diferentes autores coinciden en que los principales componentes químicos del aceite esencial de la hojita de *R. officinalis* L. son α -pineno (30.3%), camfeno (9.26%), 1,8-cineol (8.5%), borneol (5.97%), β -pineno (1.37%) y en algunos casos limoneno y alcanfor. Los aceites esenciales abundantes en 1,8-cineol, borneol y alcanfor entre otros se ha asociado con un efecto microbicida, en particular en la inhibición de *Candida albicans* es posible que sean estos los principios activos para el efecto microbicida en este estudio.

También se logró observar la estimulación del aceite esencial de *R. officinalis* L. sobre la respuesta inmune inespecífica de neutrófilos contra *C. albicans* resistente al fluconazol. A la fecha no existen evidencias del papel del aceite esencial de *R. officinalis* L. como inmunomodulador de esta respuesta inmune.

Los resultados de este estudio apoyan el efecto inmunestimulante de *R. officinalis* L. en la respuesta inmune inespecífica (fagocitosis) de neutrófilos contra *C. albicans* resistente al fluconazol y su efectividad en la actividad microbicida *in vitro* contra *C. albicans* resistente al fluconazol.

INTRODUCCIÓN

La candidiasis es una micosis de distribución cosmopolita, la incidencia de esta enfermedad y su asociación a las tasas de mortalidad se han elevado durante los últimos 15 a 20 años¹.

En los Estados Unidos de América entre 1980 y 1989, el Sistema Nacional de Sobrevida de Enfermedades Infecciosas Nosocomiales, mostró un aumento en las infecciones del torrente circulatorio por *Candida* de 487%².

Existen diversos factores predisponentes asociados a candidiasis como catéter intravascular, tratamiento con antibióticos, cirugía, estancia en unidades de cuidados intensivos, cáncer, tratamiento con esteroides, infección por VIH e inmadurez fetal^{3,4}.

El tratamiento de elección para la Candidiasis es el fluconazol. El uso de tratamientos repetidos y la profilaxis ha generado resistencia a este azol que deteriora la calidad de vida del paciente y eleva el costo del tratamiento⁵.

De las diferentes especies de *Candida*, la más patógena y frecuente es *C. albicans*, con mayor resistencia a los diferentes tratamientos entre ellos el fluconazol; la erradicación de esta enfermedad requiere buscar nuevas alternativas que mejoren la calidad de vida del paciente⁴.

En este sentido las plantas juegan un papel importante en la terapéutica de diferentes enfermedades⁶; en particular los aceites esenciales de plantas como *R. officinalis* L. poseen actividad antimicrobiana efectiva contra hongos como *C. albicans*⁷. Pero se desconoce su actividad en cepas resistentes al fluconazol y su efecto en la respuesta inmune contra estos patógenos.

ANTECEDENTES

Candidiasis, (moniliasis, muguet o algodoncillo) es una micosis primaria o secundaria ocasionada por levaduras endógenas y oportunistas del género *Candida*, especialmente por la especie *albicans* frecuente en seres humanos⁸.

La incidencia de esta enfermedad se ha elevado durante los últimos 20 años y constituyen el 25% de las micosis superficiales. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son muy variables y van desde aguda, subaguda, y crónica a episódica⁹.

C. albicans es un hongo que tiene dos formas: hifas y levaduras. Crece en agar Sabouraud a temperatura ambiente o a 37°C, forma colonias lisas, cremosas que al envejecer son más grandes y aparecen surcadas y rugosas¹⁰.

En frotis de exudados *Candida albicans* se presenta como una levadura oval de 2 a 3 por 4 a 6 µm. El desarrollo superficial consiste en células ovales en gemación y las sumergidas en pseudomicelio compuesto de pseudohifas que forman blastoconidias y algunas veces clamiconidias. *C. albicans* fermenta la glucosa y maltosa, produciendo tanto ácido como gas y no fermenta la lactosa que la distinguen de otras especies de *Candida* patógenas como *C. parapsilosis*, *C. tropicales*, y *C. glabrata* y en menor frecuencia *C. kefyr*, *C. krusei* y *C. guilliermondii*¹¹.

El número de casos de Candidiasis sigue en aumento por: el incremento de la esperanza de vida y en consecuencia aumento de enfermedades geriátricas; empleo prolongado de antibióticos de amplio espectro, automedicación, complicaciones de las técnicas quirúrgicas o el incremento de pacientes en las unidades de cuidados intensivos^{12,13}.

Las características que favorecen que *C. albicans* se instale son alteraciones en pH, disponibilidad de carbohidratos, flora normal y defensas del huésped, que ocurren principalmente en la infancia, diabetes, embarazo, debilidad general, lesiones de la piel^{4,14}, individuos con deficiencia de la inmunidad celular como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) o humoral (leucemia, mieloma); enfermedades con alteración de la fagocitosis (lupus, diabetes); granulocitopenia (citotóxicos, radioterapia); inmunodepresión secundaria a la administración de glucocorticoides y quimioterapia, principalmente en transplantados; quemaduras graves; así como en pacientes con alimentación parenteral y con catéteres intravasculares. Es evidente que debe existir una asociación entre el hongo y las defensas del huésped para que ocurra la Candidiasis¹⁵.

El sistema inmune del huésped está formado por un grupo de células y moléculas con funciones especializadas en la defensa contra las infecciones. Los diferentes tipos de respuesta inmune caen dentro de dos categorías: la innata (no específica) y la adaptativa/adquirida (específica). La respuesta inmune involucra primero el reconocimiento de un patógeno y segundo montar una respuesta contra este¹⁶.

La teoría celular de la inmunidad, que afirmaba que las células del huésped eran los principales mediadores de la inmunidad, fue inicialmente definida por Elie Metchnikoff. Su demostración de fagocitos rodeando una espina clavada en una larva translúcida de estrella de mar, publicado en 1893, fue quizás la primera evidencia experimental de que las células respondían a los cuerpos extraños¹⁷.

Las células que participan en las reacciones inflamatorias son: monocitos, linfocitos y polimorfonucleares (PMN), estos últimos incluyen a los neutrófilos, basófilos y eosinófilos^{16,18,19}. Los neutrófilos son la defensa primaria (innata) contra la invasión y diseminación de la candidiasis²⁰.

Normalmente la sangre contiene 5×10^6 leucocitos por mm^3 ²¹ y de estos un 60% son los fagocitos neutrófilos, que funcionan como la primera línea de defensa celular contra las infecciones microbianas²².

Una de las principales funciones de los fagocitos es reconocer, ingerir y destruir partículas por medio de un proceso llamado fagocitosis, de esta manera los microorganismos pueden ser tomados, englobados y destruidos dentro del fagocito. Algunos fagocitos son importantes en la producción de moléculas solubles que median la respuesta inflamatoria, que se presenta de manera normal en los procesos infecciosos^{23,24,25}.

Los gránulos de los neutrófilos son organelos unidos a la membrana; aproximadamente un tercio de los gránulos en los neutrófilos maduros son azurofílicos o gránulos primarios, el contenido de estos gránulos incluye lisozimas y colagenasa entre otras sustancias; los gránulos secundarios o específicos contienen sustancias como citocromo b, mieloperoxidasa y lactoferrina que en combinación con los metabolitos de O_2 tóxico, óxido nítrico, proteasas, fosfolipasas, proteínas antibacterianas y péptidos vierten su contenido al fagosoma para eliminar o destruir a los agentes patógenos²⁶.

Tanto los PMN como los monocitos provienen de un reservorio de células madre precursoras de la médula ósea, y presentan receptores para anticuerpos y complemento necesarios para aumentar la fagocitosis²⁷.

Los neutrófilos que junto con los eosinófilos y basófilos tiene un núcleo multilobulado abundan en la sangre pero están ausentes en los tejidos normales,

tienen un promedio de vida de 6 h²⁸; comprenden 40 a 75 % de los leucocitos de sangre periférica, el neutrófilo maduro tiene un diámetro entre 10 y 12 μm y contiene un núcleo segmentado con cromatina y 2 a 5 lóbulos conectados por delgados filamentos nucleares²⁷.

En condiciones normales cada día salen a la circulación 10 millones de neutrófilos maduros, estos granulocitos, son considerados los más importantes y numerosos del huésped en la respuesta inmune innata y constituyen la primera línea de defensa para la respuesta inmune contra bacterias y hongos^{28,29}.

Antes de que la fagocitosis ocurra, el fagocito debe migrar hasta un gradiente químico mayor de sustancias bacterianas, proceso al cual se denomina quimiotaxis. Las bacterias producen sustancias quimiotácticas y la generación local de citocinas, mediadores lípidos de inflamación y neuropéptidos, son cruciales para la quimioatracción de la célula y para coordinar la activación de células efectoras. Esto permite que se guíe a los fagocitos al microbio que luego, deberá de adherirse a la superficie del neutrófilo^{29,30}.

Posteriormente ocurre la opsonización, proceso por el cual se unen inmunoglobulinas (Ig) y fragmentos de complemento al microbio para aumentar la ingestión por los fagocitos³¹.

FAGOCITOSIS:

La fagocitosis se lleva a cabo principalmente por neutrófilos y macrófagos. Este proceso comprende la ingestión y digestión de microorganismos, partículas insolubles, células muertas o dañadas del huésped y detritus celulares. Estas células provienen de un linaje común y se diferencian no solo por su capacidad de fagocitar sino por la secreción de moléculas activas, reparar heridas, la modulación de la inflamación, respuesta inmune y el proceso fagocítico *per se*²⁰.

Se han identificado varios estados o etapas en la fagocitosis como son ^{4,32}:

- a) Adherencia a células endoteliales o a otras células fagocíticas, esta adherencia en ocasiones es inefectiva para aquellos microorganismos capsulados.
- b) Quimiotaxis o atracción: es el movimiento de la célula, inducido por mecanismos directos como C5a resultado de la activación del complemento; o indirectos por la consecuente liberación de factores preformados dentro de mastocitos por activación de C3a o C5a. La adherencia y la quimiotaxis inician la fagocitosis.
- c) Fijación. Los receptores de membrana del fagocito deben transmitir señales al citoplasma para la formación de pseudópodos y la protusión de membranas alrededor del microorganismo.
- d) Formación del fagosoma, requiere de una interacción secuencial de receptores en la superficie de un fagocito con los ligandos existentes en la superficie de una partícula, la extensión de los pseudópodos es conforme a la distribución de los ligandos opsónicos sobre la superficie de la partícula; esto propulsa los pseudópodos alrededor de la partícula.
- e) La formación de la vacuola fagocítica se lleva a cabo mediante la interacción de los receptores en la superficie del fagocito con los ligandos opsónicos de una partícula; inicia la formación de pseudópodos, uniéndose a ligandos específicos en la superficie de la partícula hasta que el pseudópodo envuelve de manera total a la partícula.
- f) Ingestión o englobamiento de la partícula, resulta de la extensión de pseudópodos sobre y alrededor de la superficie de la partícula el fagosoma se adentra en la célula y se fusiona con un lisosoma, formando un fagolisosoma, que contiene intermediarios reactivos de oxígeno, enzimas hidrolíticas y lisozima, conocido todo esto como "estallido respiratorio".
- g) Muerte intracelular o degranulación de los gránulos secundarios o específicos, ya sea por factores solubles o por contacto con receptores celulares, esto puede ser coincidente a la formación del fagosoma.

- h) Digestión, es mediada por sustancias liberadas de los gránulos fagocíticos en combinación con el estallido respiratorio y el sistema microbicida oxígeno independiente.

Las fases observadas después de la internación, son cambios en la fisiología del microorganismo como pérdida de la viabilidad, inhibición en la síntesis de macromoléculas, seguida por lisis y digestión por enzimas lisosómicas, involucrando sistemas oxígeno-dependiente y oxígeno-independientes³³.

Independiente del estado inmunológico del paciente, el tratamiento de elección para *C. albicans* es el fluconazol, triazol soluble en agua con más del 90% de biodisponibilidad, administrado oralmente como terapia de candidiasis orofaríngea en infecciones avanzadas de VIH y SIDA, se absorbe por vía gastrointestinal, la concentración en plasma es la misma después de administrarlo por vía oral o intravenosa y la presencia de alimentos o la acidez gástrica no modifica su absorción. El fluconazol penetra fácilmente en líquidos corporales³⁴; este fungistático inhibe la enzima lanosterol 14- α -dimetilasa perteneciente al citocromo P-450, lo que interrumpe la conversión de lanosterol a ergosterol, y por lo tanto lleva a una acumulación de 14- α -metilesterol y a una disminución del ergosterol en las paredes del hongo, lo anterior provoca que se alteren las propiedades de la membrana y sus funciones induciendo un aumento en la permeabilidad y una inhibición del crecimiento y replicación del hongo. Así mismo, los azoles inhiben el sistema de enzimas del citocromo P-450 de la cadena respiratoria del hongo, tienen una interacción tóxica con los fosfolípidos de la membrana, y una inhibición de la transformación de la levadura a su forma micelial³⁵.

Los derivados imidazólicos son activos frente a los dermatófitos, hongos dimórficos, levaduras, parásitos y diversas bacterias gram positivas. Inhiben la síntesis de ergosterol en los hongos por interferencia con el sistema demetilasa lanosterol en los hongos por interferencia con el sistema demetilasa lanosterol dependiente del citocromo microsomal¹⁰.

Las cepas de *C. albicans* han desarrollado resistencia por la exposición frecuente al fluconazol ya sea como tratamiento o profilaxis^{36,37,38,39,40,41,42}. La falla en la terapia con fluconazol hace urgente buscar nuevas estrategias terapéuticas biológicas que sean efectivas y ayuden a la respuesta inmune, que destruyan al microorganismo y que económicamente sea factible su desarrollo⁴³.

En este sentido, las plantas medicinales pueden ser una buena alternativa para el control terapéutico de algunas enfermedades^{44,45}.

Debido a la gran diversidad vegetal del planeta, las plantas nos ofrecen un extraordinario arsenal de biomoléculas con diferente actividad biológica potencialmente útiles para el tratamiento de infecciones^{44,45}.

Una planta medicinal es cualquier vegetal que contenga, en cualquiera de sus órganos, alguna sustancia con actividad farmacológica que se pueda utilizar con fines terapéuticos o que se pueda emplear como prototipo para obtener nuevos fármacos⁴⁶.

El uso de plantas medicinales como remedio para el alivio de enfermedades es posible que se remonte a hace 5 mil años⁴⁷. En ciudades industrializadas, la búsqueda de plantas medicinales ha ido en aumento y su compra se ha incrementado en los pasados 10 años⁴⁸.

Hoy en día las plantas son el origen de algunas drogas utilizadas para la mejoría de enfermedades que afectan a la mayoría de la población en el mundo. Muchas de las sustancias derivadas de las plantas constituyen el 25% de las prescripciones médicas⁴⁹.

Existen reportes de diferentes extractos y aceites obtenidos de plantas que poseen actividad tanto antimicrobiana como inmunológica^{50,51}.

En particular, el aceite esencial de *R. officinalis* L. ha mostrado tener un efecto contra *C. albicans* ⁷. Basados en una revisión de la literatura científica (Medline 1966 a enero del 2003), no existen reporte sobre la actividad microbica de este aceite contra cepas de *C. albicans* resistente al fluconazol y su efecto en la respuesta inmune inespecifica.

Las plantas medicinales son usadas básicamente en dos formas ^{46,56,58}:

- 1) Mezcla completa que incluye un extenso rango de compuestos como:
 - a. Esencia es una secreción natural elaborada por el material vegetal, la cual puede estar distribuida en diversas partes del mismo vegetal: en las raíces, tallos, hojas, flores, frutos, cortezas y semillas.
 - b. Aceite esencial es un extracto natural de las plantas aromáticas obtenido por destilación con hidrodestilación o vapor de agua, es decir, el aceite esencial es la esencia destilada del material vegetal.
 - c. Infusiones son líquidos extractivos acuosos obtenidos por la acción poco prolongada del agua a temperatura próxima a la ebullición, seguido de una maceración que puede durar hasta 30 minutos.
 - d. Tinturas son preparaciones liquidas obtenidas a temperatura ambiente mediante maceración o por disolución de los extractos secos.
 - e. Extractos son preparados obtenidos por concentración parcial o total de los líquidos extractivos.

- 2) Compuestos puros, químicamente definido su principal actividad ⁴⁹.

Los aceites esenciales también son llamados: esencia de la planta, esencia aromática, o esencia vegetal ⁴⁹.

MÉTODOS DE SEPARACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES⁵²:

Destilación

Este método consiste en separar los componentes de las mezclas basándose en las diferencias en los puntos de ebullición de dichos componentes. Cabe mencionar que un compuesto de punto de ebullición bajo se considera "volátil" en relación con los otros componentes de puntos de ebullición mayor. Los compuestos con una presión de vapor baja tendrán puntos de ebullición altos y los que tengan una presión de vapor alta tendrán puntos de ebullición bajos.

Los tipos de Destilación más comunes son:

Destilación Simple El proceso se lleva a cabo por medio de una sola etapa, es decir, que se evapora el líquido de punto de ebullición más bajo (mayor presión de vapor) y se condensa por medio de un refrigerante.

Destilación fraccionada el proceso se realiza en multi-etapas por medio de una columna de destilación en la cual, se llevan a cabo continuamente numerosas evaporaciones y condensaciones. Al ir avanzando a lo largo de la columna, la composición del vapor es más concentrada en el componente más volátil y la concentración del líquido que condensa es más rica en el componente menos volátil.

Destilación por Arrastre con Vapor se hace pasar una corriente de vapor a través de la mezcla de reacción y los componentes que son solubles en el vapor son separados. Entre las sustancias que se pueden separar por esta técnica se pueden citar los Aceites Esenciales.

Hidrodestilación el material vegetal entero o molido se coloca dentro de un alambique de destilación, al cual se le adiciona agua hasta que quede completamente inmerso. El agua se mantiene a la temperatura de ebullición, mientras que la mezcla de materia prima y agua se agita mecánicamente. La destilación inicia cuando el vapor de agua cargado de aceite pasa a un condensador y el aceite se separa del condensado⁵².

Durante la hidrodestilación el agua en ebullición penetra en los tejidos de la planta y disuelve primero los compuestos más solubles, por ejemplo los oxigenados. Esta solución acuosa se difunde a través de las paredes celulares (hidrodifusión) y entonces al llegar a la superficie, el aceite se vaporiza inmediatamente. El proceso continua hasta que todo el aceite atrapado en las células se vaporiza de acuerdo a su solubilidad en el agua. Los tiempos de destilación varían ampliamente abarcando desde una hora para algunas plantas frescas hasta cien horas o más para materiales de madera dura como el sándalo⁵².

En muchos casos al tratar de separar un componente de la mezcla por destilación en la fase gas se forma una especie de asociación entre las moléculas llamada azeótropo, la cual puede presentar un cambio en el punto de ebullición al realizar la destilación⁵².

Para determinar la humedad (% de agua) en residuos sólidos se puede hacer uso de una destilación del azeótropo agua-tolueno. Se agrega una cantidad de tolueno al sólido pulverizado y se destila, se colecta el destilado en una trampa (Dean-Stark) y al enfriarse se puede medir la cantidad de agua que queda en el fondo de la trampa (El tolueno es menos denso que el agua y es insoluble en ésta)⁵².

Los aceites esenciales se encuentran en un gran número de espermatofitas; además los géneros capaces de elaborar estos principios volátiles se encuentran en familias de las Angiospermas, pertenecientes a los órdenes de las Magnoliales, Laurales, Rutales, Lamiales, Asterales. Se encuentra en todos los órganos vegetales aunque la composición de éste puede variar según su localización. Son mezclas complejas y muy variables de constituyentes, que pertenecen de forma casi exclusiva a dos series, caracterizadas por orígenes biosintéticos distintos: la serie diterpénica y la serie de los compuestos arénicos⁵³.

TAXONOMÍA DE *Rosmarinus officinalis* L.^{54,55}.

DIVISIÓN: ANGIOSPERMAS

CLASE: MAGNOLIATAE (*Dicotyledones*)

SUBCLASE: *Asteridae*

SUPER ORDEN: *Lamiales*

ORDEN: *Lamiales*

FAMILIA: *Labiatae*

GENERO: *Rosmarinus*

ESPECIE: *officinalis*

R. officinalis L. es una planta diterpénica de la Familia *Labiadas* conocida como romero, rosmarino, rosemary o *Guixi-cicanaca* (lengua zapoteca, Oaxaca); su hábitat se da en las regiones secas y cálidas del sur de Europa sobre todo la zona mediterránea⁵⁴. En México se encuentra principalmente cultivado en Jalisco, Chiapas, Distrito Federal, Estado de México, Michoacán, Puebla, Querétaro, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas⁵⁵.

R. officinalis L. cultivado se caracteriza como un subarbusto leñoso, erguido o



Fig. 1 Fotografía de cultivo de *Rosmarinus officinalis* L. en el Ejido Agrícola Franco, La Barca, Jalisco.

ascendente de 50-80 cm de altura verde todo el año, perennes; de ramas pardas de la que parten hojas lineales; pequeñas, opuestas, sésiles, lanceoladas, casi lineares, con los bordes enteros y torcidos hacia abajo, coriáceas, estrechas, de 15-35 mm de longitud, se parecen mucho a hojas de pino curvada, verdeobscuras, lustrosas y brillantes por el haz, blanquecinas y recubiertas de pelos tectores pluricelulares y ramificados por el

envés. Ambas epidermis de la hoja poseen pelos secretores que hacen que toda la planta desprenda un agradable aroma alcanforado (Ver Fig. 1).

Florece desde febrero hasta noviembre,

Sus inflorescencias bilabiadas, blancas al principio de la floración y después cambian a color azul o lila claro, se agrupan en pequeños y cortos racimos en las axilas o en los extremos de las ramas, el cáliz es leñoso con dientes bordeados de blanco, la corola de 10 a 12 mm de longitud (Ver Fig. 2).



Fig. 2 Fotografía del *Rosmarinus officinalis* L. en floración, Ejido Agrícola Franco, La Barca, Jalisco.

El fruto es un tetraquenio, en el interior de cada aquenio hay un embrión desprovisto de albumen, con 2 cotiledones convexos^{55,56}.

Las plantas cultivadas ofrecen ventajas como⁴⁶:

1. Producción en forma localizada
2. Cosechas abundantes y de buena calidad
3. Plantas en un estadio de crecimiento similar
4. Aplicación de técnicas de selección y mejora
5. Disminuye la posibilidad de adulteraciones y falsificaciones
6. No atentan contra la población natural de las plantas.

La recolección de la planta se recomienda se efectuó de los 12 a 18 meses de la plantación, posteriormente se realiza una corta anual a principios de primavera o mediados de verano; si se requiere para destilación debe preferirse en plena floración; es ideal para el uso de herbolaria o alimentación durante el mes de septiembre. El corte por la mañana proporciona más aceite esencial que el recolectado al atardecer^{57,58,59}.

Características fisicoquímicas del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L.⁴⁶.

• Estado	Líquido
• Color	Amarillo tenue
• Olor	reminiscencia de pino
• Densidad (20°C):	0.892-0.910 g/ml
• Índice de Refracción (20°C):	1.464-1.472
• Rotación óptica (20°C):	-5 a + 8
• Solubilidad en etanol 90°	(20°C) (v/v)

Existen diferencias importantes entre la composición química de las diferentes partes de la planta, las más utilizadas son las hojas y las flores⁴⁶, a continuación se describen:

➤ Componentes de las **flores y hojas** de *Rosmarinus officinalis* L.:

- Esencia 1-2%. Está formada principalmente por derivados de tipo terpénico: hidrocarburos como el pineno, alcoholes como el borneol y sus ésteres, o cetonas (15-25%).
- Ácido rosmarínico: 3%. Es un derivado fenólico, éster del ácido cafeico y el alcohol 2-hidroxidihidrocafeico con propiedades antioxidantes. Están en todas las Labiadas.
- Flavonoides: Tanto libres como en forma de heterósidos. Destacan sobre todo la apigenina y la luteolina.
- Picrosalvina o carnosol: Es una lactona diterpénica con carácter amargo.

- Derivados triterpénicos: Son cuantitativamente importantes y destaca el ácido ursólico (2-4%).

➤ Componentes del aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L.:

Principales compuestos	Flamini G ^{60a}	Inouye S. ⁶¹	Ibañez E. ⁶²	Mangena T ⁷	Basile A ⁶³
	%	%	%	%	mg/1g
α-pineno	28.6	24.1		18.18	0.163
camfeno	7.44			6.08	0.039
sabineno	0.9				
β-pineno	1.37			2.58	
myrceno	3.24				
α-terpineno	0.47				
r-cimeno	0.74			NI	
limoneno	3.8			NI	0.025
1,8-cineol	8.5	23.5	12	31.12	0.161
g-terpeno	0.83				
linalool	1.76				
alcanfor	9.26	19.7	40	30.12	0.06
borneol	5.97		7		0.017
α-terpineol	1.55				
verbenon	5.97		9	4.12	0.025
timol	0.9				
geraniol	1.37				
acetato de bornil	4.7		2.5	3.17	0.004
α-cedreno	0.58				

^aListado en orden de la elución de una columna DB-5

Los constituyentes de los aceites son principalmente hidrocarburos (C₅H₈), del tipo monoterpenos y sesquiterpenos. Los compuestos oxigenados derivados de los hidrocarburos incluyen alcoholes, aldehídos, ésteres, cetonas, fenoles y óxidos⁶⁴.

En *R. officinalis* L. se han reportado diferencias en la cantidad y los componentes de los aceites esenciales obtenidos, las cuales dependen de las técnicas de recolección, secado, extracción y separación que pueden inducir eliminación y/o descomposición selectiva de algunos compuestos, tales como 3-octanol, verbenone, borneol y alcanfor⁶² (Ver Fig. 3).

Diversos factores influyen en el tipo y concentración de constituyentes de los aceites esenciales como: la variedad de la especie de la planta y la estación de su recolección⁷.

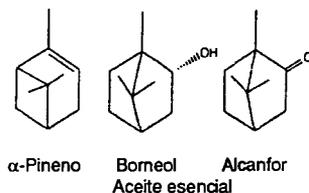


Fig. 3 Kuklinski C. Farmacognosia. Barcelona, España: Ediciones Omega, S.A. 2000:296.

Desde el punto de vista industrial los aceites esenciales son muy utilizados en la industria farmacéutica; existen reportes de diferentes extractos y aceites obtenidos de plantas medicinales que poseen actividad tanto antimicrobiana como inmunológica^{51,52}.

Si el tratamiento para Candidiasis con fluconazol ha fallado⁴², quizá es posible que el aceite esencial de hojas de *R. officinalis* L. sea una estrategia potencial para su control terapéutico.

Existen reportes de diferentes extractos y aceites obtenidos de plantas que poseen actividad tanto antimicrobiana o inmunológica^{50,51}.

En particular, *R. officinalis* L. ha mostrado tener un efecto contra *C. albicans*⁷. En este estudio se evaluó la actividad microbicida de este aceite esencial, contra

cepas de *C. albicans* resistente al fluconazol y su capacidad de estimular la respuesta inmune inespecífica.

HIPÓTESIS

El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. inhibe el crecimiento de *C. albicans* resistente al fluconazol e incrementa la respuesta inmune inespecífica contra *C. albicans* resistente al fluconazol.

OBJETIVOS GENERALES

1. Determinar el efecto antifúngico de el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en cepas de *Candida albicans* resistentes a fluconazol.
2. Cuantificar la respuesta inmune inespecífica de células fagocíticas de individuos sanos, expuestas a el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. contra *C. albicans* resistente al fluconazol.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.1 Cuantificar la Concentración Mínima Inhibitoria de el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. contra *C. albicans* resistente al fluconazol.
- 2.1 Determinar el índice de ingestión, digestión y porcentaje de fagocitosis contra *C. albicans* de fagocitos de sangre periférica de individuos sanos expuesto a el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L.

METODOLOGÍA

PLAN GENERAL (Ver Fig. 4):

Se divide en tres fases:

- I. Se obtendrá el aceite esencial de *R. officinalis L.* por hidrodestilación.
- II. El aceite esencial *R. officinalis L.* se probará su efecto antifúngico contra cepas de *C. albicans* sensibles y resistentes al fluconazol valorando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).
- III. El aceite esencial *R. officinalis L.* se diluirá para preestimar a las células fagocíticas de sangre periférica de individuos sanos y valorar su efecto fagocítico contra *C. albicans*.

❖ DISEÑO DEL ESTUDIO:

Experimental

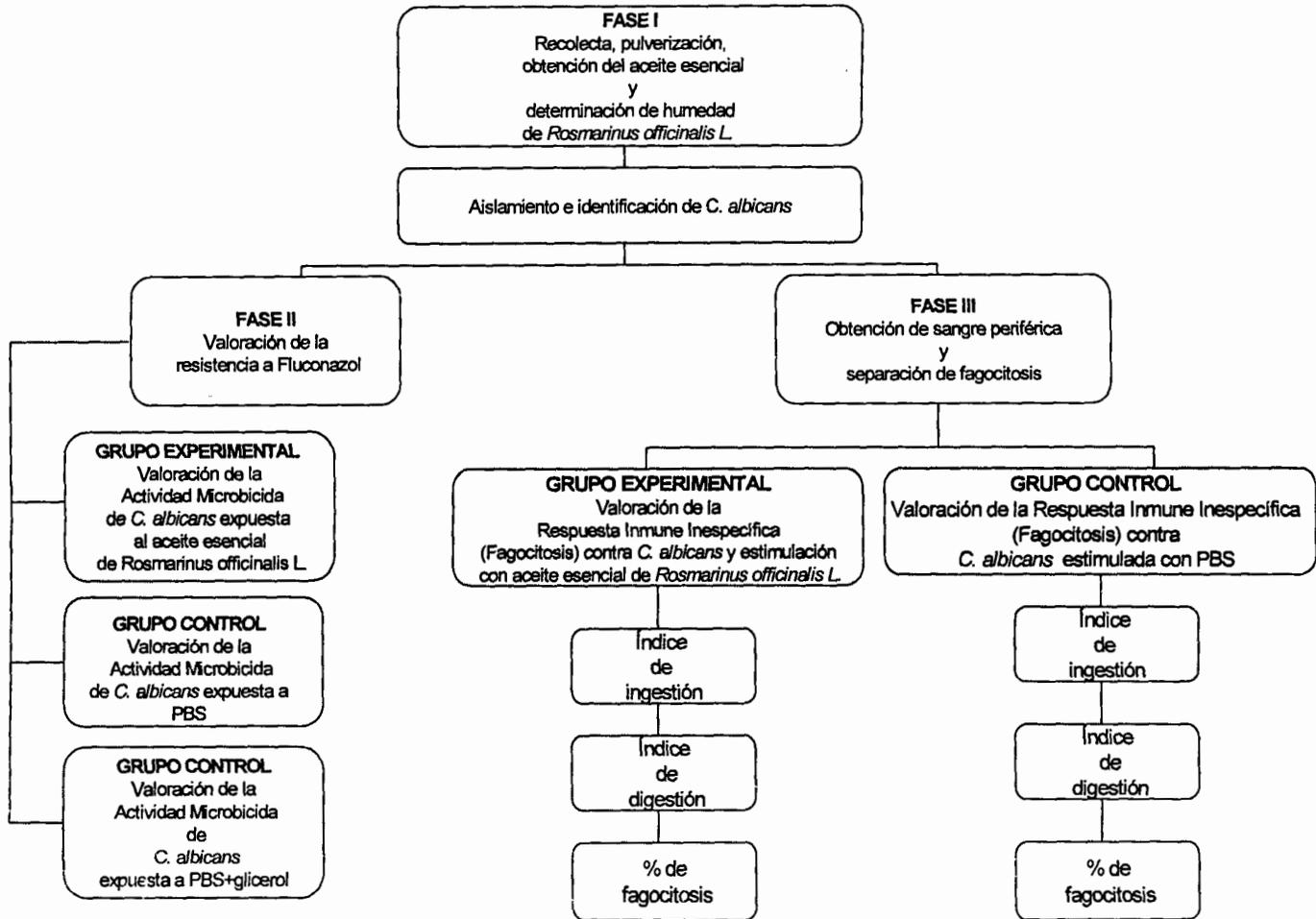
Variable independiente:

- Administración del *R. officinalis L.*

Variables dependientes:

- Actividad Microbicida en Unidades Formadoras de Colonias (UFC).
- Respuesta Inmune Inespecífica (fagocitosis)

FIG. 1 DISEÑO EXPERIMENTAL



- **Planta:**

R. officinalis L. cosechado en el Ejido Franco, La Barca, Jal, México.

- **UNIVERSO DE ESTUDIO**

15 Individuos sanos, femeninos o masculinos, entre 18 y 30 años.

- **CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PACIENTES**

Criterios de Inclusión:

Individuos aparentemente sanos

Que no ingieran medicamento

Mujeres que no estén embarazadas o en periodo de lactancia.

Criterios de Exclusión:

Individuos con enfermedad asociada

Criterio de Eliminación:

Se desechó aquellas muestras en las que el rendimiento de células fagocíticas fuera insuficiente.

- **CRITERIOS DE SELECCIÓN DE *R. officinalis L.***

Criterios de Inclusión:

El ejemplar se identificó por el Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara.

Se cultivó con fertilizantes orgánicos (Ver Fig. 1).

El corte se realizó por la mañana.

Criterios de Exclusión:

Se eliminaron las flores.

❖ **RECURSOS MATERIALES**

- **Reactivos:**

Tolueno, alcohol, metanol, xilol, dextrán 6% (macrodex) PISA®, solución salina fisiológica de NaCl al 0.9% (SSF), solución salina de ClNa al 0.2% y 1.6%,

solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (PBS), azul tripano, colorante de Wright, EDTA, suero autólogo, metanol, alcohol ácido, glicerol (densidad=1.257 g/ml), xilol, Sabraud, agar cerebro corazón (ACC), caldo cerebro corazón (CCC), equipo par la identificación de *C. albicans* (Vitek, Biomerux®).y para valorar la resistencia contra el fluconazol (Sensititre®).

- **Material:**

Canasta de calentamiento con conexión, matraz bombilla, probeta graduada, embudo de separación, equipo de extracción, pinzas de 3 dedos con nuez, soporte universal, bomba eléctrica, frascos ámbar, tubos de vidrio, pipetas pasteur, cámara de Neubauer, sistema vacutainer, cubreobjetos, portaobjetos, cámara húmeda, cajas de petri, pipetas graduadas, micropipetas.

- **Equipos:**

Molino eléctrico, destilador tipo Clevenger con trampa de acidez volátil V4065 Vicoso®, equipo para valoración de humedad, bomba peristáltica multiperpex 2115 LKB Bromma, reostato, centrifuga refrigerada, Damon/IEC División, IEC PR-J, Centrifuga Damon7IEC División, refrigerador, congelador, Contador de colonias, American Optical; Microscopio de luz American Optical, Spencer. Microscopio de fluorescencia, marca Carl Zeiss, Espectrofotómetro Coleman Junior II modelo 6, Incubadora a 37°C sin marca.

❖ FASE I: OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Rosmarinus officinalis* L.

• **Recolección y Pulverización de *Rosmarinus officinalis* L.**

La planta se recolectó de cultivo entre los meses de junio a septiembre en el Ejido Agrícola Franco, La Barca, Jalisco.

Después de la recolección, se identificó como *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae), por el Ing. Raymundo Ramírez Delgadillo Curador del Herbario del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara (IBUG) del Departamento de Botánica y Zoología del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, con el número de registro 156409 (Anexo 1).

Para la obtención del aceite esencial por hidrodestilación y la valoración de la humedad, se dejó secar la planta a temperatura ambiente durante 10 días y a continuación se deshojó y exclusivamente las hojas se molieron hasta pulverizarlas.

• **Método de extracción del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L.**

Por hidrodestilación.

Se colocó 150 g de *R. officinalis* L. pulverizado en 1350 ml de agua bidestilada en un matraz bombilla, los cuales se calentaron a punto de ebullición en una canasta térmica con reostato y por hidrodestilación en un sistema refrigerante (Equipo Vicoso® 4065) se obtuvo el aceite esencial⁶⁵ (Ver Fig. 5).

- **Valoración de la Humedad:**

Los aceites volátiles típicos se pierden durante la desecación y estas pérdidas son medidas como humedad. Por lo tanto, para la determinación de humedad del *R. officinalis L.* se tomaron 40 g de la planta pulverizada y se cubrieron con 200 ml de tolueno, con el fin de que atrape el agua. Se calentó hasta la ebullición. La humedad del *R. officinalis L.* se destilo con el tolueno y durante la condensación de los vapores el agua se separo del tolueno y se midió su volumen. Este nivel de humedad es un control de las características de molienda, almacenamiento y obtención del extracto⁶⁶ (Ver Fig. 6)

El estándar de humedad se tomo en 100 g de hoja seca de *R. officinalis L.* bajo la siguiente formula

$$\% \text{Aceite esencial} = \frac{\text{vol. de aceite} \times 100}{\text{vol de agua}} = \% \text{ en base seca (bs).}$$

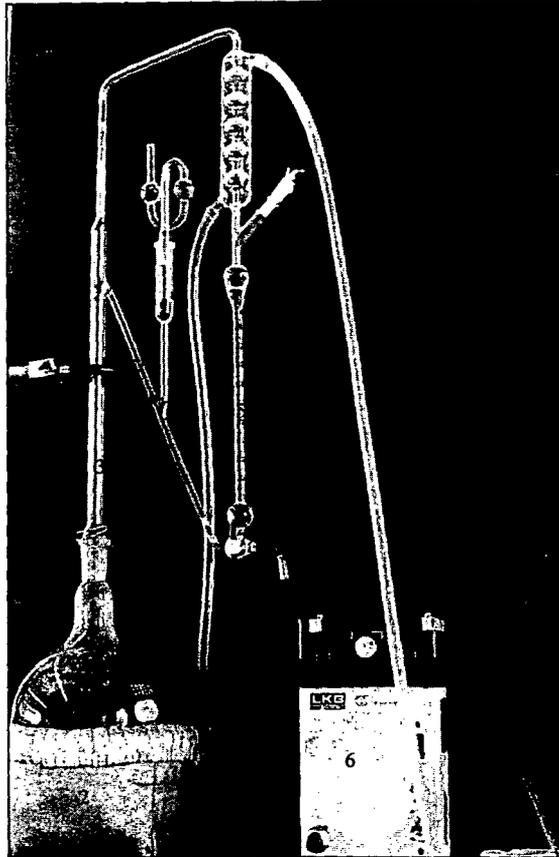


Fig. 5 Equipo de Hidrodestilación (Vicosa®)

1. Matraz bombilla
2. Canasta de calentamiento
3. Tubo de vidrio con boca esmerilada para ensamble con el conductor de la mezcla.
4. Refrigerante
5. Tubo graduado en mililitros.
6. Bomba peristáltica
7. Llave de tres vías.

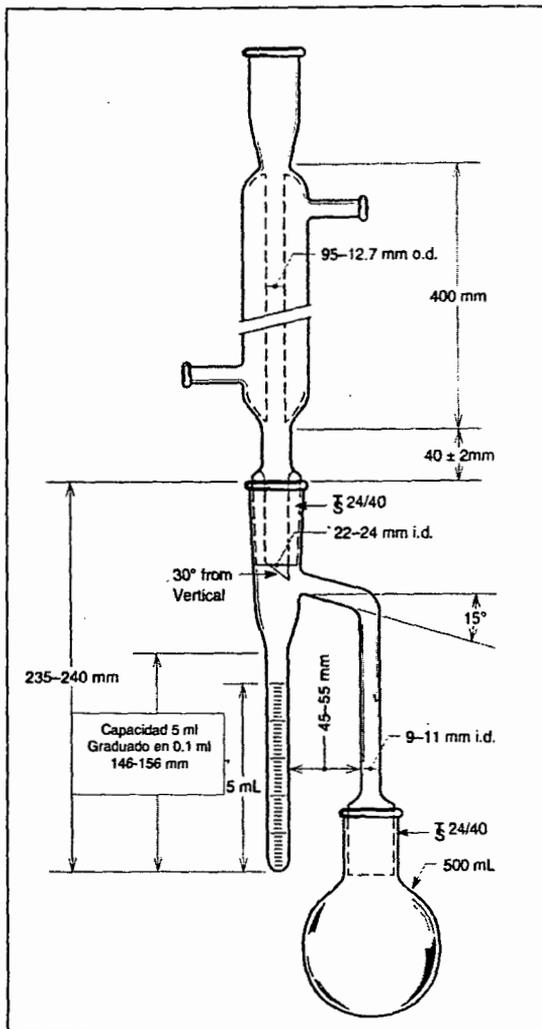


Fig. 6 Equipo para valoración de la humedad

**❖ FASE II: VALORACIÓN DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE
Rosmarinus officinalis L. CONTRA *C. albicans* SENSIBLE Y
RESISTENTE AL FLUCONAZOL.**

• OBTENCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Candida albicans*.

Las cepas de *Candida albicans* fueron aisladas de pacientes del Hospital Civil OPD "Juan I. Menchaca", Guadalajara, México con las siguientes características:

Cepa de <i>C. albicans</i>	Aislado de:	Sexo del paciente	Edad del paciente
Sensible	Aspirado Traqueal	Femenino	65
R1109	Aspirado Traqueal	Masculino	40
R1165	Líquido Peritoneal	Masculino	53
R1120	Aspirado Traqueal	Masculino	47
R22	Secreción de catéter	Masculino	38

Se cultivaron en agar Saboraud por 48 h a 37°C y se almacenaron a 4°C hasta su utilización, donde fue resembrada en CCC por 24h a 37°C⁶⁷.

La identificación de genero y especie de las *C. albicans* se realizó por el método automatizado de Vitek (Biomeriux)®, con los protocolos y estándares establecidos⁶⁸.

**• IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LAS CEPAS RESISTENTES
AL FLUCONAZOL**

Las cepas de *C. albicans* resistentes a fluconazol fueron valoradas por el método de Sensititre®

- **VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROBICIDA: Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria por Unidades Formadoras de Colonias:**

El CMI cuantifica la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de *R. officinalis L.* para inhibir la multiplicación del microorganismo.

Se sembró la cepa de *C. albicans* en CCC y se incubó a 37°C por 24 horas; a continuación se lavó 3 veces con SSF y se centrifugó a 2,500 rpm por 10 minutos; la concentración se ajustó con SSF en un espectrofotómetro a 0.02 absorbancia a 600 nm. Enseguida se depositaron 100 µl de esta levadura en un tubo de vidrio con 5 µl de cada una las diluciones del aceite esencial de *R. officinalis L.* (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128) y 895µl de PBS, con un volumen final de 1000 µl/tubo. Posteriormente se incubó por 24 hrs. a 37°C en agitación constante. Se obtuvo 500 µl de cada tubo para vaciado en placas de petri con ACC que se incubaron por a 48 a 72 h a 37°C. Se registró la dilución del aceite esencial de *R. officinalis L.* donde se inhibió en forma total las UFC y se determina como la CMI⁶⁹. Se realizó por duplicado en tres experimentos independientes.

-Grupo control:

Cultivos sin *R. officinalis L.* solo con PBS. En todos los casos se hizo la valoración por duplicado en tres experimentos independientes.

-Grupo con glicerol.

Cultivos sin *R. officinalis L.* solo con 100 µl glicerol y PBS . En todos los casos se hizo la valoración por duplicado en tres experimentos independientes para verificar si la densidad pudiera afectar el crecimiento del *R. officinalis L.*

❖ FASE III. VALORACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INESPECÍFICA (FAGOCITOSIS) ESTIMULADA POR *Rosmarinus officinalis* L. CONTRA *C. albicans*.

Preparación del estímulo (*Candida albicans*)

Se resembró la levadura *Candida albicans* en CCC a 37°C por 24 h. Se lavó tres veces con 5 ml de SSF y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante.

Posteriormente las levaduras fueron cuantificadas en el espectrofotómetro, y se ajustaron a 0.02 absorbancia a 600 nm y se utilizó una dilución 1:10 de levaduras.

Obtención de las muestras sanguíneas:

Previo asepsia al antebrazo en el área de flexión del codo, se procedió a extraer por punción venosa periférica 10 ml de sangre con un sistema vacutainer y colocada 5 ml en un tubo con anticoagulante (heparina) para su separación con dextrán y 5 ml para la obtención de suero.

Separación de células fagocíticas con dextrán

La sangre obtenida se colocó en tubos cónicos con 5 ml de una solución de dextrán de 70,000 daltons al 6%, se mezcló suavemente y se incubó durante 20 min. a temperatura ambiente.

Se obtuvo el sobrenadante rico en leucocitos neutrófilos, el cual se lavó con PBS a 1500 rpm durante 5 min. a 4°C. En caso de observar presencia de glóbulos rojos se hizo lisis hipotónica con 20 ml de solución salina al 0.2%, con agitación suave por 20 segundos, e inmediatamente después se agregó 20 ml de solución salina al 1.6 %, se mezcló y centrifugo a 1500 rpm durante 5 min. a 4° C y se lavaron con PBS a 1500 rpm..

La viabilidad celular fue probada por la tinción de exclusión con azul tripano aceptando una viabilidad mínima del 95%.

Fagocitosis:

- Adherencia celular.

Las células fagocíticas previamente separadas con dextrán, fueron ajustadas a un volumen de 2×10^6 células/ml de PBS en cámara de Neubauer.

Posteriormente se depositaron 300 μ l de las células sobre cubreobjetos cortados en 4, desengrasados y colocados en tapones de hule. Se incubaron por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda para que las células se adhirieran al vidrio y se lavaron con PBS a 37°C.

-Preestimulación con *R. officinalis L.*

A continuación las células fagocíticas fueron preestimuladas durante 30 minutos a 37°C en atmósfera húmeda con la dilución óptima del aceite esencial de *R. officinalis L.* para estimular la respuesta inmune, se probó de una dilución 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128.

-Se lavó con PBS a 37°C.

-Oponización e ingestión:

Previo a la ingestión, se opsonizó *Candida albicans* con suero heterólogo al 10% y PBS a 37°C por 15 a.

Para la ingestión se expusieron las células adheridas y presensibilizadas con *R. officinalis L.*, a *C. albicans* opsonizada y se incubó durante 30 minutos a 37°C en atmósfera húmeda.

-Se lavó con PBS a 37°C

-Digestión. Se incubó con 300 μ l de PBS por 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

-Se lavó con PBS a 37°C.

-Tinción de Wright⁷⁰, se secó la preparación a temperatura ambiente, se agregó colorante de Wright 300 μ l por 10 minutos, luego se le agregó 50 μ l de agua destilada, se formó una capa metálica, se enjuagó con agua destilada y se dejó secar. Se montó en portaobjetos con resina.

-Observación al microscopio de luz. La cuantificación del proceso fagocítico se realizó en un microscopio de luz, observando la ingestión y digestión de 200 células por preparación. Se valoró el índice de ingestión y el índice de digestión.

- Grupo control: Se preestimuló en las mismas condiciones con PBS y sin *R. officinalis L.*

En todos los casos se hizo la valoración por duplicado.

- **ANÁLISIS ESTADÍSTICO:**

Se describieron los datos en cuadros y figuras utilizando media y desviación estándar debido a que son de escala de razón (UFC, Índice de ingestión, índice de digestión).

La estadística inferencial se utilizó para comparar el grupo control contra el grupo experimental (con aceite esencial de *R. officinalis L.*) a través de la prueba paramétrica *t* de student, aceptando como diferencia significativa una $p \leq 0.05$ y con un intervalo de confianza del 95%.

RESULTADOS

Se obtuvo 2.5 ml de aceite esencial de 150 g de las hojas pulverizadas de *R. officinalis L.* con 1350 ml de agua bidestilada por hidrodestilación a una temperatura de ebullición por 3 horas.

Para valorar la humedad del aceite esencial se obtuvo una replica de 0.9 ml de aceite esencial utilizando 50 g de las hojas pulverizadas de *R. officinalis L.* con 500 ml de agua bidestilada a temperatura de ebullición por 2 horas.

La humedad valorada de acuerdo a la norma American Spice Trade Association (Asociación Americana del Comercio de Especies = ASTA)⁷¹ fue de 7.5%, utilizando 40 g de las hojas pulverizadas de *R. officinalis L.* con 200 ml de tolueno durante 2 h calentado a una temperatura de ebullición y se obtuvieron 3.0 ml de agua valorada de la siguiente manera:

❖ HÚMEDAD

Formula:

$$\frac{\text{Agua obtenida} \times 100}{\text{Peso seco del polvo de la planta}} = \% \text{ de humedad}$$

Substituyendo:

$$\frac{3.0 \text{ ml de agua} \times 100}{40 \text{ g de las hojas pulverizadas } R. \text{ officinalis } L.} = 7.5\%$$

❖ FORMULA PARA LA MASA PARCIAL (HUMEDAD) DE LA BASE SECA :

Formula:

$$\frac{\% \text{ DE HUMEDAD} \times \text{PESO SECO TOTAL}}{100}$$

Substituyendo:

$$\frac{7.5 \% \times 50 \text{ g}}{100} = 3.75 \text{ g}$$

❖ CANTIDAD DE ACEITE ESENCIAL :

Formula:

BASE SECA INICIAL N MASA PARCIAL (humedad)

Substituyendo:

50 g - 3.75 g = **46.25g** BASE SECA SIN HUMEDAD.

❖ PORCENTAJE DE ACEITE ESENCIAL:

Formula:

$$\frac{\text{Aceite esencial obtenido X 100}}{\text{Peso de la masa parcial en base seca sin humedad}} = \% \text{ aceite esencial}$$

Substituyendo:

$$\frac{0.9 \text{ ml X 100}}{46.25 \text{ g}} = 1.94 \% \text{ en base seca (Replica)}$$

$$\frac{0.9 \text{ ml X 100}}{50 \text{ g}} = 1.8 \% \text{ en base húmeda (Replica)}$$

El índice de humedad aceptable se encuentra dentro del 10% para el *Rosmarinus officinalis* L. de acuerdo a la norma American Spice Trade Association (Asociación Americana del Comercio de Especies = ASTA).

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE *Rosmarinus officinalis* L.

Las cepas de *C. albicans* sensible y resistentes al fluconazol (R1109, R1165, R1120 y R22) fueron inhibidas por el *R. officinalis* L. a una dilución 1:2 del concentrado de 5 µl/ml que corresponde a la CMI de 2.5 µl/ml.

Previo a la valoración de la CMI se probó un grupo control con glicerol (densidad 1.257 g/ml) en substitución del aceite esencial de *R. officinalis* L. (densidad 0.892 N 0.910 g/ml) obteniéndose una concentración de UFC similar a las del grupo control con PBS (Ver Fig. 7).



Fig. 7 UFC de *C. albicans*

Fagocitosis:

Las células fagocíticas fueron obtenidas de sangre periférica de 8 mujeres y 7 hombres voluntarios con un promedio de edad 24.7 ± 6.2 años.

Para preestimar la respuesta inmune inespecífica en células fagocíticas, se preparó una solución concentrada de $1 \mu\text{l/ml}$ del aceite esencial de *R. officinalis L.* y se probaron las diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128, encontrando agregación celular de las diluciones 1:2 hasta la 1:8 (Ver Fig. 8). De la dilución 1:16 a 1:128, la dilución 1:32 que corresponde a $0.032 \mu\text{l/ml}$ (Ver Fig. 9), mostró un incremento mayor que el resto en el índice de ingestión de *C. albicans*. Dilución que se utilizó para valorar la respuesta inmune inespecífica en todos los casos.

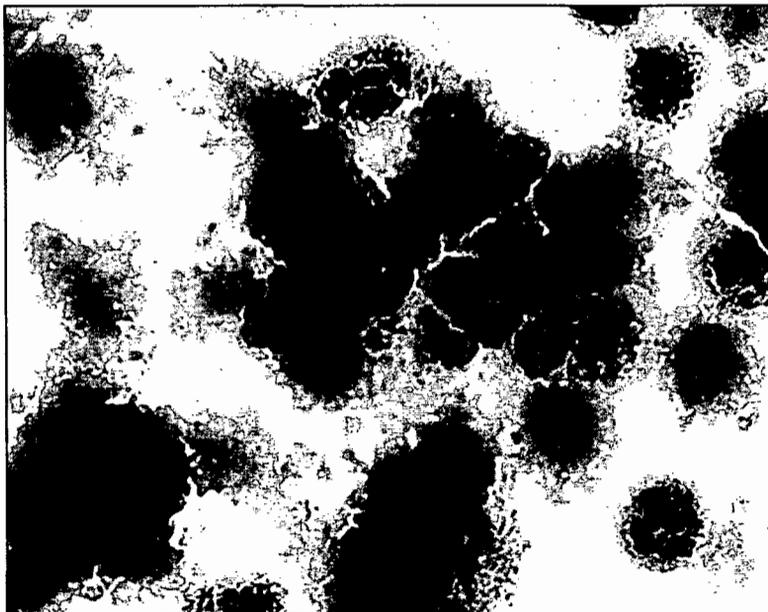
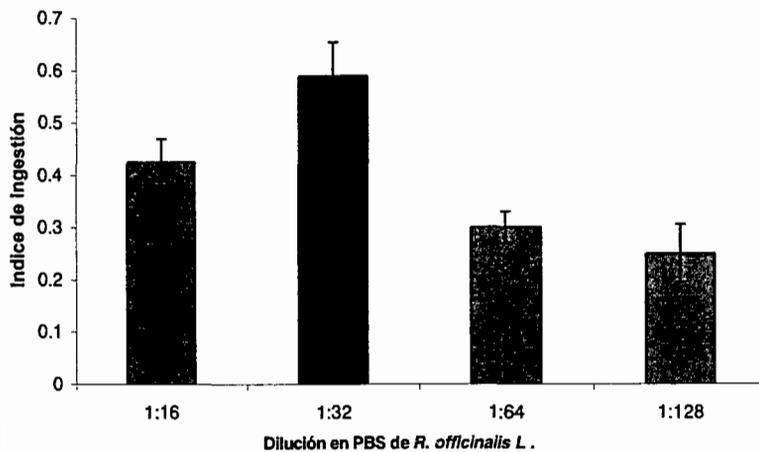


Figura 8. Células fagocíticas expuestas a aceite esencial de *R. officinalis L.* dilución 1:2.

Fig. 9 ÍNDICE DE INGESTIÓN DE *C. albicans* SENSIBLE A FLUCONAZOL POR FAGOCITOS DE SANGRE PERIFERICA EXPUESTOS A ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L.



Índice de Ingestión:

El promedio del Índice de Ingestión sin preestímulo con *R. officinalis L.* en las cepas sensibles R1109, R1120 y R22 de *C. albicans* utilizadas en este estudio fue de 0.255 ± 0.067 , 0.440 ± 0.120 , 0.540 ± 0.139 y 0.330 ± 0.120 ; al preestimar con *R. officinalis L.* se incremento significativamente ($p \leq 0.001$) a 0.587 ± 0.128 , 0.650 ± 0.130 , 0.740 ± 0.180 y 0.470 ± 0.110 ; con un porcentaje de incremento de 130.2%, 47.7%, 37.4% y 14.24% respectivamente. La única cepa donde el Índice de Ingestión disminuyó fue la R1165 de 0.480 ± 0.220 a 0.430 ± 0.110 (-10.41%) (Ver Fig. 10 y Fig. 11).

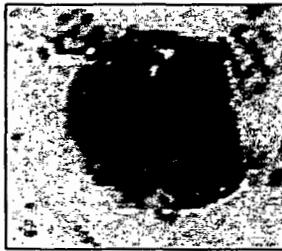
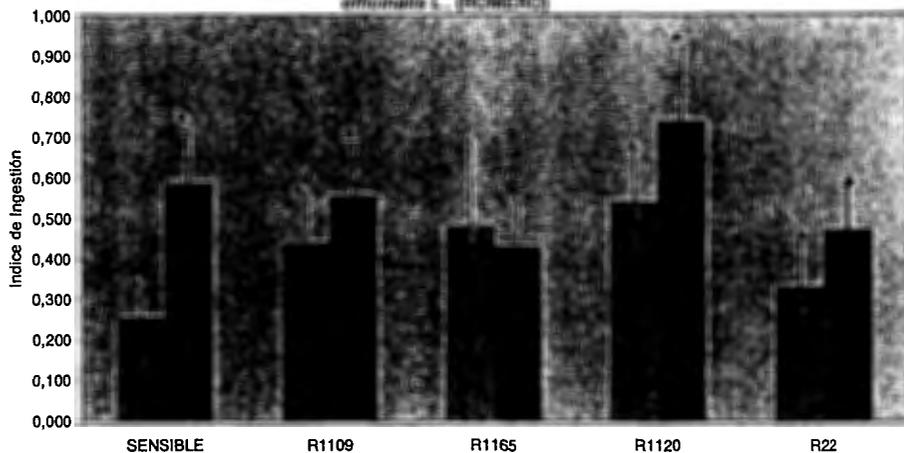


Fig.10 Fagocito expuesto al aceite esencial de *R. officinalis L.* (dilución 1:32) con 2 levaduras de *C. albicans* ingeridas.

FIG. 11 MEDIA DEL ÍNDICE DE INGESTIÓN DE *C. albicans* SENSIBLE O RESISTENTE (R) AL FLUCONAZOL POR NEUTRÓFILOS DE INDIVIDUOS SANOS PRE-ESTIMULADOS CON UNA DILUCIÓN 1:32 DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus*



n= 15 individuos/grupo

CONTROL VS ROMERO * $p \leq 0.001$

□ CONTROL ■ ROMERO

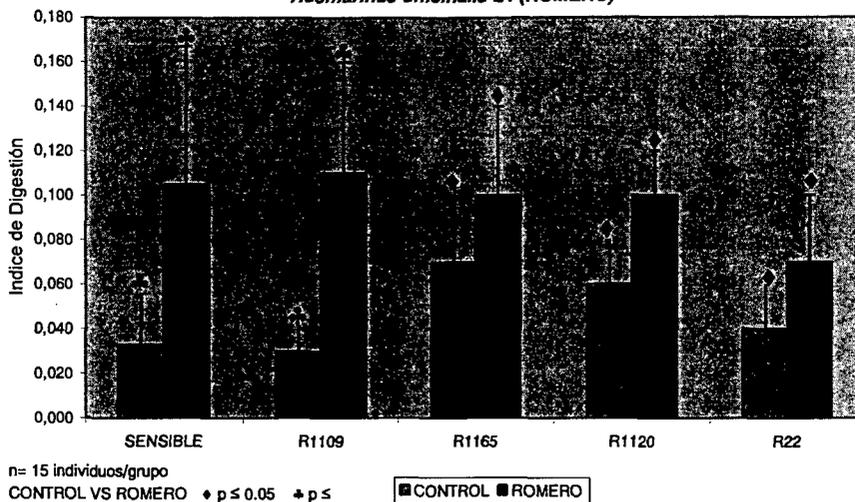
Índice de Digestión:

El promedio del Índice de Digestión en las cepas utilizadas sensibles a fluconazol fue de 0.033 ± 0.023 , en la R1109 de 0.030 ± 0.010 , en la R1165 de 0.070 ± 0.030 , en la R1120 de 0.060 ± 0.020 y en la R22 de 0.040 ± 0.020 . Estos valores se incrementaron al preestimar con *R. officinalis* L. a: 0.105 ± 0.062 ($p \leq 0.001$), 0.110 ± 0.050 ($p \leq 0.05$), 0.100 ± 0.020 ($p \leq 0.05$) y 0.070 ± 0.030 ($p \leq 0.05$) con porcentajes de incremento de 218.18%, 266.66%, 42.85%, 66.66% y 75% respectivamente (Ver Fig. 12 y Fig. 13).



Fig. 12 Fagocito expuesto al aceite esencial de *R. officinalis* L (dilución 1:32) con 2 levaduras de *C. albicans* digeridas.

FIG. 13 MEDIA DEL ÍNDICE DE DIGESTIÓN DE *C. albicans* SENSIBLE O RESISTENTE (R) AL FLUCONAZOL POR NEUTRÓFILOS DE INDIVIDUOS SANOS PRE-ESTIMULADOS CON LA DILUCIÓN 1:32 DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO)

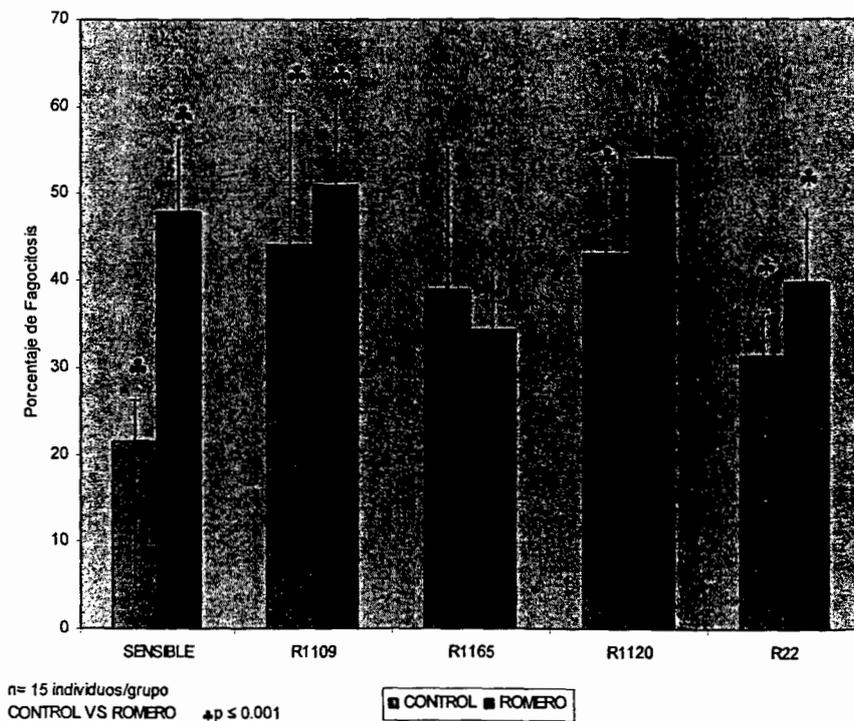


Porcentaje de Fagocitosis:

El promedio del porcentaje de fagocitosis encontrado fue de $43.03 \pm 9.49\%$ en la cepa de *C. albicans* sensible, $88.17 \pm 30.35\%$ en la R1109, $86.00 \pm 18.23\%$ en la R1120 y $62.87 \pm 10.16\%$ en la R22 los cuales tuvieron un incremento altamente significativo ($p \leq 0.001$) al preestimar con *R. officinalis* L. a 95.82% , 101.75% , 107.87% y 79.59% respectivamente (Ver Fig. 15).

La cepa R1165 no mostró una diferencia estadísticamente significativa de $78.00 \pm 32.57\%$ sin preestímulo a $68.80 \pm 13.97\%$ con el preestímulo de *R. officinalis* L.

FIG. 15 MEDIA DEL % DE FAGOCITOSIS DE *C. albicans* SENSIBLE O RESISTENTE AL FLUCONAZOL POR NEUTRÓFILOS DE INDIVIDUOS SANOS PRE-ESTIMULADOS CON LA DILUCIÓN 1:32 DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO)



DISCUSIÓN

Durante los últimos 20 años, los aceites esenciales de plantas, se han destacado entre otras funciones como antimicrobianos⁶¹.

En particular, se ha reportado que el aceite esencial de *R. officinalis L.* tiene efecto microbicida contra *C. albicans* y otros hongos;⁷ en este estudio se encontró este efecto en cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol.

La mayoría de los aceites esenciales tienen actividad microbicida, cuya eficiencia depende de la concentración y origen del aceite, así como del tipo de microorganismo y de la cepa⁷.

Esta capacidad de inhibir algunos microorganismos y otros no, muestra el potencial del grupo de los monoterpenos en el control de los procesos microbianos del medioambiente, donde ellos son abundantes⁷².

Cabe destacar que los principales compuestos de los aceites esenciales también presentes en los aceites de *R. officinalis L.* como el alcanfor y el 1,8-cineol han mostrado no tener efectos mutagénicos por la prueba de Ames⁷³, abriendo una pauta en las alternativas ecológicas de tratamientos microbicidas eficientes.

Los resultados de diferentes artículos científicos coinciden en que los principales componentes químicos del aceite esencial de la hojas de *R. officinalis L.* obtenidos

por hidrodestilación son los grupo de monoterpenos y sesquiterpenos, donde se destacan α -pineno (30.3%,), camfeno (9.26%), 1,8-cineol (8.5%), borneol (5.97%), β -pineno (1.37%)^{46, 60, 74} y en algunos casos limoneno y alcanfor⁶³.

Los aceites esenciales abundantes en 1,8-cineol, borneol y alcanfor entre otros, se han asociado con un efecto microbicida⁷⁵, en particular en la inhibición de *Candida albicans*^{76,77,78}.

Específicamente el 1,8-cineol tiene una elevada actividad bactericida⁷⁹ y antimicótica, se ha reportado que de 12 hongos, siete mostraron inhibición incluyendo *C. albicans*⁸⁰

Uno de los componentes de los aceites esenciales, el monoterpeno α -pineno ha mostrado a través de *microscopia electrónica*, que en el proceso de lisis celular de *C. albicans* se daña la pared celular, existe ruptura de la membrana citoplásmica y la liberación de sus componentes intracelulares⁸¹, apoyando esto el posible efecto directo del aceite esencial de *R. officinalis L.* sobre el hongo.

La actividad antifúngica del aceite esencial de *R. officinalis L.* fue altamente eficiente al mostrar una CMI 2.5 μ l/ml, aunque sus mecanismos antifúngicos se desconocen.

De acuerdo a lo reportado en la literatura científica para otros aceites esenciales, es posible que sus principales efectos antimicóticos sean a través del conjunto de los compuestos 1,8-cineol, borneol, alcanfor y α -pineno, aunque es posible que cualquiera de los monoterpenos y sesquiterpenos constituyentes del aceite tengan efecto microbicida.

Por otro lado, en este estudio se observó la estimulación del aceite esencial de *R. officinalis* L. sobre la respuesta inmune inespecífica de neutrófilos contra *C. albicans* resistente al fluconazol. A la fecha no existen evidencias sobre el aceite esencial de *R. officinalis* L. como inmunomodulador de la respuesta inmune inespecífica.

En particular, *Melaleuca alternifolia* contiene el terpeno 1,8-cineol, similar al de *R. officinalis* L. el cual se ha observado que suprime la producción del radical libre superóxido en monocitos pero no en neutrófilos⁸², lo cual da una luz en la posibilidad de la regulación selectiva de estos aceites en la respuesta inmune inespecífica.

Así mismo, este mismo terpeno 1,8-cineol, inhibe sobre monocitos estimulados por LPS *in vitro*, la formación de prostaglandinas y citoquinas⁸³, en particular el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF α), la Interleucina 1 β (IL-1 β), el leucotreno B4 y los tromboxanos^{84,85}.

Independientemente de esta inhibición, Cassella JP y cols., sugieren que los aceites esenciales tienen un efecto inmunoestimulante porque rechazan o detienen las infecciones⁸⁶. Son necesarios estudios sobre los mecanismos inmunológicos por los cuales los aceites esenciales puedan ejercer su efecto.

La determinación de la viabilidad celular expuesta a diferentes concentraciones del aceite esencial de *R. officinalis* L. mostró que una dilución menor a 1:8 daña la célula, posiblemente por la presión osmótica del *R. officinalis* L. a esas concentraciones. La curva del índice de ingestión (Ver Figs. 9 y 10) de las diluciones de 1:16 hasta 1:128 muestran que son capaces de fagocitar y estimular la respuesta inmune y que los factores físico-químicos del aceite no afectan su respuesta inmune inespecífica.

Los resultados de este estudio apoya el papel inmunoestimulante de *R. officinalis* L. en neutrófilos contra *C. albicans* resistente al fluconazol.

El posible efecto del aceite esencial *R. officinalis* L. mostrado en este estudio contra cepas resistentes al fluconazol es más eficiente porque estimula la respuesta inmune inespecífica contra este hongo a una concentración de 0.032 $\mu\text{l/ml}$, considerablemente más baja que la concentración de 2.5 $\mu\text{l/ml}$ que se requiere para un efecto microbicida directo contra este hongo.

La cepa R1165 resistente al fluconazol no incremento la respuesta inmune inespecífica como en el resto, al ser preestimulada con aceite esencial de *R. officinalis* L, posiblemente el mecanismo de resistencia al fluconazol como son las alteración de la permeabilidad de la membrana, la sobreproducción o modificación

del enzima lanosterol 14- α -dimetilasa, la expresión de proteínas transportadoras para antimicóticos que actúan como bombas de flujo⁸⁷ o por un cambio en la composición lipídica de la membrana del hongo⁸⁸, pudieran influir en la posible estimulación de este aceite. Se requieren estudios donde se determine el mecanismo de resistencia las cepas de *C. albicans* asociado a el efecto estimulante de *R. officinalis*.

El aceite esencial de *R. officinalis* L. es un producto biológico potencial para las nuevas estrategias terapéuticas contra los microorganismos de difícil control en la actualidad^{89,90}.

CONCLUSIONES

1. En este estudio el aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis L.* tiene actividad microbicida *in vitro* contra *C. albicans* resistente al fluconazol.
2. El aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis L.* incrementa significativamente el índice de ingestión y digestión y el porcentaje de fagocitosis de neutrófilos contra *C. albicans* resistente al fluconazol.

GLOSARIO

ACC: Agar Cerebro Corazón.

CCC: Caldo Cerebro Corazón.

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

IgG: Inmunoglobulina

μl: Microlitro

nm: Nanómetro

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4

PMN: Células polimorfonucleares o granulocitos.

SSF: Solución Salina Fisiológica.

TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa

UFC: Unidades formadoras de colonias.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Ghannoum MA. *Candida*: a causative agent of an emerging infection. *J Invest Dermatol* 2001;6(3):188-96.
- 2 Rex J., Rinaldi M., Pfaller J. Resistance of *Candida* Species to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1-8.
- 3 Wey SB, Motomi M, Pfaller MA, et al. Risk factors for hospital acquired candidemia. *Arch Intern Med* 1989;149:2349-53.
- 4 Tortorano AM, Biraghi E, Astolfi A, Ossi C, Tejada M, Farina C, Perin S, Bonaccorso C, Cabaña C, Raballo A. Grossa A. FIMUA Candidemia Study Group. *J Hospital Infection. European Confederation of Medical Mycology prospective survey of candidaemia: report from one italian region.* 2002;51(4):297-304.
- 5 White TC, Holleman S, Dy F, Mirels LF, Stevens DA. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy.* 2002;46(6):1704-13.
- 6 Phillipson JD. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 2001;56:236-43.
- 7 Mangena T, Muyima NYO. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. *Letters Applied Microbiology.* 1999;28:291-96.
- 8 Arenas R. Candidiosis. En: Arenas R. *Micología Médica. Interamericana.* Ed. Mc Graw Hill. México, D.F. 1993:223-233.
- 9 López-Martínez R, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F, Castañón-Olivares R. *Micología Médica.* México, D.F. Editorial Trillas 1995:99-104.
- 10 Davis BE, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS: *Tratado de Microbiología.* 4ª. ed. Barcelona, España: Masson, S.A. 1996:726-27.
- 11 Jeffrey CE. *Micología Médica.* En: Brooks GF, Batel JS, Ornston LN. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg.* México: Manual Moderno. 1996:655-690.
- 12 Diaz-Guerra TM, Martinez-Suarez JV, Laguna F, Valencia E, Rodríguez-Tudela JL. Change in fluconazole susceptibility patterns and genetic relationship among oral *Candida albicans* isolates. *AIDS* 1998;10:1601-10.

-
- 13 Ashman RB, Papadimitriou JM.. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. *Microbiological Reviews*. 1995;59(4):646-72.
- 14 Rippon A. *Tratado de Micología Médica*. 3ª. ed Interamericana 1990:25-30.
- 15 Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiología*. Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana. 1999:850-2.
- 16 Chrousos G. P. The stress response and immune function: clinical implications: the 1999 Novera H. Spector e Lecture. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;917:38-67.
- 17 Clark WR. *The experimental foundations of modern immunology*. 4a ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1991:4-6.
- 18 Soler AM, Hongwei Z. Neutrophil activation by bacterial lipoprotein vs lipopolysaccharide: differential requirements for serum and CD14. *J Immunol* 2000;164:2674-83.
- 19 Delves P, Roitt I, *Advances in Immunology: The immune system*. *NEJM I* 2000; 343(1):37-49.
- 20 Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 2002;14:136-145.
- 21 Rojas W. *Inmunología*. 10º ed. Medellín, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas. 1995:20-36.
- 22 Austyn JM, Wood KJ. *Principles of cellular and molecular immunology*, Oxford: Oxford University Press 1993:6-47.
- 23 Woods L. *The Immune system. How it work*. National Institutes of Health. National Cancer Institute, National Institute of Allergy and infectious diseases. 1996:25-30.
- 24 Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. 3a ed. St.Louis: Mosby 1993:1.6-1.7.
- 25 Janeway C, Travers P, Walport M, Capra D. *Inmunobiología*. Masson 2000:333-37.
- 26 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. 4ª ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2000:270-290.
- 27 Edman JC. *Micología Médica*. En: Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 17º ed Méx., D.F.: Manual Moderno. 2000:655-690.

-
- 28 Del Fabro M, Francetti L, et. al. Neutrophil physiology; role and mechanism of action in the immune response at gingival level. *Minerva Stomatologica*. May 2000; 49(5):227-48.
- 29 Butcher S, Chahel H, Lord JM. Ageing and the neutrophil: no appetite for killing?. *Immunology*. 2000;100(4):411-416.
- 30 Forsberg M, Lofgren R, Zheng L, Stendahl O. Tumour necrosis factor- α potentiates CR3-induced respiratory burst by activating p38 MAP kinase in human neutrophils. *Immunology*. 2001 103:465-72.
- 31 Beutler B, Poltorak A. Sepsis and evolution of the Innate Immune Response. *Crit Care Med* 2001;29:S1-S6.
- 32 Uthaisangsook S, Noorbibi KD, Bahana SL, Good RA, Haraguchi S. Innate immunity and its role against infections. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002;88:253-65.
- 33 Salih HR, Husfeld L, Adam D. Simultaneous cytofluorometric measurement of phagocytosis, burst production and killing of human phagocytes using *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* as target organisms. *Clinical Microbiol Infec*, 2000;6(5):251-8.
- 34 Bennett J. Fármacos antimicóticos. En: Goodman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª ed. Editorial Mc Graw Hill interamericana. México, D.F.1998;1255-1256.
- 35 Groll A., Walsh T., Azoles: Triazoles. En: Yu V., Merigan jr. T., Barriere S., Antimicrobial Therapy and vaccines. Editorial Williams & Wilkins. Estados Unidos de America. 1999 :1158-1170.
- 36 Metzger S, Hofmann H. Fluconazole-resistant *Candida* species from HIV infected patients with recurrent *Candida* stomatitis: cross resistance to itraconazole and ketoconazole. *Mycoses* 1997;40(Suppl 1):56-63.
- 37 Ruhnke M, Eigler A, Tennagen I, Geiseler B, Engelmann E and Trautmann M. Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microb.* 1994;32:2092-2098.
- 38 Laguna F, Rodriguez-Tudela JL, Martinez-Suarez JV, Polo R, Valencia E, Diaz-Guerra TM, Drona F, Pulido F. Patterns of fluconazole susceptibility in isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans*. *Clin Infect Dis* 1997;24:124-30.

39 Hunter KD, Gibson J, Lockhart P, Pithie A, Bagg J. Fluconazole-resistant *Candida* species in the oral flora of fluconazole-exposed HIV-positive patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:558-64.

40 Troillet N, Durussel C, Bille J, Glauser MP, Chave JP. Correlation between *in vitro* susceptibility of *Candida albicans* and fluconazole-resistant oropharyngeal candidiasis in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993;12:911-5.

41 Tumbarello M, Caldarola G, Tacconelli E, Morace G, Posteraro B, Cauda R, Ortona L. Analysis of the risk factors associated with the emergence of azole resistant oral candidosis in the course of HIV infection. *J Antimicrob Chemother* 1996;38:691-9.

42 Chryssanthou E, Torssander J, Petrini B. Oral *Candida albicans* isolates with reduced susceptibility to fluconazole in Swedish HIV-infected patients. *Scand J Infect Dis* 1995;27:391-5.

43 Lupetti A, Danesi R, Campana M, Del Taca M, Nelly S. Molecular basis of resistance to azole antifungals. *TRENDS in molecular Medicine* .2002;8:76-81.

44 Bedi MK, Shenefelt PD. Herbal Therapy in Dermatology. *Arch Dermatol*. 2002;138;232-42.

45 Giordani R, Trebaux J, Masi M, Regli P. Enhanced antifungal activity of ketoconazole by *Euphorbia characias* latex against *Candida albicans*. *Journal of Ethnopharmacology* 2001;78;1-5.

46 Kuklinski C. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. *Farmacognosia*. Barcelona, España: Ediciones Omega, S.A. 2000:515.

47 Phillipson J.D. Phytochemistry and medicinal plantas. *Phytochemistry*. 2001;56;237-43.

48 Capasso R, Izzo A.A, Pinto L, Bifulco T, Vitobello C, Mascolo N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. *Fitoterapia*. 2000;71;S58-65.

49 Hamburger M, Hostettmann K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*. 1991;30;3864-74.

50 Verategui MA, Sanchez CA, Heredia NL, Garcia-Alvarado JS. Antimicrobial activity of extracts of three major palnts from the Chihuahua desert. *J Ethnopharmacology*. 1996;52;175-7.

51 Ferensin GE, Tapia AA, Bustos DA. Antibacterial activity of some medicinal plants from Sanjuan Argentina. *Fitoterapia*. 2000;7;429-432.

-
- 52 García-Fajardo JA. Etude comparative de tríos techniques d'extraction des Hoiles essentielles d'origean (*Limpia gravedolerns* H.B.K et de la baie de piment (*Pimenta dioica* Merrill). Doctorado del Instituto Naconal Polytecnico de Toulouse. Especialidad : Sciences des Agroressources. 6 dic. 1995.
- 53 Bruneton J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Zaragoza, España: Editorial Acribias, S.A. 1993:231-251.
- 54 Lara-Ochoa F, Márquez AC. Plantas medicinales de México: Composición, usos y actividad biológica. México, D.F.: UNAM. 1996:85-87.
- 55 Marroquin JS. Taxonomia de plantas superiores. México, D.F.: Trillas.1994;290-295.
- 56 Muñoz-López de Bustamante F. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. España: Ediciones mundi-prensa. 1987:265-67.
- 57 Biachini F, Carrara-Pantano A. Guía de plantas y flores. México, D.F.: Grijalbo. 1993:401.
- 58 Martínez M. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. 2ª. ed México, D.F.: Fondo de cultura económica. 1987:1247.
- 59 Jones B.S. Sistemática vegetal México, D.F.: Fuentes impresores, S.A. 1988: 530.
- 60 Flamini G, Cioni PL, Morelli I, Macchia M, Ceccarini L. Main Agronomic productive characteristics of two ecotypes of *Rosmarinus officinalis* L y chemical composition of their essential oils. J Agric Food Chem 2002; 50, 3512-17.
- 61 Inouye S, Goi H, Miyauchi K, Muraki S, Ogihara M, Iwanami Y. Ihibitory effect of volatile constituents of plants on the proliferation of bacteria. J Antibacterial and Antifungal Agents. 1983(11):609-15.
- 62 Ibáñez E. Oca A, Murga G, López-Sebastián S, Tabera J, Reglero G. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed Rosemary plants. J Agric Food Chem 1999;47, 1400-1404.
- 63 Basile A, Jiménez-Carmona M, Clifford AA. Extraction of Rosemary by superheated water. J Agric Food Chem. 1998; 46:5205-9.
- 64 Svoboda K, Dens SG. Biological activities of essential oils from selected aromatic plants. Acta Hort. 1995;390:203-9.
- 65 Moore JA, Dalrymple DL: Experimental Methods in Organic Chemistry. 2da ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1975.

-
- 66 Essential oil association of USA, Inc. B Standards and specifications essential oil. New York, USA: 1997(1):9-12.
- 67 Cooper BH, Silva-Hunter M. Yeasts of Medical Importance. En: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology, American Society for Microbiology. Washington, D.C. 1985;526-541.
- 68 National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed standard M27-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 1997:1-51.
- 69 Baron EJ, Tenover FC, Tenover FC. Diagnostic Microbiology. Bailey & Scott's. 8^o. ed. St. Louis: The C.V. Mosby Company. 1990:171-194.
- 70 Smith DL, Rommel F: A rapid micro method for simultaneous determination of phagocytic microbicidal activity of human peripheral blood leukocytes in vitro. J Immunol Methods 1977;17:241-247.
- 71 Tainter DR, Grenis AT. Especies y aromatizantes alimentarios. Zaragoza, España: Editorial ACRIBIA, S.A. 1995:1-9.
- 72 Amaral JA, Ekins A, Richards SR, Knowles R. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, y aerobic metabolism by bacteria in pure culture. Applied and environmental microbiology. 1998;64(2):520-25.
- 73 Gomes-Carneiro M R, Felzenszwalb I, Paumgarten F J. Mutagenicity testing (+/-)-camphor, 1,8-cineole, citral, citronellal, (-)-menthol and terpineol with the Salmonella/microsome assay. Mutagenos. 1998;416(1-2):129-136.
- 74 Ibáñez E, Oca A, Murga G, López-Sebastián S, Tabera J, Reglero G. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed Rosemary plants. J Agric Food Chem 1999;47:1400-1404.
- 75 Faleiro M L, Miguel M G, Ladeiro F, Venancio F, Tavares R, Brito J C, Figueiredo, Barrosa J G. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of Thymus. Microbiology 2003;36(1):35-40.
- 76 Unla M, Daferera D, Danmez e, Polissiou M, Tepe B, Sacmen A. compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea teretifolia* (Compositae). Ethnopharmacology 2002;83(1-2):117-121.
- 77 Kalembe D, Kusewicz D, Swiader K. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai. Phitotherapia. 2002;16(3):288-291.

-
- 78 Hammerschmidt F J, Clark AM, Soliman F M , El-Kashoury E S, Abd M M, El-Fishawy A M. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Jasonia candicans* and *J. Montana*. *Planta Medica* 1993;59(1):68-70.
- 79 Miyazawa M, Hashimoto Y. Antimicrobial and bactericidal activities of esters of 2-endo-hydroxy-1,8-cineole as new aroma chemicals. *J Agric Food Chem.* 2002;50(12):3522-6.
- 80 Pattnaik S, Subramanyam VR, Bapaji M, Kole C R. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* 1997; 89(358): 39-46.
- 81 Xia Z, Mao X, Luo Y. Study on antifungal mechanism of alpha pinene. *Human Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 1999;24(6):507-9.
- 82 Brand C, Ferrante A, Prager RH, Riley TV, Carson CF, Finlay-Jones JJ, Hart PH. The water-soluble components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) suppress the production of superoxide. *Inflammation Res.* 2001;50(4):213-19.
- 83 Santos FA, Rao VS. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide presents in many plan essential oils. *Phytotherapy* 2000;14(4):240-244.
- 84 Juegens UR, Steber M, Vetter H. Inhibition of cytokine production and arachidonic acid metabolism by eucalyptol (1,8-cineole) in human blood monocytes in vitro. *Eur J Med Res.* 1988;3(11):508-10.
- 85 Finlay-Jones J, Hart P. Anti-inflammatory Activity of Tea Tree Oil. Rural Industries Research and Development Corporation. 2001;(01/10):1-26.
- 86 Cassella JP, Cassella S, Ashford RL. Use of essential oil therapies in immunocompromised patients. *J Antimicrobial Chemother* 2000;45:550-51.
- 87 White TC. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1482-7.
- 88 Hitchcock CA, Barret-Bee KJ, Russell NJ. The lipid composition and permeability to azole of an azole- and polyene-resistant mutant of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* 1987;25:29-37.
- 89 Bedi MK, Shenefelt PD. Herbal Therapy in Dermatology. *Arch Dermatol.* 2002;138;232-242.

90 Giordani R, Trebaux J, Masi M, Regli P. Enhanced antifungal activity of ketoconazole by *Euphorbia characias* latex against *Candida albicans*. *J Ethnopharmacology* 2001;78:1-5.

ANEXO



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA Y ZOOLOGÍA

Número

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto hago de su conocimiento que la Alumna: GLORIA NAZDIRA ABURTO CANSINO, Código 090271725 entrego para su determinación un ejemplar de herbario el cual fue identificado como *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae)

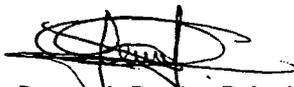
Dicho ejemplar se encuentra depositado en la colección del Herbario IBUG, de la Universidad de Guadalajara con el número de registro 156409.

Se extiende la presente a petición de la interesada, para los fines que a ella convenga.

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"Piensa y Trabaja"

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 10 de febrero de 2003.



Ing. Raymundo Ramirez Delgadillo
Curador del Herbario IBUG