



UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Facultad de Químico Farmacobiología



---

## TESIS

**“EFECTO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE MENTA,  
CLAVO Y CANELA SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA  
FUNCIÓN MITOCONDRIAL DE *Saccharomyces  
cerevisiae*”**

PRESENTA:

**OLIN TORRES ISIDRO**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

ASESOR DE TESIS:

**D. C. ELIZABETH CALDERON CORTÉS**

CO-ASESOR DE TESIS:

**D. C. CHRISTIAN CORTÉS ROJO**

MORELIA, MICHOACÁN, AGOSTO 2021

## **DEDICATORIAS**

Quiero dedicar esta tesis primeramente a Dios por darme fortaleza, perseverancia y sobre todo salud para llevar a cabo mis metas y objetivos.

A mi madre y hermana por su apoyo económico y moral durante toda la carrera universitaria.

A mi novio, por siempre alentarme.

A mi cuerpo de sinodales, por aceptar mi tesis.

A todos los que me ayudaron a escribir y concluir mi tesis, principalmente al Dr. Christian Cortés Rojo, por su paciencia y confianza.

A mi facultad de Químico Farmacobiología, que me ofreció la posibilidad de la educación superior.

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Infecciones fúngicas.....	1
1.2 Fluconazol.....	3
1.2.1 Resistencia fúngica al fluconazol.....	5
1.2.2 Mecanismos de resistencia al fluconazol.....	7
1.3 Cadena de transporte de electrones.....	9
1.3.1 Complejo I (NADH-ubiquinona-oxidoreductasa).....	12
1.3.1.1 NADH deshidrogenasas alternas en levaduras.....	13
1.3.2 Complejo II (succinato deshidrogenasa).....	15
1.3.3 Complejo III (ubiquinona citocromo c oxidorreductasa).....	17
1.3.4 Complejo IV (citocromo c oxidasa).....	19
1.3.5 Fosforilación oxidativa.....	21
1.4 La cadena de transporte de electrones en la virulencia de los hongos patógenos.....	23
1.5 Aceites esenciales de origen vegetal en el tratamiento de infecciones fúngicas.....	25
1.5.1 Aceite esencial de menta.....	30
1.5.2 Aceite esencial de clavo.....	32
1.5.3 Aceite esencial de canela.....	34
1.6 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de estudio de la fisiología de hongos patógenos.....	36
2. JUSTIFICACIÓN.....	37
3. HIPÓTESIS.....	38
4. OBJETIVOS.....	39
4.1 Objetivo General.....	39
4.1.1 Objetivos Específicos.....	39
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
5.1 Modelo experimental.....	40
5.2 Diseño experimental.....	40
5.3 Evaluación de la inhibición del crecimiento.....	41

5.4 Aislamiento de mitocondrias.....	42
5.5 Actividad de los complejos de la CTE.....	42
5.5.1 Determinación de la actividad del complejo II.....	42
5.5.2 Determinación de la actividad del complejo III.....	43
5.5.3 Determinación de la actividad del complejo IV.....	43
5.6 Determinación de ERO.....	44
5.7 Análisis estadístico.....	44
6. RESULTADOS.....	45
6.1 Efectos de los aceites de menta, clavo y canela sobre la inhibición de crecimiento en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	45
6.2 Efecto del tratamiento simultaneo con fluconazol y aceites esenciales en el crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	48
6.3 Efectos de los aceites de menta, clavo y canela sobre actividad de los complejos de la CTE en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	50
6.4 Efectos de los aceites de menta, clavo y canela sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	54
7. DISCUSIÓN.....	55
8. CONCLUSIÓN.....	60
9. BIBLIOGRAFÍA.....	61

## RESUMEN

Las especies de *Candida spp.*, son responsables de la mayoría de las infecciones micóticas oportunistas, siendo *Candida albicans* comúnmente la más aislada. El fluconazol es el tratamiento de primera elección para sus diferentes manifestaciones clínicas. Sin embargo, se ha demostrado que su uso indiscriminado a corto o largo plazo genera resistencia a este antifúngico. Esto hace necesario el descubrimiento de nuevos agentes con propiedades antifúngicas. En la naturaleza, existen diversos compuestos que pueden tener acción antifúngica al afectar el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones (CTE) de la mitocondria, la cual contribuye a la virulencia de este hongo. Una fuente potencial de dichos compuestos podrían ser los aceites esenciales de menta, clavo y canela, los cuales han mostrado potencial antimicrobiano, pero poco se ha elucidado acerca de su mecanismo de acción. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de los aceites esenciales de menta, clavo y canela en el crecimiento celular, el funcionamiento de la CTE y la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) de *S. cerevisiae*, un hongo que posee un estrecho parentesco con *C. albicans*. Además, se estudió el posible efecto sinérgico entre dichos aceites esenciales y el fluconazol. Se incubaron células de *S. cerevisiae* a 0.005%, 0.16%, 0.31%, 0.63%, y 1.25% (V/V), de aceites esenciales, en medio líquido YPD, durante 24 h. Se aislaron mitocondrias para medir los complejos respiratorios y las ERO. Se observó una inhibición del crecimiento de entre el 70 al 90% a concentraciones a partir del 0.16%. Por lo anterior, los efectos a nivel mitocondrial se estudiaron solo con 0.005% de los aceites para obtener una adecuada cantidad de mitocondrias. Los resultados mostraron que la actividad del complejo II se ve disminuido en presencia de los aceites de clavo y canela, mientras que el aceite de menta no causó un efecto significativo en este complejo. No se observó ningún efecto sobre las actividades de los complejos III y IV. La inhibición del complejo II correlacionó con una disminución en la producción de ERO observada con el tratamiento con los aceites. Este fenómeno puede ser debido a una menor oxidación del succinato o que alguno de los componentes antioxidantes del aceite este disminuyendo la producción de ERO a nivel mitocondrial. Por lo

anterior, se concluyó que a 0.005% de los aceites, el efecto tóxico no está relacionado con daño oxidativo en las células debido a una mayor producción de ERO, por lo que una perspectiva es estudiar el efecto de los aceites en la función mitocondrial y el estrés oxidativo a concentraciones mayores de 0.16%. Finalmente, no se observó una mejora de los efectos del fluconazol con la combinación con los aceites a concentraciones de 0.005% y 0.16%.

Palabras clave: Micosis, fluconazol, función mitocondrial, aceites esenciales (AE), Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

## ABSTRACT

*Candida spp.*, species are responsible for the majority of opportunistic fungal infections, with *Candida albicans* being the most commonly isolated. The fluconazole is the treatment of first choice for its different clinical manifestations. However, its indiscriminate use in the short or long term has been shown to generate resistance to this antifungal agent. This calls for the discovery of new agents with antifungal properties. In nature, there are several compounds that can have antifungal action by affecting the functioning of the electron transport chain (ETC) of the mitochondria, which contributes to the virulence of this fungus. A potential source of these compounds could be the essential oils of peppermint, clove and cinnamon, which have shown antimicrobial potential, but very little has been elucidated about their mechanism of action. Based on the above, the aim of the present work was to evaluate the effect of peppermint, clove and cinnamon essential oils on cell growth, the CTE function and the reactive oxygen species (ROS) production of *S. cerevisiae*, a fungus closely related to *C. albicans*. In addition, the possible synergistic effect between these essential oils and fluconazole was studied. *S. cerevisiae* cells were incubated at 0.005%, 0.16%, 0.31%, 0.63%, and 1.25% (V/V), of essential oils, in liquid YPD medium, for 24 h. Mitochondria were isolated to measure respiratory complexes and ROS. 70-90% growth inhibition was observed at concentrations starting at 0.16%. Therefore, the effects at the mitochondrial level were studied with only 0.005% of the oils to obtain an adequate amount of mitochondria. The results showed that the activity of complex II is decreased in the presence of clove and cinnamon oils, while peppermint oil did not cause a significant effect on this complex. No effect on the activity of complexes III and IV was observed. Inhibition of complex II correlated with a decrease in ROS production observed with treatment with the oils. This phenomenon may be due to a lower oxidation of succinate or that some of the antioxidant components of the oil are decreasing ROS production at the mitochondrial level. Therefore, it was concluded that at 0.005% of the oils, the toxic effect is not related to oxidative damage in the cells due to a greater production of ROS, so one perspective is to study the effect of the oils on mitochondrial function and oxidative stress at concentrations higher than 0.16%. Finally, no improvement

of the effects of fluconazole was observed with the combination with oils at concentrations of 0.005% and 0.16%.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Infecciones fúngicas

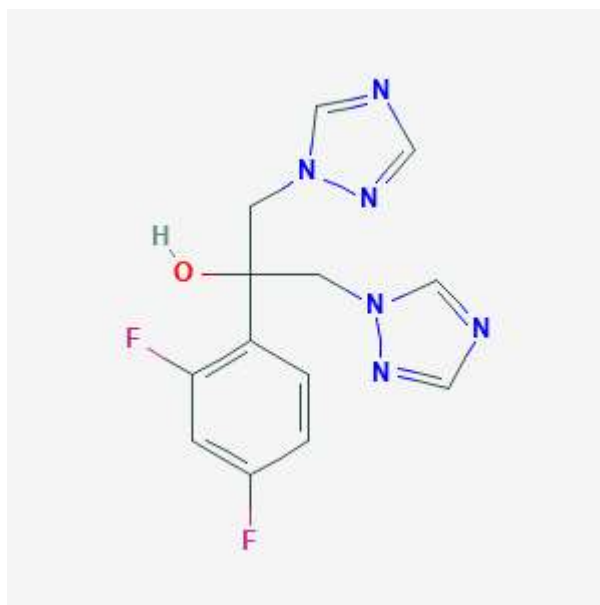
Los hongos son organismos eucariotas que poseen núcleos organizados, cuya membrana nuclear está bien definida. En su citoplasma encontramos mitocondrias, vacuolas, vesículas, retículo endoplasmático, microtúbulos, ribosomas y complejo de Golgi. Pueden ser unicelulares o pluricelulares; aerobios, heterótrofos y en general no motiles. La pared celular es rígida y generalmente está formada por quitina (N-acetilglucosamina), glucano y mano-proteínas; además, la membrana plasmática contiene esteroides, principalmente ergosterol, que constituye el blanco de acción de algunos fármacos antimicóticos. Se reproducen sexualmente (hongos perfectos o teleomorfos) y asexualmente (hongos imperfectos o anamorfos). El producto final de su producción se conoce como esporas, también llamadas conidios (Bonifaz Trujillo, 2012; Ruiz-Pérez et al., 2013). Los hongos, o las enfermedades que producen, se conocen desde la más remota antigüedad; los griegos y los romanos describieron algunas de las manifestaciones clínicas de las dermatofitosis, como el querión y la mentagra (Arenas Guzmán, 2014). Las infecciones micóticas se dividen en superficiales y profundas, dentro de las superficiales se encuentran las infecciones de piel, uñas y de las mucosas orofaríngea y vaginal, mientras que las profundas comprometen órganos, mucosa gastrointestinal y el torrente sanguíneo (Lazo et al., 2018).

Durante los últimos 30 años, la incidencia de infecciones micóticas oportunistas ha aumentado de manera significativa y constante en todo el mundo. Estas micosis son causadas por hongos filamentosos y levaduras, principalmente de los géneros *Aspergillus spp.* y *Candida spp.*, respectivamente. Sin embargo, *Candida spp.* es la principal causa de micosis en el mundo, especialmente en pacientes neutropénicos, con neoplasias tratadas con inmunosupresores, pacientes sometidos a cirugía o trasplante de órganos, lactantes prematuros y pacientes con VIH / SIDA. De las diferentes formas clínicas de candidiasis, la variedad invasiva es un problema persistente de salud pública. Las tasas de incidencia y mortalidad

asociadas con esta enfermedad infecciosa se han mantenido sin cambios durante más de una década a pesar de los importantes avances en el campo de la terapia antifúngica. El género *Candida spp.* pertenece a la familia de las *Cryptococcaceae* (Figueras et al., 2011) e incluye más de 200 especies, de las cuales *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* se reconocen como patógenos humanos con mayor frecuencia. Se ha considerado que *C. albicans* es la especie predominante en las infecciones del torrente sanguíneo; sin embargo, en las últimas dos décadas, ha habido una tendencia creciente de infecciones causadas por otras especies del género (Reyes-Montes et al., 2017).

## 1.2 Fluconazol

El nombre IUPAC del fluconazol es el 2-(2,4-Difluorofenil) -1,3 di (1*H*-1, 2, 4-triazol-1-il) propan-2-ol (Figura 1). Su peso molecular es de 306.3 g/mol. Es un polvo blanco cristalino, altamente soluble en metanol, soluble en acetona y alcohol, moderadamente soluble en cloroformo e isopropanol, ligeramente soluble en agua, y muy poco soluble en tolueno (Argentina & Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina, 2003). Se caracteriza estructuralmente por tener dos anillos de 5 miembros con 3 átomos de nitrógeno (Valdés & Susana, 2005). Los grupos triazol y la inserción de 2 átomos de flúor aumentan la polaridad y la hidrosolubilidad del fármaco, lo que permite su uso en forma parenteral (Debruyne & Ryckelynck, 1993).



**Figura 1.** Estructura del fluconazol. Tomado de (National Center for Biotechnology Information, 2021).

Los antifúngicos son compuestos de origen natural o sintético, que pueden producir modificaciones en estructuras básicas de la célula fúngica inhibiendo su desarrollo y alterando su viabilidad. Actualmente, existen varias familias de antifúngicos disponibles en el mercado siendo uno de los más comunes los azoles (Fuentes et al., 2014). El fluconazol es un antimicótico del grupo de los azoles, específicamente un triazol, fue desarrollado por Pfizer, aprobado para su uso a principios de 1990, y cubre muchas de las deficiencias de los imidazoles. A diferencia del ketoconazol, el fluconazol es más soluble en agua y puede administrarse por vía intravenosa a pacientes gravemente enfermos (Maertens, 2004). Es activo contra *Cryptococcus neoformans*, especies de *Candida spp.*, *Histoplasma spp.*, *Blastomyces spp.*, y *Coccidioides spp.*, pero carece de actividad contra los mohos (Campoy & Adrio, 2017). Es el tratamiento de primera línea de la candidemia y de la candidiasis diseminada en enfermos sin neutropenia. No obstante, el tratamiento inicial de las infecciones por *Candida spp.*, debe basarse en la epidemiología de cada hospital. En centros donde la resistencia a fluconazol sea escasa a (<10-15%), puede emplearse este fármaco en enfermos estables (Estrella, 2010).

El fluconazol actúa perturbando la permeabilidad de la membrana fúngica al inhibir la síntesis del ergosterol por inhibición de la esteroil 14  $\alpha$ -desmetilasa. Esta enzima contiene una molécula de protoporfirina en su sitio activo. Los azoles se unen al hierro de la porfirina y causan el bloqueo de la vía de biosíntesis del ergosterol fúngico, lo que resulta en la acumulación de 14  $\alpha$ -metil esteroides, alterándose así la permeabilidad de la membrana de las células fúngicas y afectando ciertos sistemas enzimáticos de membrana, que resultan en la inhibición del crecimiento micótico. El ergosterol es el componente principal de la membrana celular de los hongos y contribuye a una variedad de funciones celulares como la fluidez e integridad de la membrana y la función adecuada de las enzimas unidas a la membrana (Campoy & Adrio, 2017).

### 1.2.1 Resistencia fúngica al fluconazol

En los últimos años, el número de casos de micosis con falla terapéutica se ha incrementado en el mundo, lo cual es atribuible a una deficiencia en la función inmunológica, baja biodisponibilidad de los antimicóticos, alteraciones en el metabolismo de los antifúngicos, interacciones medicamentosas y resistencia antifúngica primaria o secundaria. Durante muchos años, los compuestos antimicóticos fueron escasos y poco efectivos. Para el tratamiento de las micosis superficiales se contaba únicamente con griseofulvina y nistatina. A partir de mediados del siglo pasado, la comercialización de anfotericina B, aunque tóxica, ayudó de manera importante en el tratamiento de micosis sistémicas. Con el advenimiento de los azoles tópicos como el miconazol y clotrinazol, y posteriormente los azoles sistémicos como ketoconazol, itraconazol, fluconazol y voriconazol, el tratamiento de las micosis superficiales y sistémicas se simplificó, mejorando las expectativas de curación en estas infecciones. Sin embargo, con la pandemia del SIDA, así como por el uso indiscriminado de drogas esteroides, cirugías y trasplantes, muchos investigadores notaron la aparición de casos de fallas en la terapéutica antimicótica a diversos compuestos como ketoconazol, fluconazol e incluso anfotericina B. Aunque no se han cuantificado los casos de resistencia en hospitales de atención general y de especialidades en México, se ha observado un incremento importante en el número de pacientes con micosis que no responden a los tratamientos; en algunos casos ha sido posible demostrar deficiencias inmunológicas. En otros, el comportamiento clínico hace sospechar resistencia primaria o secundaria a los antifúngicos, principalmente en quienes reciben estos medicamentos como profilaxis o tratamientos repetidos por micosis recidivantes (Manzano-Gayosso et al., 2008).

La resistencia a los antifúngicos es un proceso evolutivo basado en la selección natural de organismos que mejoran su capacidad para sobrevivir y crecer en presencia de fármacos. La evolución de la resistencia a los agentes antimicrobianos es de naturaleza ubicua y los microbios desarrollan diversas estrategias para combatir la acción de los fármacos (Campoy & Adrio, 2017). Las infecciones debidas a la presencia de biopelículas fúngicas son una preocupación clínica importante, ya que estas estructuras se caracterizan por una mayor resistencia a la terapia antifúngica (Ibrahim et al., 2015; Ortega-Peña & Hernández-Zamora, 2019).

*Candida albicans* es un hongo patógeno oportunista de los seres humanos y la principal causa de candidiasis orofaríngea (COF) en pacientes con SIDA. El fluconazol se usa ampliamente para tratar la COF. Sin embargo, ha habido numerosos informes de fracasos del tratamiento en pacientes que reciben terapia prolongada con fluconazol, y se ha demostrado que estos fracasos se deben a la aparición de cepas de *C. albicans* resistentes al fluconazol (Franz et al., 1998).

## 1.2.2 Mecanismos de resistencia al fluconazol

Para contrarrestar los efectos fungicidas o fungistáticos de todas las clases de antifúngicos, los microorganismos desarrollan tres mecanismos principales de resistencia. El primero se basa en la disminución de la concentración efectiva del fármaco, el segundo en las alteraciones de la diana del fármaco y el tercero se debe a modificaciones del metabolismo para disminuir los efectos tóxicos que ejercen algunos agentes antifúngicos. Un mecanismo para disminuir la concentración intracelular del fármaco es aumentar la salida del fármaco. La resistencia a los fármacos antifúngicos está mediada por la actividad de sistemas de transporte como la clase de resistencia pleiotrópica a fármacos (PDR), de transportadores de casete de unión a ATP (ABC), y transportadores de la superfamilia de facilitadores principales (MFS) (Campoy & Adrio, 2017).

La superfamilia ABC constituye la mayor familia de transportadores de membrana. El término ABC deriva del inglés “ATP binding- cassette” el cual hace referencia a los dominios catalíticos, altamente conservados, de la proteína que une ATP durante el transporte; también se pueden encontrar como caja de unión a ATP. En el genoma humano existen 49 genes conocidos para las proteínas de la familia ABC. En animales inferiores, plantas y microorganismos, también existen genes que codifican para este tipo de transportadores (Morales-Pérez & Garcia-Milian, 2017).

La MFS es una superfamilia de transportadores antigua y ubicua que consta de más de 15.000 miembros secuenciados, y este número está creciendo rápidamente con la aparición continua de secuencias del genoma. Los miembros de la MFS tienen un espectro de sustratos extraordinariamente amplio, que incluye iones, nucleósidos, aminoácidos, péptidos cortos y lípidos orgánicos e inorgánicos. Los miembros de la MFS incluyen facilitadores, simportadores y antiportadores, que mueven los sustratos a través de las membranas a través de la difusión, el co-transporte o el intercambio facilitado, respectivamente (Yan, 2015).

La expresión de los genes ERG11, MDR y CDR presentes en las especies de *Candida spp.*, y en muchos otros hongos, están implicados en la resistencia a los azoles. Varios mecanismos conducen a una resistencia adquirida a azoles, siendo el más común la inducción de bombas de eflujo, codificadas por los genes MDR y CDR, y la adquisición de mutaciones puntuales en el gen ERG11 que codifica para la enzima blanco (14  $\alpha$ -desmetilasa) de estos fármacos (Martínez et al., 2002).



### 1.3 Cadena de transporte de electrones

La cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial, es una serie de transportadores electrónicos, la mayoría proteínas integrales de membrana, que transfieren los electrones que proceden de las coenzimas reducidas hasta el oxígeno. La mayoría de los componentes están organizados en cuatro complejos, cada uno de los cuales consta de varias proteínas y grupos prostéticos (McKee et al., 2005). A esos complejos se les asignan los números I al IV. Los cuatro complejos enzimáticos contienen una gran variedad de centros de óxido-reducción que pueden ser cofactores, como flavín mononucleótido (FMN) o ubiquinona (Q). Otros complejos contienen centros hierro - azufre (Fe-S), grupos hemo en los citocromos, y proteínas con cobre (Horton, 2006).

El primer modelo que se propuso para explicar la organización de la CTE fue el modelo de difusión al azar, que propone que los grandes complejos se mueven aleatoriamente dentro de la membrana mitocondrial interna y que los electrones fluyen entre ellos conectados por los portadores móviles de electrones como la ubiquinona y el citocromo c (Lenaz & Genova, 2007).

La Q es una quinona isoprenoide que fue aislada por primera vez por Crane (Crane et al., 1957), determinándose su estructura poco después como 2,3-dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-1,4-benzoquinona (Wolf et al., 1958). Esta puede aceptar un electrón transformándose en el radical ubisemiquinona ( $\cdot$ QH) o dos electrones formando ubiquinol (QH<sub>2</sub>), donde la reducción completa requiere dos electrones y dos protones y se produce en dos pasos a través del radical  $\cdot$ QH intermedio (Nelson et al., 2019). El QH<sub>2</sub> además desempeña una función antioxidante en diferentes tejidos, protegiendo las membranas celulares de la peroxidación lipídica (Bentinger et al., 2007).

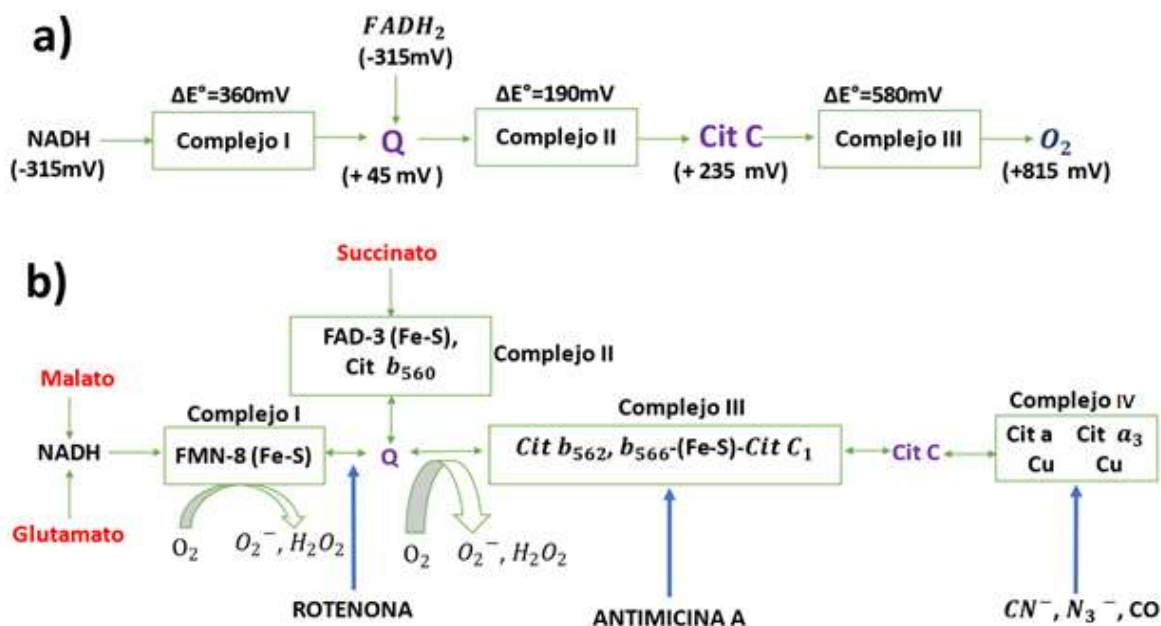
Las flavoproteínas son componentes de importancia de los complejos I y II (Harper et al., 2013). Las coenzimas flavín adenín dinucleótido (FAD) y flavín mononucleótido (FMN) se derivan de la riboflavina o vitamina B2. El nucleótido de flavina oxidado puede aceptar un electrón (dando la forma de semiquinona) o dos (produciendo FADH<sub>2</sub> o FMNH<sub>2</sub>). La transferencia electrónica se da gracias a que la flavoproteína tiene un potencial de reducción estándar superior al del compuesto oxidado (Nelson et al., 2019).

Las proteínas con centros Fe-S (proteínas con hierro no hémico) se encuentran en los complejos I, II y III, los cuales pueden contener uno, dos o cuatro átomos de Fe enlazados a átomos de azufre inorgánico. Los centros Fe-S participan en reacciones de transferencia de un solo electrón en las cuales un átomo de Fe pasa y cambia su estado de oxidación de férrico (Fe<sup>+3</sup>) a ferroso (Fe<sup>+2</sup>) (Harper et al., 2013).

La transferencia de electrones en la CTE ocurre de la siguiente manera: la nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH + H) producido durante el catabolismo es oxidado por el complejo I (NADH:Q oxidoreductasa), el cual transfiere los electrones a la Q para convertirse en QH<sub>2</sub>. Por otro lado, el succinato formado en el ciclo de Krebs se oxida en el complejo II (succinato:Q oxidoreductasa) y sus electrones son transferidos a la Q para la formación de QH<sub>2</sub>. Posteriormente, el complejo III (QH<sub>2</sub>:citocromo c oxidoreductasa) oxida al QH<sub>2</sub> y reduce al citocromo c, el cual es oxidado por el complejo IV (citocromo c oxidasa), lugar en el que se completa la transferencia de electrones al O<sub>2</sub> para formar H<sub>2</sub>O (Wallace, 1999).

Este proceso, en el que se utiliza al oxígeno para generar energía a partir de las moléculas de alimento, suele denominarse respiración aerobia. La energía que se libera durante la transferencia electrónica está acoplada a varios procesos endergónicos, de los que el más importante es la síntesis de ATP. Las coenzimas reducidas como el NADH + H y el FADH<sub>2</sub>, que proceden principalmente de la glucólisis, descarboxilación del piruvato, ciclo de Krebs y oxidación de los ácidos grasos, son las principales fuentes de electrones (McKee et al., 2005).

La CTE constituye la principal fuente intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la mayoría de los tejidos. Los complejos I y III son los principales generadores de radicales (Esper et al., 2016). La concentración en estado estacionario de estos oxidantes se mantiene a niveles no tóxicos mediante una variedad de defensas antioxidantes de naturaleza enzimática y no enzimática. El delicado equilibrio entre las defensas antioxidantes y la producción de ERO puede verse alterado por defensas antioxidantes deficientes, inhibición del flujo de electrones o exposición a xenobióticos. Este desequilibrio aparece como denominador común en diversos procesos patológicos en los que la agresión oxidativa resultante provoca daño tisular y, finalmente, muerte celular (Turrens, 2003).

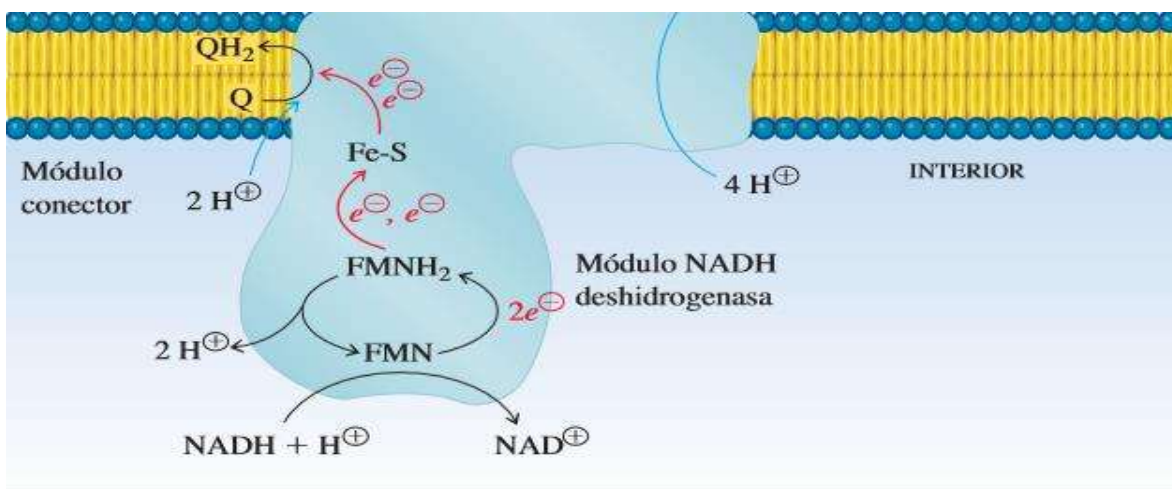


**Figura 2.** La cadena de transporte de electrones mitocondrial. En a) se muestran los potenciales estándar de reducción ( $E^\circ$ ) de sus componentes más móviles y el  $\Delta E^\circ$  de tres complejos donde se recolecta suficiente energía libre para sintetizar ATP. En b) se muestran los sitios de producción de ERO y los sitios de acción de los inhibidores respiratorios de uso común. Tomado y modificado de (Liu et al., 2002).

### 1.3.1. Complejo I (NADH:ubiquinona oxidorreductasa)

Es una proteína en forma de L, con un dominio de membrana y un dominio periférico, cuya estructura ha sido revelada por microscopía electrónica (Lenaz et al., 2006). Es el más grande de los complejos al estar formado por 45 subunidades de las cuales, 14 están involucradas en su catálisis, mientras que el resto, son consideradas subunidades estructurales. Contiene un FMN, el cual oxida el  $\text{NADH} + \text{H}^+$ , y 8 centros Fe-S (2 binucleares y 6 tetranucleares) los cuales transfieren los electrones hasta el sitio de unión a Q (Hirst, 2009). La composición de subunidades del complejo I de mitocondrias humanas, bovinas y fúngicas tiene variaciones significativas (Lenaz et al., 2006).

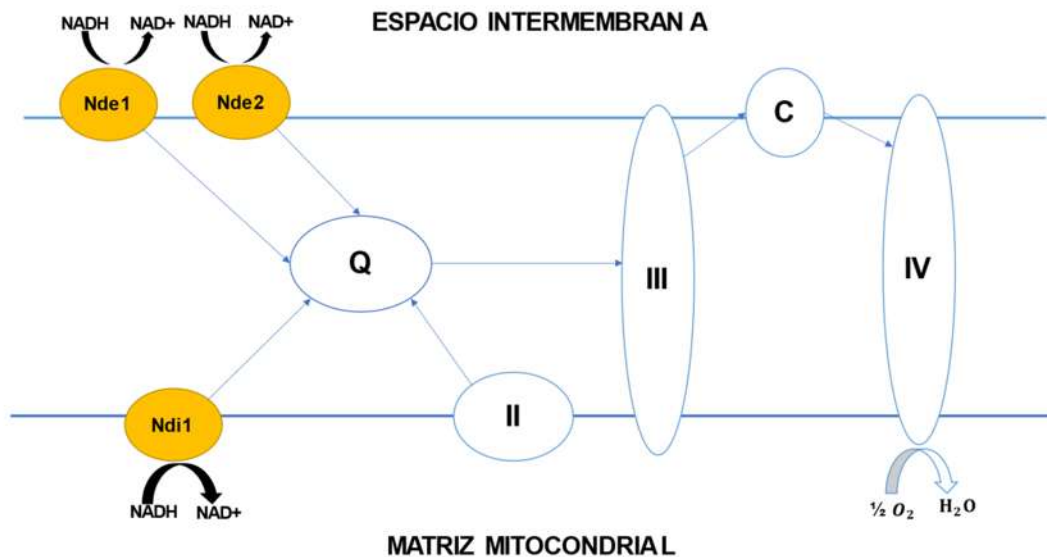
Durante el ciclo catalítico del complejo I, el primer paso es la transferencia de un ion hidruro al FMN para formar  $\text{FMNH}_2$ , el cual transfiere los electrones a una secuencia de ocho centros Fe-S. Los centros Fe-S proporcionan un canal donde los electrones se transfieren desde un ambiente hidrosoluble hacia el ambiente hidrofóbico de la membrana, donde la Q acepta dos electrones para reducirse a  $\text{QH}_2$  (Horton, 2008). La transferencia secuencial de los 2 electrones al primer centro Fe-S libera en última instancia 4 protones al espacio intermembrana (McKee et al., 2005).



**Figura 3.** Estructura y flujo de electrones del complejo I de la CTE. Tomado de (Horton, 2008).

### 1.3.1.1 NADH deshidrogenasas alternas en levaduras

*Saccharomyces cerevisiae* carece de un complejo I canónico sensible a rotenona, un inhibidor clásico del complejo I (Figura 2); en su lugar, contiene tres deshidrogenasas alternas insensibles a rotenona, que están asociadas a la membrana interna, una expuesta hacia la matriz mitocondrial (Ndi1) y las dos restantes expuestas hacia el espacio intermembrana (Nde1 y Nde2). Cabe mencionar que ninguna de estas deshidrogenasas bombea protones al espacio intermembrana, por lo cual no contribuyen a la generación del gradiente electroquímico en la mitocondria (Bakker et al., 2001).



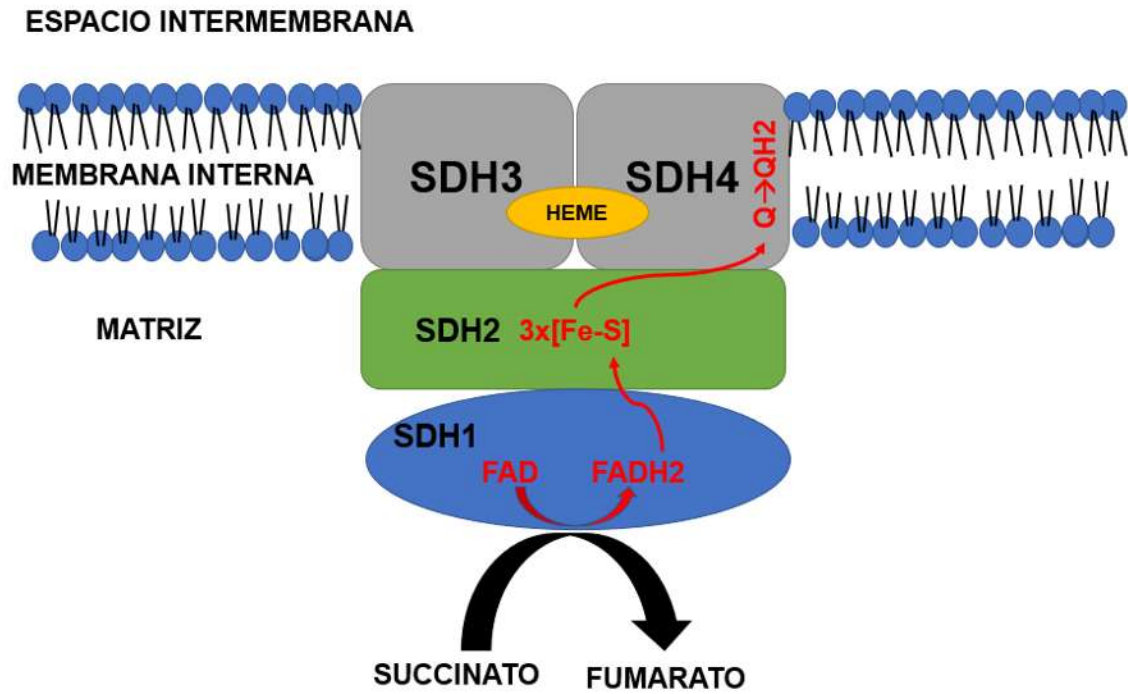
**Figura 4.** Composición de la cadena transportadora de electrones de *S. cerevisiae*, con la flecha (→) se indica el flujo de electrones a través de los complejos. Ndi1, Nde1 y Nde2 (deshidrogenasas alternas); Q (ubiquinona); complejos II, III y IV; C (citocromo c). Tomado y modificado de (Macedo-Márquez, 2012).

En contraste con el complejo I, que se compone de 45 subunidades, Ndi1p consta de una sola subunidad y carece de centros Fe-S. Esta enzima, denominada "NADH deshidrogenasa interna", cataliza la transferencia de dos electrones del NADH intramitocondrial a la ubiquinona. Las dos deshidrogenasas externas (Nde1 y Nde2) oxidan el NADH + H citosólico, el cual es transportado desde el citosol hacia el espacio intermembrana por el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Bakker et al., 2001).

### 1.3.2 Complejo II (succinato deshidrogenasa)

Es el componente del ciclo del ácido cítrico unido a membrana interna mitocondrial, que también funciona como un componente de la cadena respiratoria. Este complejo no atraviesa la membrana interna mitocondrial y tampoco transloca protones al espacio intermembrana. Sin embargo, cataliza la oxidación del succinato a fumarato, transfiriendo los electrones del FADH<sub>2</sub> hacia la Q. La succinato deshidrogenasa está regulada alostéricamente por la unión del oxalacetato y es activada por ATP en un proceso que no implica fosforilación.

Se compone clásicamente de cuatro subunidades (Figura 5): una flavoproteína (SDH1) que contiene un grupo prostético FAD unido, una proteína Fe-S (SDH2) que contiene tres centros Fe-S y dos pequeñas proteínas integrales de membrana (SDH3 y SDH4) que se unen a un grupo hemo que forma un citocromo *b*. Los electrones se transfieren desde el succinato al FADH<sub>2</sub> y posteriormente hacia los tres centros Fe-S y a la Q. El grupo hemo *b* no participa en la transferencia de los electrones, pero protege de la formación de ERO al impedir la fuga de electrones durante su ciclo catalítico (Huang & Millar, 2013; Lehninger et al., 2006).

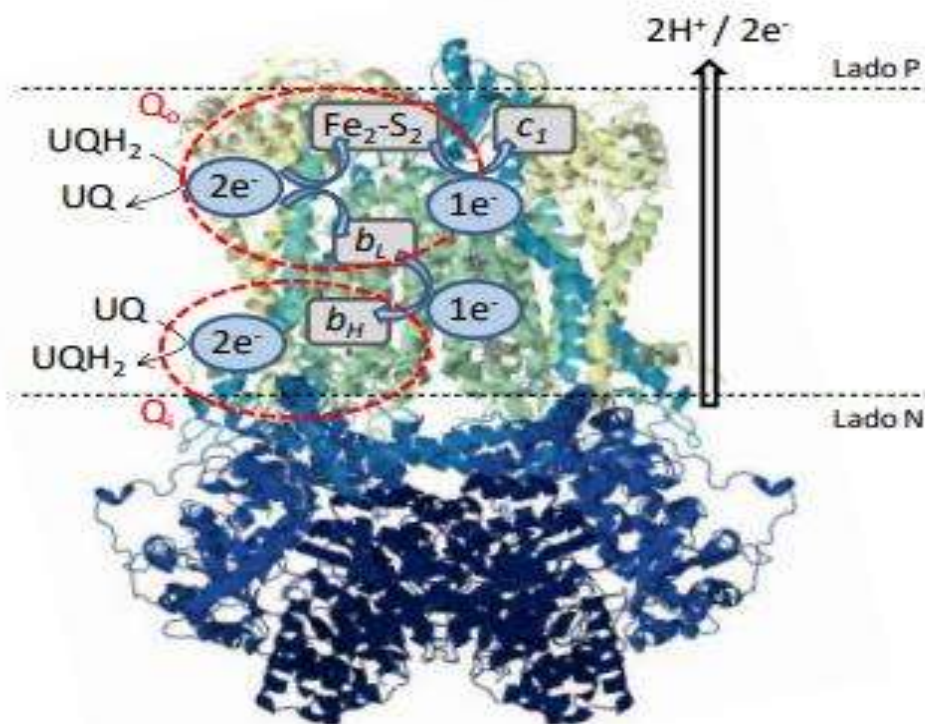


**Figura 5.** Estructura y flujo de electrones en el complejo II de la CTE. Tomado y modificado de (Iglesias, 2018).



### 1.3.3 Complejo III (ubiquinona - citocromo c oxidorreductasa)

El complejo III fue purificado por primera vez por Rieske (Rieske et al., 1964) a partir de mitocondrias de corazón de vaca (*Bos taurus*). Este complejo es un dímero cuyos monómeros contienen once subunidades idénticas en mamíferos y nueve en la levadura. Sus subunidades catalíticas son el citocromo  $c_1$ , el citocromo  $b$ , el cual contiene un hemo de bajo potencial redox ( $b_L$ ) y otro de alto potencial ( $b_H$ ), y la proteína de Rieske, la cual contiene un centro  $2Fe-2S$ . Estas cadenas polipeptídicas que contienen los componentes redox del complejo se conectan con dos sitios de unión a ubiquinona, uno ubicado hacia el espacio intermembrana (sitio  $Q_0$  o  $Q_P$ ) y otro localizado hacia la matriz (sitio  $Q_i$  o  $Q_N$ ). También es el sitio inhibición de dos fármacos, la antimicina A y el mixotiazol, que bloquean el flujo de electrones en el sitio  $Q_i$  y  $Q_0$ , respectivamente. El citocromo  $c$ , el aceptor móvil de electrones del complejo, se une a la porción del complejo que está orientada hacia el lado externo de la membrana (Horton, 2008; Lehninger et al., 2006; Xia et al., 1997).

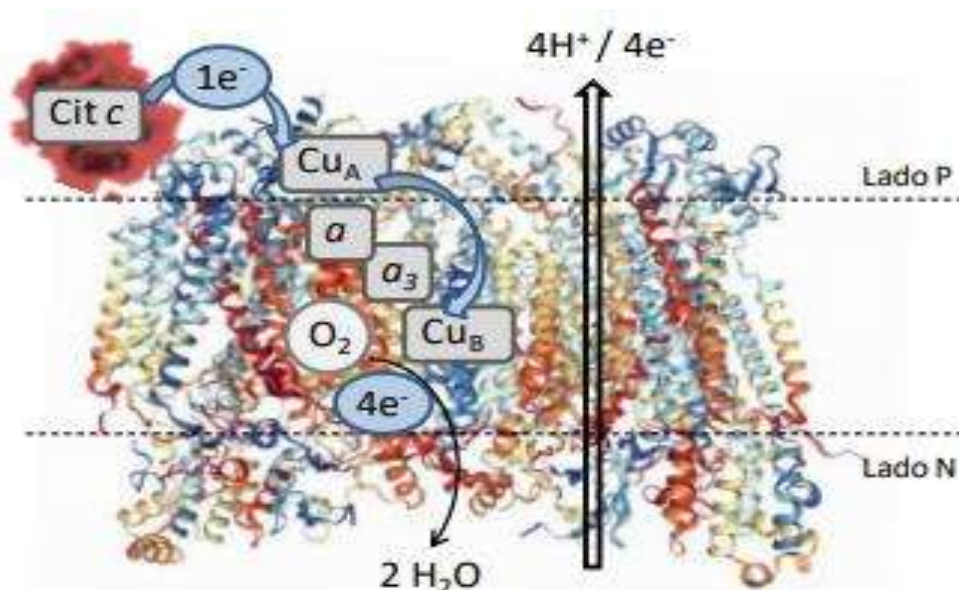


**Figura 6.** Estructura molecular del complejo III de la CTE. Tomado de (Iglesias, 2018).

El mecanismo que acopla la transferencia de electrones desde la Q hacia el citocromo *c* con la traslocación de protones a través de la membrana se denomina ciclo Q. Dos moléculas de QH<sub>2</sub> se unen de forma consecutiva al complejo y se oxidan por la subunidad de Rieske, donde cada una cede dos electrones y dos H<sup>+</sup>. Estos protones se liberan en el espacio intermembrana. Los dos electrones se transfieren de forma bifurcada, uno hacia el citocromo *c*<sub>1</sub>, el cual a su vez lo transfiere a una molécula de citocromo *c* oxidado convirtiéndolo en su forma reducida, y que se oxida en el complejo IV. El segundo electrón reduce al citocromo *b*, el cual reduce en el sitio Q<sub>i</sub> a una molécula de Q a radical Q<sup>•</sup>. Tras otra vuelta del ciclo Q se oxida otra molécula de QH<sub>2</sub>, se reduce otra molécula de citocromo *c*<sub>1</sub>, y se reduce el radical Q<sup>•</sup> a QH<sub>2</sub>, con la incorporación de dos protones del lado de la matriz. La captura de estos dos protones de la matriz contribuye a la formación del gradiente de protones. En resumen, cuatro protones se liberan en el lado citoplasmático, y dos protones se capturan de la matriz mitocondrial (Berg et al., 2011).

### 1.3.4 Complejo IV (citocromo c oxidasa).

El complejo IV es una enzima dimérica muy grande, donde cada monómero tiene 13 subunidades. Las bacterias contienen una forma mucho más sencilla con solo 3 o 4 subunidades por monómero. La comparación de los complejos mitocondrial y bacteriano sugiere que 3 subunidades se han conservado durante la evolución; en organismos multicelulares, las otras 10 subunidades pueden contribuir a la formación o estabilidad del complejo. La subunidad I contiene dos grupos hemo, designados  $a$  y  $a_3$  y un ion cobre  $Cu_B$ . El hemo  $a_3$  y el  $Cu_B$  forman un segundo centro binuclear ( $a_3 - Cu_B$ ), lugar donde se efectúa la reducción del oxígeno molecular. La subunidad II que sobresale desde el lado electropositivo (P) de la membrana interna contiene un centro redox de cobre  $Cu_A$  formado por dos átomos de cobre, enlazados a dos grupos tioles de dos cisteínas (que semejan un centro Fe-S): Esto forma el sitio de unión al citocromo  $c$  (Nelson et al., 2019). En la subunidad III no hay centros redox, y puede removerse artificialmente sin que la enzima pierda actividad catalítica. Su papel *in vivo* es estabilizar las subunidades I y II, y proteger a los centros de redox contra reacciones de óxido-reducción colaterales al ciclo catalítico de la enzima (Horton, 2006).



**Figura 7.** Estructura molecular del complejo IV de la CTE. Tomado de (Iglesias, 2018).

Los electrones se transfieren uno tras otro del sitio  $Cu_A$  al grupo hemo  $a$  en la subunidad I. De allí se transfieren al centro binuclear hemo  $a_3 - Cu_B$ . Los electrones se pueden acumular en el centro binuclear cuando el hierro del hemo alterna entre los estados  $Fe^{+4}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Fe^{+2}$ , y el átomo de cobre pasa de  $Cu^{+2}$  a  $Cu^{+}$ .

El mecanismo de la reducción de oxígeno molecular en el centro binuclear consiste en la descomposición rápida del oxígeno molecular. Un átomo de oxígeno se une al átomo de hierro del hemo  $a_3$  y el otro se une al átomo de cobre. La protonación que sigue, y la transferencia del electrón, da como resultado la liberación de una molécula de agua del sitio del cobre, seguida por la liberación de una segunda molécula de agua del ligando de hierro. La reacción total requiere la toma de cuatro protones de la superficie interna de la membrana (Horton, 2006).



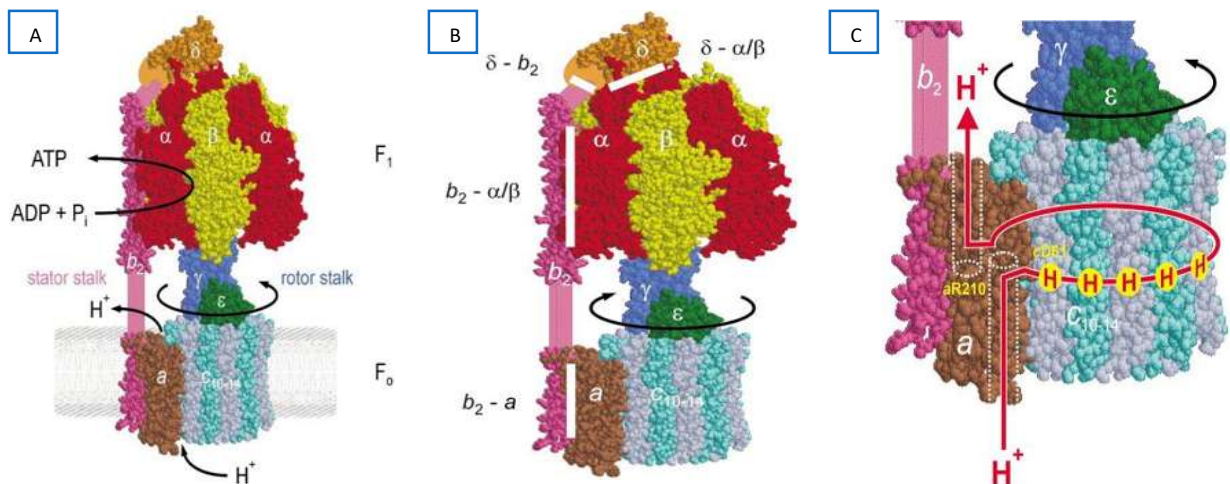
De este modo, por cada par de electrones que pasa por la cadena desde el NADH o el  $FADH_2$ , el complejo IV bombea  $2H^+$  a través de la membrana. El  $O_2$  permanece estrechamente unido al complejo IV hasta que se reduce por completo, y esto minimiza la liberación de intermediarios en potencia perjudiciales, como el anión superóxido, o el peróxido de hidrógeno, que se forman cuando el  $O_2$  acepta uno o dos electrones, respectivamente (Harper et al., 2013).

### 1.3.5 Fosforilación oxidativa

Las mitocondrias acumulan la energía en forma de ATP por el proceso de fosforilación oxidativa. Las proteínas involucradas están ubicadas dentro de la membrana interna mitocondrial e incluyen la CTE, la  $F_1F_0$  - ATP sintasa y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT). Los electrones se transportan a través de la CTE, y la energía liberada por la transferencia de electrones se utiliza para bombear protones a través de la membrana interna mitocondrial para crear un gradiente electroquímico que es positivo y ácido en el espacio intermembrana y negativo y alcalino dentro de la matriz mitocondrial (Wallace, 1999). Por cada par de electrones transferidos al oxígeno molecular, cuatro protones son bombeados por el complejo I, cuatro por el complejo III y dos por el complejo IV, desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana (Lehninger et al., 2006). Esto crea un circuito de protones que puede ser despolarizado con el retorno de los protones a la matriz a través de un canal en la subunidad  $F_0$  de la ATP sintasa. El flujo de protones impulsa la condensación del difosfato de adenosina (ADP) y el fosfato inorgánico (Pi) para producir ATP, que luego se exporta al citosol por el ANT en intercambio con una molécula de ADP. De esta forma, el consumo de oxígeno por la CTE se acopla a la fosforilación de ADP por la ATP sintasa a través del gradiente electroquímico (Wallace, 1999). La teoría quimiosmótica explica fácilmente la dependencia de la transferencia electrónica de la síntesis de ATP en la mitocondria (Nelson et al., 2019).

El dominio  $F_1$  de la  $F_1F_0$  - ATP sintasa está compuesto por subunidades solubles y es el dominio catalítico de la enzima, mientras que  $F_0$  es el dominio membranal. Ambos dominios están unidos por un tallo central y por un tallo periférico (Weber & Senior, 2003). El dominio  $F_1$  consta de cinco proteínas denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , con tres subunidades  $\alpha$  y tres subunidades  $\beta$  que interactúan alternadamente entre sí formando un hetero hexámero. El complejo  $F_0$ , contiene al menos tres subunidades proteicas a, b, y c con una estequiometría  $ab_2c_{12}$ . Las subunidades  $b_2$  hacen de puente entre  $F_0$  y  $F_1$  (Mathews et al., 2002).

El motor  $F_0$  usa la potencia del gradiente de protones para forzar al motor  $F_1$  a generar ATP. La fracción  $F_1$  también hidroliza el ATP haciendo girar el eje en la dirección opuesta. Los protones atraviesan la membrana por un conducto formado en el dominio  $F_0$  (entre las subunidades  $a$  y  $c$ ) y provocan el giro de un anillo de proteolípidos formado por la subunidad  $c$ . Esta rotación hace girar al tallo central (subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$ ) en movimientos de  $120^\circ$ , provocando cambios conformacionales consecutivos en las subunidades catalíticas (subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ ) e induciendo la unión de sustratos ( $\text{ADP} + \text{P}_i$ ), la síntesis de ATP y su liberación (Itoh et al., 2004; Weber & Senior, 2003).



**Figura 8.** Estructura molecular de la  $F_1F_0$  ATP sintasa. Obtenido y modificado de (Weber & Senior, 2003).

#### 1.4 La CTE en la virulencia de los hongos patógenos.

Las mitocondrias representan un blanco atractivo para el desarrollo de nuevas estrategias antifúngicas. Dado el papel central de este orgánulo en los procesos esenciales para el crecimiento, el mantenimiento y la adaptabilidad, unido a la presencia de características específicas de los hongos, puede ser posible desarrollar terapias basadas en la inhibición mitocondrial (Duvenage et al., 2019). Los microorganismos experimentan el estrés oxidativo en muchos entornos, incluyendo el organismo hospedador en el proceso de infección. La tolerancia al estrés oxidativo es un aspecto importante en la patogénesis ya que el sistema inmunológico humano somete a este tipo de estrés a los microorganismos durante la fagocitosis. Las enzimas de defensa antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa, peroxidasas y reductasas dependientes de tiorredoxina y glutatión protegen contra el estrés oxidativo y, por lo tanto, se consideran factores de virulencia (Gessler et al., 2007; Roetzer et al., 2010). Las ERO pueden alterar la estructura, la función de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos e iniciar las reacciones de peroxidación. *S. cerevisiae* posee diferentes enzimas detoxificantes como son las catalasas (Ctt1 y Cta1), las superóxido dismutasas (Sod1 y Sod2) y las peroxidasas (Gpx1, Gpx2, Gpx3, Tsa1, Tsa2, Ahp1, Prx1 y Dot5) que mantienen las ERO en niveles no tóxicos (Folch-Mallol et al., 2004; Iraqui et al., 2009). En cambio, *C. albicans* parece haber evolucionado hacia la expansión del número de enzimas antioxidantes de la familia de las superóxido dismutasas (SOD). Los tres sistemas principales de detoxificación que contiene son: la catalasa (Cat1), el sistema antioxidante glutatión y el sistema tiorredoxina. *C. albicans* induce catalasa cuando está envuelto en neutrófilos o macrófagos (Lorenz et al., 2004; Roetzer et al., 2010; Rubin-Bejerano et al., 2003). Además, el peróxido de hidrógeno promueve la transición morfológica de células de *C. albicans* al inducir el crecimiento de hifas, una forma que invade el tejido del huésped. Mientras que *C. albicans* desprovisto de catalasa se elimina de manera más eficiente en un modelo de infección de ratón (Nakagawa et al., 2003; Nasution et al., 2008). En *C. albicans*, el factor de transcripción Cap1 es el mayor regulador de respuesta transcripcional y de proteínas producida tras un estrés oxidativo (Kusch et al., 2007; Wang et al., 2006). La proteína Cap1 al igual que ocurre con su homóloga Yap1 en *S. cerevisiae*, se

acumula en el núcleo tras la oxidación producida por peróxido de hidrógeno, donde se fosforila provocando la inducción de genes antioxidantes (da Silva Dantas et al., 2010; Dantas et al., 2015; Zhang et al., 2002). Es interesante destacar que *C. albicans* es considerablemente más resistente al estrés de tipo oxidativo que el modelo de levadura *S. cerevisiae* (Jamieson et al., 1996).

La capacidad de fermentar azúcares en etanol, incluso en presencia de oxígeno es un rasgo metabólico clave de las levaduras. Este fenómeno se conoce como “efecto Crabtree” y consiste en la represión de una fuente de energía (respiración) por otra fuente de energía (fermentación), cuando la concentración de glucosa sobrepasa cierto umbral, como es el caso de *S. cerevisiae*. Mientras que *C. albicans* es una levadura con efecto Crabtree negativo y se basa principalmente en la fosforilación oxidativa para la producción de ATP durante el crecimiento y la morfogénesis. Posee una CTE clásica que consta de los complejos I a IV, así como una oxidasa alterna insensible al cianuro, que permite la respiración cuando se inhibe el complejo IV. Se ha demostrado que un sistema de transporte de electrones funcional es importante para los aspectos de la biología de *C. albicans* que están relacionados con la virulencia. Por ejemplo, la inhibición de la respiración en *C. albicans* y otros hongos patógenos conduce a una disminución de la tasa de crecimiento. La pared celular es fundamental para la viabilidad de los patógenos fúngicos y es un determinante importante de la virulencia. Varios estudios han sugerido que la función mitocondrial puede estar relacionada con el mantenimiento de la pared celular de *C. albicans* (De Deken, 1966; Diezmann et al., 2004; Duvenage et al., 2019; Herrero et al., 2008).

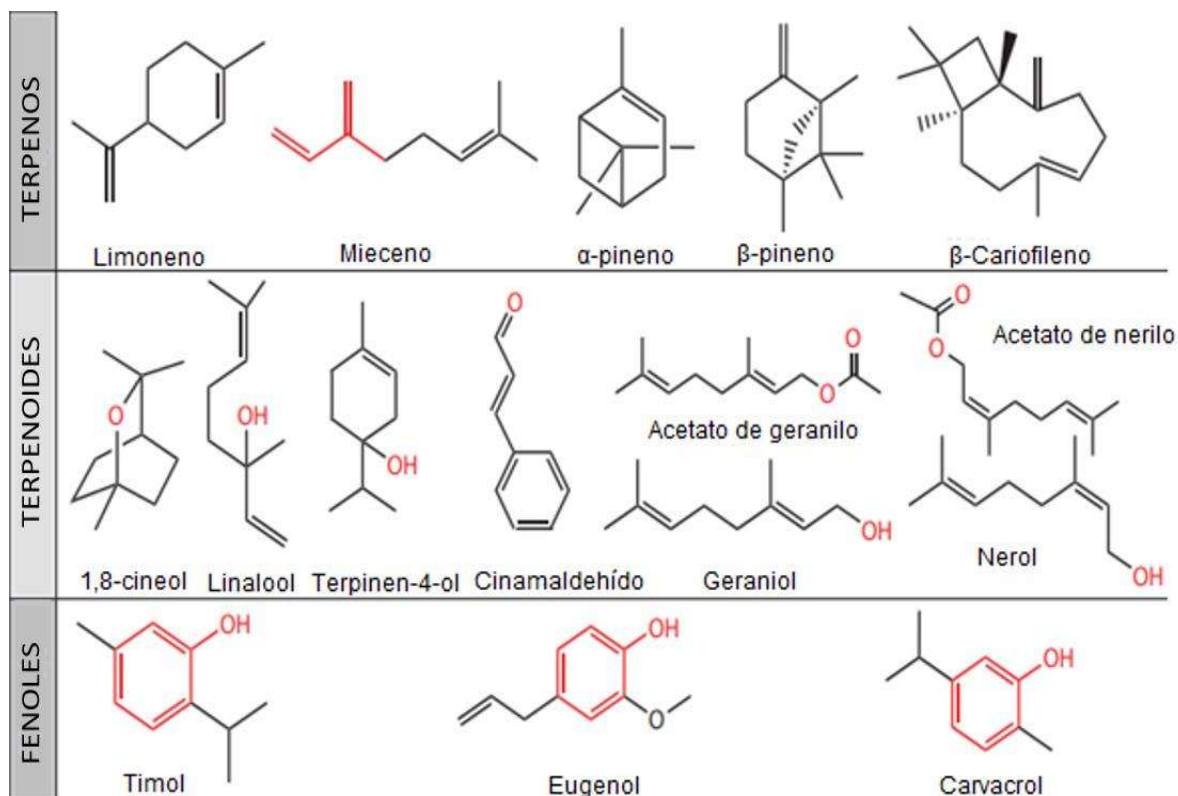


## 1.5 Aceites esenciales de origen vegetal en el tratamiento de infecciones fúngicas

Los aceites esenciales (AE) son compuestos naturales complejos, volátiles, sintetizados por las plantas aromáticas. Estos líquidos aromáticos se obtienen de diferentes órganos de la planta: flores, raíces, hojas, tallos, frutos, semillas, etc. Pueden ser obtenidos por presión, fermentación, o extracción, pero el método más común para la producción comercial es el de destilación por vapor. Se conocen alrededor de unos 3000 aceites esenciales, de los cuales unos 300 son los más importantes comercialmente, destinados para el mercado de condimentos y fragancias (Burt, 2004).

Se caracterizan por un olor fuerte y son sintetizados por las plantas aromáticas como metabolitos secundarios. Contienen propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, insecticidas y antioxidantes. Son muy utilizados en medicina y en la industria alimentaria para estos fines. En la naturaleza juegan un papel importante en la protección de las plantas (Bakkali et al., 2008; Bassolé & Juliani, 2012).

Los aceites esenciales son mezclas naturales muy complejas que puede contener alrededor de 20 a 60 componentes en concentraciones bastante diferentes. Se caracterizan por dos o tres componentes principales en concentraciones bastantes altas (20-70%) en comparación con otros componentes presentes en cantidades traza. Generalmente, estos componentes principales determinan las propiedades biológicas de los aceites. El grupo principal está compuesto de terpenos y terpenoides y el otro grupo de compuestos aromáticos y constituyentes alifáticos, todos caracterizados por bajo peso molecular (Bakkali et al., 2008).



**Figura 9.** Estructura química de los principales componentes antimicrobianos (terpenos, terpenoides y fenoles) en los aceites esenciales. Tomado y modificado de (Rao et al., 2019).

Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se han informado en varios estudios. En muchos casos, la actividad resulta de la interacción compleja entre las diferentes clases de compuestos como fenoles, aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, éteres o hidrocarburos que se encuentran en los AE. Una serie de estudios han indicado que la actividad antimicrobiana de un aceite esencial está estrechamente relacionada con sus principales constituyentes, así como sus interacciones con algunos de los constituyentes menores. Diversos estudios han encontrado que varios de sus compuestos exhiben propiedades antimicrobianas significativas cuando se prueban por separado. Esto sugiere que los componentes menores en aceites esenciales pueden ser críticos para la actividad antimicrobiana debido a un efecto sinérgico (Bassolé & Juliani, 2012).

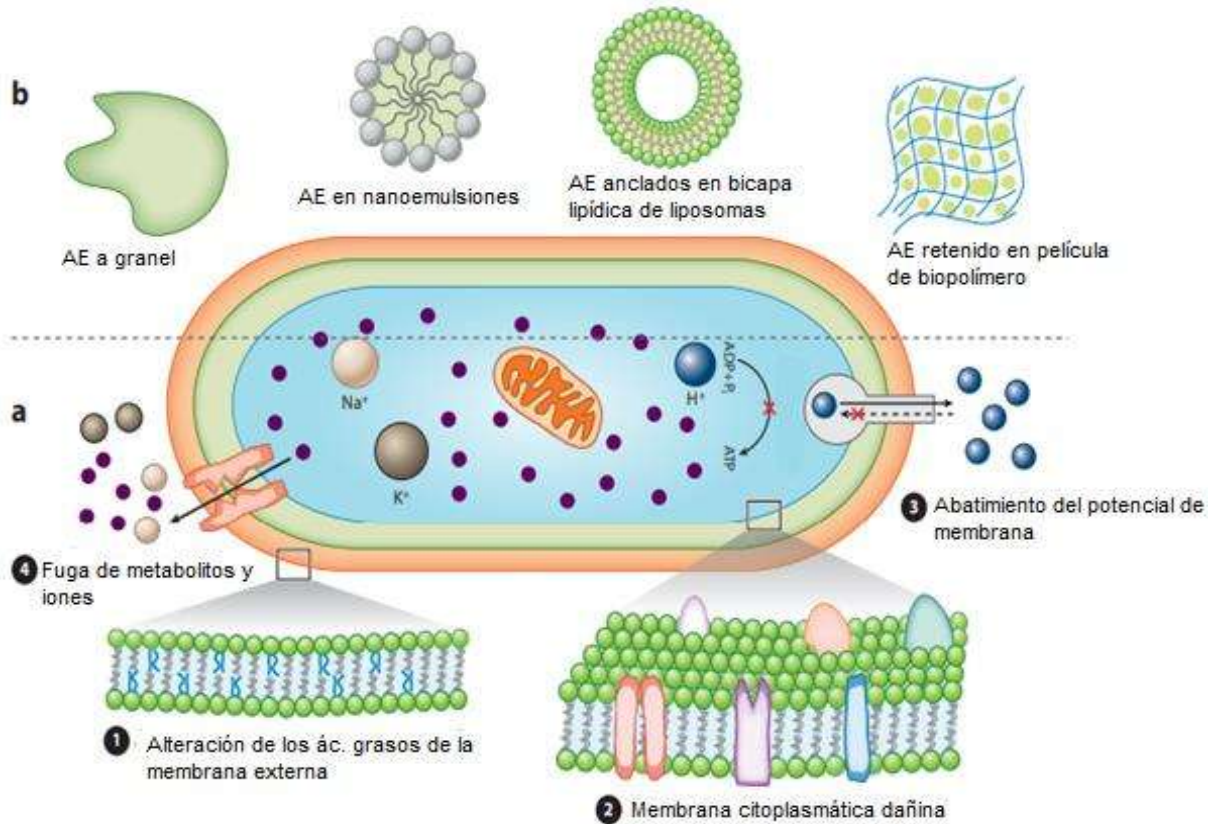
En general, se ha demostrado que los aceites esenciales y sus componentes químicos tienen actividades antimicrobianas de amplio espectro contra muchos patógenos transmitidos por los alimentos, incluidos microorganismos gram positivo y gram negativo. El uso de combinaciones de diferentes aceites esenciales o componentes químicos fraccionados de aceites esenciales pueden producir efectos antimicrobianos sinérgicos o antagónicos. La presencia de estos efectos depende del tipo de aceite esencial y las cepas microbianas probadas. En un estudio donde se combinaron aceites de canela y clavo se observó un efecto antagónico en el crecimiento de *E. coli*, y un efecto sinérgico en la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *Y. enterocolitica*. Actualmente, es muy difícil predecir la eficacia antimicrobiana de las mezclas de aceites esenciales.

Los diferentes constituyentes de los aceites esenciales pueden operar por diferentes mecanismos y pueden atacar diferentes tipos de microbios, tales como bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, levaduras o mohos, porque difieren en estructura y composición. La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales podría estar regulada por más de un mecanismo de acción porque los diferentes constituyentes de los aceites esenciales pueden tener diferentes blancos celulares (Rao et al., 2019).

Muchas investigaciones han atribuido su poder microbicida de los aceites esenciales a su capacidad para penetrar a través de la pared celular de las células bacterianas y de las membranas citoplásmicas hacia el interior de la célula, por lo que tienen la capacidad de desintegrar las estructuras celulares, lo que las hace más permeables a los aceites esenciales circundantes. Además, ciertos constituyentes químicos de los aceites esenciales, especialmente los fenoles, pueden tener mecanismos de acción únicos al actuar como acarreadores de protones, es decir, la molécula de fenol se difunde a través de la membrana citoplasmática y se disocia liberando un protón en el citoplasma, por lo que disminuye el gradiente de pH a través de la membrana citoplásmica, especialmente cuando se promueve su penetración por otros constituyentes. El colapso resultante del potencial de membrana y el agotamiento del ATP eventualmente conduce a la muerte celular. En consecuencia, se observa liberación de hierro y pérdida de

constituyentes intracelulares. Los mecanismos de acción antimicrobianos de aceites esenciales pueden involucrar diferentes eventos en la membrana externa celular y dentro del citoplasma cuando las bacterias están expuestas a diferentes aceites esenciales. Las células microbianas pueden sobrevivir cuando están expuestas a concentraciones bajas o subletales de aceites esenciales. En tales condiciones, la membrana celular aún puede mantener su fluidez a través de sistemas de defensa que implican alterar el grado de saturación de los ácidos grasos, la longitud de las cadenas hidrocarbonadas, la posición de ramificación, la isomerización *cis-trans* y la conversión de ácidos grasos insaturados en ciclopropanos en las membranas celulares. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas fluorescens* y *Brochothrix thermosphacta* pueden sobrevivir al tratamiento con 0.2 M de timol, carvacrol, limoneno, eugenol o cinnamaldehído, lo cual fue atribuido parcialmente a un cambio en el perfil de ácidos grasos de las membranas celulares. Algunas investigaciones han examinado el impacto de la estructura molecular de los constituyentes de los aceites esenciales en sus mecanismos de acción. El mecanismo de acción de los terpenos ocurre a nivel de la membrana celular, donde su actividad antimicrobiana se ha atribuido a su capacidad para inhibir la respiración y otros procesos dependientes de energía (Rao et al., 2019; Ultee et al., 2002).

Los aceites esenciales contienen de forma natural antioxidantes los cuales pueden donar átomos de hidrógeno a radicales libres y convertirlos en productos no radicales más estables. Los principales antioxidantes donantes de hidrógeno son compuestos fenólicos (Choe & Min, 2006). Ahora bien, varios resultados también demuestran que la actividad antimicrobiana del fenol está asociada con su grupo hidroxilo, que se ve reforzado por la presencia del anillo de benceno (Rao et al., 2019)



**Figura 10.** (a) Mecanismos de acción comunes propuestos y sitios objetivo de los aceites esenciales (AE) o sistemas de administración de AE en células bacterianas: (1) alteración de los ácidos grasos de la membrana externa; (2) membrana citoplasmática dañina; (3) abatimiento del potencial de membrana; y (4) fuga de metabolitos y iones. (b) Diferentes tipos de sistemas de suministro de AE, incluidos nanoemulsión, liposomas, y películas de biopolímero. Obtenido y modificado de (Roa et al., 2019).

### 1.5.1 Aceite esencial de menta

La *Mentha piperita* pertenece a la familia *Lamiaceae*, es un híbrido de menta acuática (*Mentha aquatica*) y hierbabuena (*Mentha spicata*). Nativa de Europa y naturalizada en el norte de Estados Unidos y Canadá que se cultiva en muchas partes del mundo. La lista de supuestos beneficios y usos de la menta como remedio popular incluye: Trastornos biliares, dispepsia, enteritis, flatulencia, gastritis, cólicos intestinales y espasmos del conducto biliar, vesícula biliar y tracto gastrointestinal. In vitro, la menta tiene importantes actividades antimicrobianas y antivirales, fuertes acciones antioxidantes y antitumorales y cierto potencial antialérgico. Los principales componentes volátiles del aceite esencial son el mentol y la mentona (de Sousa Barros et al., 2015; McKay & Blumberg, 2006).

Se puede usar en numerosas formas que van desde su aceite, las hojas, su extracto de hojas y agua de hojas. Por sus propiedades aromatizantes se utiliza en productos de higiene personal, alimentos y productos farmacéuticos (Herro & Jacob, 2010).

Compuesto	(%)
$\alpha$ -Pino	1.8
$\beta$ -Pino	0.14
Sabino	0.25
Mirceno	1.3
Limoneno	8
1,8-cineol	2.8
3-octanona	0.45
3-octanol	0.53
Oxido de limoneno	0.59
$\alpha$ -Terpineol	0.37
Linalool	2.64
Iso-mentona	33.0
Acetato de metilo	0.68
Iso-pulegol	2.4
Isomentol	0.28
Neo-iso-mentol	0.45
Mentol	33.59
Pulegona	1.6
Acetato de nerilo	0.8
Piperitona	3.2
Mirtenol	0.55
Carveol	0.31
Cariofileno	1.95
Óxido de cariofileno	0.11
Germacreno D	0.11
$\Delta$ -Cadineno	0.11
<b>Hidrocarburos monoterpenos (%)</b>	<b>16.23</b>
<b>Monoterpenos oxigenados (%)</b>	<b>79.5</b>
<b>Hidrocarburos sesquiterpenos (%)</b>	<b>2.44</b>
<b>Total (%)</b>	<b>98.17</b>

**Tabla 1.** Composición química (%) del aceite esencial de hojas de *Mentha piperita* según lo identificado por análisis GC / MS. Obtenido y modificado de (Hsouna et al., 2019).

### 1.5.2 Aceite esencial de clavo

*Eugenia caryophyllata*, pertenece a la familia *Myrtaceae*, comúnmente conocida como clavo, es un árbol aromático, originario de Indonesia, utilizado como especia en la cocina de muchas partes del mundo. Los principales constituyentes del aceite esencial son fenilpropanoides como carvacrol, timol, eugenol y cinamaldehído, donde el eugenol es el componente principal, responsable en mayor medida de sus propiedades medicinales. El clavo se ha utilizado tradicionalmente desde la antigüedad en el tratamiento de lombrices intestinales y tenias, asma, dolor de muelas, dolor de garganta, dispepsia, gastritis y diarrea. Posee variados efectos dentro de las que destacan el antiséptico, analgésico, antibacteriano, antifúngico, anestésico y antimutagénico, además de contener propiedades antioxidantes (Chaieb et al., 2007; J. Singh et al., 2012). El eugenol tienen una actividad antifúngica considerable contra hongos clínicamente relevantes, incluidas las cepas resistentes al fluconazol (Pinto et al., 2009).



Compuesto <sup>ab</sup>	Índice de Kovats <sup>c</sup> (HP-20M)	(%)
2-Heptanona	1172	0.93232
Hexanoato de etilo	1232	0.66098
2-Heptanol	1304	Tr
Octanoato de mentilo	1384	Tr
2-Nonanona	1392	Tr
Octanoato de etilo	1429	Tr
$\alpha$ -Cubebene	1459	Tr
Copaeno	1491	Tr
2-Nonanol	1499	Tr
Linalool	1548	Tr
2-Undecanona	1588	Tr
$\beta$ -Cariofileno	1595	1.3883
Benzoato de mentilo	1619	Tr
Benzoato de etilo	1647	Tr
$\alpha$ -Humulene	1668	0.19985
Mentil chavicol	1669	Tr
$\alpha$ -Amorfeno	1675	Tr
Acetato de $\alpha$ -Terpinilo	1695	Tr
$\alpha$ -Muuroleno	1711	Tr
Acetato de bencilo	1714	Tr
Carvona	1731	Tr
$\gamma$ -Cadineno	1756	Tr
2-Acetato de feniletilo	1826	Tr
(E)-Anetol	1827	Tr
Calamenene	1828	0.10538
Alcohol de benzilo	1861	Tr
Calacorene	1918	0.11437
Óxido de cariofileno	1976	Tr
Mentil eugenol	1985	Tr
Óxido de humuleno	1986	Tr
Cinamaldehído	2018	Tr
Cinamato de etilo	2072	Tr
Tiglato de bencilo	2103	Tr
Eugenol	2151	88.58535
Acetato de eugenilo	2263	5.62086
Humulenol	2265	0.27527
<b>Total</b>	<b>98.2769</b>	<b>98.2769</b>

**Tabla 2.** Composición y porcentaje de aceite esencial de clavo (*Eugenia caryophyllata*) obtenido con análisis GS-MS. <sup>a</sup> Orden de elución en capilar HP-20M; <sup>b</sup> Identificado mediante la comparación de los datos del índice de Kovats y del espectro de masas; <sup>c</sup> Índices de Kovats en la columna HP-20M, tr: traza (<0,1%). Obtenido y modificado de (Chaieb et al., 2007).

### 1.5.3. Aceite esencial de canela

El *Cinnamomum zeylanicum*, a veces conocido como *C. verum*, pertenece a la familia *Lauraceae*, es originaria de Sri Lanka. Deriva de un árbol perenne tropical que alcanza una altura de 10 a 15 m de largo, que tiene una corteza, hojas y flores muy aromáticas. Los principales compuestos volátiles presentes en la corteza son el cinamaldehído y el eugenol. Se utiliza para tratar el asma, la bronquitis, la diarrea, el dolor de cabeza, la inflamación y los trastornos cardíacos (Singh et al., 2021). La canela es un componente natural que presenta una amplia gama de funciones farmacológicas, incluidas las actividades antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas (Sadeghi et al., 2019). Se ha investigado la actividad antimicrobiana del aceite esencial de canela para evaluar su eficacia contra 21 bacterias y 4 especies de *Candida spp.*, utilizando métodos de difusión por disco y concentración mínima inhibitoria, donde el aceite esencial mostró una fuerte actividad antimicrobiana contra todos los microorganismos probados (Unlu et al., 2010). El mecanismo de los antimicrobianos se ha revelado parcialmente en un estudio sobre células de *Saccharomyces cerevisiae* donde el efecto inhibitor del trans-cinamaldehído se debió a su capacidad para inhibir a las enzimas sintetizadoras de la pared celular, la  $\beta$ - (1,3) -glucano sintasa y la quitina sintasa (Bang et al., 2000).

Compuesto	Concentración (%) en aceite de hoja de canela	Concentración (%) en aceite de corteza de canela
Óxido de cariofileno	0,5	0,35
1,8-cineol	0,6	1.02
Benzoato de bencilo	3,0	0.01–0.37
Alcohol de bencilo	0,2	0,14
Eugenol	74,9	0,39–2,37
Benzaldehído	0,1	0,23–0,31
Canfeno	0,3	0,08-0,12
Cinamaldehído	1.1	62.09–89.31
Acetato de cinamilo	1.8	1,48-2,44
Linalol	2.5	1.6–4.08
$\alpha$ -Pino	1.2	0,37-0,50
$\beta$ -felandreno	0,2	0,23-0,25
$\alpha$ -cubebene	0,9	0,12-0,21
$\alpha$ -Humuleno	0,6	0.01-0.28
Mirceno	0,1	0.05-0.40
Limoneno	0,5	0,19-0,33
Cymene	0,8	0.02–1.31
$\beta$ -pino	0,3	0,07-0,15
Delta-3-Carene	0,6	0,37
$\beta$ -cariofileno	4.1	0,89–2,05
Alcohol feniletílico	0,1	0,15
$\alpha$ -terpino	0,1	0,03
$\alpha$ -felandreno	0,9	0,01
$\alpha$ -terpineol	0,3	0,01
$\alpha$ -Thujene	0,2	-
Safrole	1.3	-
Estireno	0,1	-
Elemene	-	0.08–0.33
Borneol	-	0,01-0,12
Cumarina	-	0,41-0,47
Bencenopropanal	-	0,41
Hinesol	-	0,36
T-cadinol	-	2,47
$\alpha$ -muurolo	-	4.32
$\alpha$ -amorfo	-	1,98

**Tabla 3.** La concentración de algunos de los componentes identificados en el aceite de canela (hojas y corteza). Recuperado y modificado de (Abd El-Hack et al., 2020).

## 1.6 *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio de la fisiología de hongos patógenos

En 1996, el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* fue secuenciado completamente (Goffeau et al., 1996). Esta levadura se convirtió en una referencia útil contra la cual secuencias génicas de humanos, plantas o animales y una inmensa variedad de organismos unicelulares, podían ser comparadas (Karathia et al., 2011). El estrecho parentesco de *S. cerevisiae* con *C. albicans* (Diezmann et al., 2004) y sus ventajas como sistema de modelo genético hacen de esta levadura la mejor opción para estudiar la respuesta al estrés oxidativo en patógenos fúngicos (McCusker, 2006).

*S. cerevisiae* ha permitido identificar biomarcadores moleculares, mecanismos desconocidos de acción y nuevos blancos terapéuticos potenciales. Entre sus ventajas como modelo de estudio biológico, se pueden enumerar las siguientes:

- I. Su falta de patogenicidad y la simplicidad relativa de ser unicelular.
- II. Su facilidad de manipulación genética, acoplada con un crecimiento rápido y casi económico en condiciones de laboratorio bien controladas.
- III. La posibilidad de ser almacenada una vez liofilizada
- IV. Su resistencia a una amplia gama de valores de pH y fuerza iónica, condiciones que se encuentran comúnmente en muestras ambientales.
- V. Información funcional disponible casi para cada gen.
- VI. Un alto grado de conservación funcional con eucariotas más complejos, incluidos los humanos.
- VII. La disponibilidad de una amplia gama de herramientas experimentales dedicadas, protocolos, software y bases de datos.
- viii. La posibilidad de reducir las pruebas en animales, ya que la levadura se ha propuesto como un buen organismo modelo para evaluar la toxicidad de los contaminantes ambientales (Braconi et al., 2016).

## JUSTIFICACIÓN

- Las micosis más frecuentes a nivel mundial son las causadas por *Cándida spp.*
- El funcionamiento de la CTE de *Candida spp.*, es un elemento clave de su virulencia.
- Actualmente existen cepas de interés clínico que presentan mecanismos de resistencia a los antimicóticos de primera elección como el fluconazol.
- *S. cerevisiae* muestra un estrecho parentesco filogenético con *C. albicans*, lo que hace al primero un modelo de estudio de la fisiología de *C. albicans*.
- Los aceites de menta, clavo y canela presentan propiedad antimicrobiana, sin embargo, no se conoce si en el caso de los hongos, la disfunción de la CTE forma parte de su mecanismo de acción.

### 3. HIPÓTESIS

Los aceites esenciales de menta, clavo y canela disminuyen el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* al inhibir el funcionamiento de la CTE y alterar la producción de ERO.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto antifúngico de los aceites esenciales de menta, clavo y canela en *Saccharomyces cerevisiae* y si este efecto está relacionado con una disminución del funcionamiento de la CTE y alteración en la producción de ERO.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto antifúngico de los aceites esenciales de menta, clavo y canela sobre el crecimiento celular de *S. cerevisiae*.
- Evaluar el efecto del aceite de menta, clavo y canela sobre la actividad de los complejos de la CTE de mitocondrias de *S. cerevisiae*.
- Determinar el efecto de los aceites de menta, clavo y canela sobre la formación de ERO en mitocondrias de *S. cerevisiae*.
- Evaluar el efecto sinérgico *in vitro* del fluconazol y los aceites esenciales de menta, clavo y canela en el crecimiento de *S. cerevisiae*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Crecimiento de la levadura

Se utilizó la cepa haploide BY4741 de *S. cerevisiae* (MATa; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*; WT). Las células fueron sembradas en medio YPD líquido (extracto de levadura 1%, peptona de caseína 2%, dextrosa 2%). Se realizaron pre-cultivos de la levadura en 50 mL de YPD durante 24 h con agitación constante a 30°C. Posteriormente, se hicieron cultivos de la levadura partiendo de los pre-cultivos, ajustando a una densidad óptica inicial a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0.03. Los cultivos se dejaron crecer por 24 h con agitación constante de 100 rpm a 30°C.

### 5.2 Diseño experimental

Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de aceites esenciales de menta, clavo o canela a 0.005%, 0.16%, 0.31%, 0.63%, y 1.25% (V/V), durante 24 h. Los aceites se añadieron en el momento de la inoculación de los medios de cultivo con *S. cerevisiae*. Los aceites fueron adquiridos de doTERRA (Pleasant Grove, UT, USA). Para agregar los aceites, se prepararon soluciones stock con aceite esencial, Igepal CA-630 (Sigma – Aldrich, St. Louis MO, USA) y agua desionizada. Las células control fueron crecidas en ausencia de cualquier aceite. El aceite esencial de menta utilizado contiene 10–30% mentona, 20–60% mentol y 1-10% 1,8-cineol (eucaliptol); el aceite de clavo 63–95% eugenol, 0.6–20% betacariofileno; y el aceite de canela 45-80% cinamaldehído, 2-15% acetato de cinamilo y 1-10% eugenol (The doTerra oil chemistry wheel, 3rd edition, 2021).

Las soluciones de stock con aceite esencial se prepararon a partir de un stock de 50% del detergente Igepal CA-630 al 5% (con agua desionizada como solvente). Para agregar los aceites se realizó un cálculo de acuerdo con la concentración y volumen final requeridos.



Para un volumen final de 10 ml:

0.005% - 1  $\mu$ L

0.16% - 32  $\mu$ L

0.31% - 62  $\mu$ L

0.63%-126  $\mu$ L

1.25%-250  $\mu$ L

Para un volumen final de 250 ml:

0.005% - 25  $\mu$ L

0.16% - 800  $\mu$ L

0.31%-1,550  $\mu$ L

0.63%-3,150  $\mu$ L

1.25%-6,250  $\mu$ L

Para analizar si los aceites esenciales pueden sinergizar los efectos del fluconazol, los cultivos se inocularon con combinaciones de 0.005% o 0.16% de aceites esenciales de menta, clavo y canela con 512  $\mu$ g/mL de fluconazol (Diflucan, Pfizer, New York, NY, USA).

### 5.3 Evaluación de la inhibición del crecimiento

Al término del periodo de incubación, las células obtenidas se lavaron tres veces a 5000 rpm a 25°C por 10 min. Las células obtenidas se pesaron en una balanza analítica. La inhibición del crecimiento se expresó como el porcentaje de crecimiento con respecto al crecimiento de los cultivos control.

#### 5.4 Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias de levadura se aislaron mediante centrifugación diferencial. Para obtener las mitocondrias, las levaduras se lavaron tres veces con agua desionizada a 5000 rpm por 5 min a 4°C. Las células obtenidas se pesaron y se les agregó medio de ruptura con 0.6 M de Manitol, 5 mM de MES (pH 6.8 con trietanolamina) a una proporción de 1 mL de medio por cada g de células. Se agregaron perlas de vidrio para romper de manera mecánica la pared celular con agitación vigorosa en un vórtex con ciclos de 1 min de agitación y 1 min de descanso en hielo, hasta alcanzar 10 ciclos de agitación. Se retiraron las perlas de vidrio y se sonicó a 30W por 3 ciclos durante 30 s con 1 min de descanso en hielo entre cada ciclo. Después, se centrifugó dos veces a 3000 rpm a 4°C por 10 min, el sobrenadante de la primera centrifugación se guardó para su posterior uso. La pastilla obtenida y el sobrenadante guardado anteriormente se centrifugaron dos veces a 12000 rpm a 4°C por 20 min. Las mitocondrias se re-suspendieron con medio de ruptura. La concentración de proteína mitocondrial fue determinada mediante el método de Biuret.

#### 5.5 Actividad de los complejos de la CTE

Las actividades de los complejos mitocondriales fueron determinadas en un espectrofotómetro Shimadzu UV-2550 a temperatura ambiente utilizando sustratos e inhibidores específicos para cada complejo.

##### 5.5.1 Determinación de la actividad del complejo II

Se utilizaron 20 mg/mL de mitocondrias en un volumen de 2 mL de buffer 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.6) y se incubaron tres minutos con 1  $\mu\text{g}$  de antimicina A. Al término de la incubación se agregaron 80  $\mu\text{M}$  de 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) y se comenzó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm, transcurrido un minuto se agregó 10mM de succinato y se continuó el trazo durante cuatro minutos más para medir la reducción del DCIP el cual actúa como un aceptor artificial de electrones. La

tasa de reducción de DCIP se calculó a partir de la pendiente del gráfico de absorbancia utilizando el coeficiente de extinción molar de  $21 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  para DCIP (Cortés-Rojo et al., 2009).

#### 5.5.2 Determinación de la actividad del complejo III

Se utilizaron 20 mg/mL de mitocondrias en un volumen de 2 mL de buffer 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.6) y se incubaron durante 5 minutos con 1 mM de KCN. Al término de la incubación, se agregaron 1.5 mg de citocromo *c* oxidado y se comenzó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm, transcurrido un minuto se agregó 10mM de succinato y se continuó el trazo durante dos minutos más, durante los cuales se midió la reducción del citocromo *c*. La reacción se detuvo al agregar 1  $\mu\text{g}$  de antimicina A el cual es un inhibidor del complejo III. La tasa de reducción de citocromo *c* se calculó a partir de las pendientes de los gráficos de absorbancia utilizando un coeficiente de extinción molar de  $19.1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  para el citocromo *c*. La reducción inespecífica del citocromo *c* se eliminó restando la actividad enzimática en presencia de antimicina A y succinato a la actividad estimulada solo con succinato (Cortés-Rojo et al., 2009).

#### 5.5.3 Determinación de la actividad del complejo IV

Se utilizaron 20 mg/mL de mitocondrias en un volumen de 2 mL de buffer 50 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.6) y se incubaron tres minutos con 1  $\mu\text{g}$  de antimicina A. Al término de la incubación se agregó 1.5 mg de citocromo *c* reducido con unos granos de ditionita de sodio, y se midió su oxidación en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550 nm durante 20 s. La reacción se detuvo al agregar 1mM de KCN el cual es un inhibidor del complejo IV. La tasa de reducción del citocromo *c* se calculó a partir de las pendientes de las gráficas de absorbancia usando un coeficiente de extinción molar de  $19,1 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  para el citocromo *c*. La oxidación inespecífica del citocromo *c* reducido se calculó restando la actividad enzimática en presencia de cianuro y citocromo *c* a la actividad estimulada solo con citocromo *c* (Cortés-Rojo et al., 2009).

## 5.6 Determinación de ERO

Esta determinación se realizó evaluando la oxidación por las ERO de la sonda fluorescente 2´7´-diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCDHF-DA), a una  $\lambda$  de excitación de 491 nm y una  $\lambda$  de emisión de 518 nm, en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301. Se utilizó 20 mg/mL de suspensión de mitocondrias aisladas y 5  $\mu$ L de DCDHF-DA (500 mM) para obtener un volumen final de 2 mL, aforando con medio con 10 mM HEPES, 100 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> y 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4). Esta mezcla se agitó durante 20 min en un baño de hielo. Posteriormente, esta mezcla se añadió en una cubeta de cuarzo y se midió la fluorescencia basal por 1 min. Después, se añadió una concentración de 10 mM de succinato como sustrato respiratorio y se midió el incremento en la fluorescencia durante 19 minutos. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF)/min x mg de proteína (Ortiz-Avila et al., 2015).

## 5.7 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos independientes. La significancia estadística de las diferencias entre las medias ( $P < 0.05$ ) se determinó mediante la prueba de ANOVA de una vía, usando el test de Dunnett como prueba post hoc, con el programa estadístico Sigma Plot versión 11.

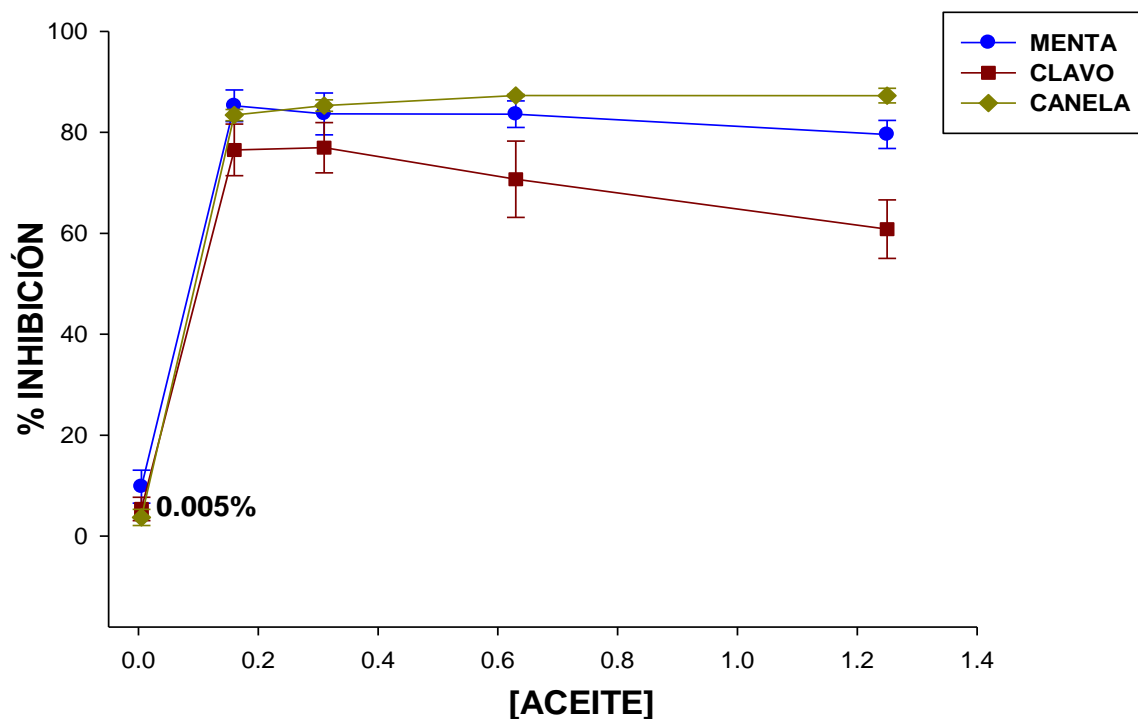
## 6. RESULTADOS

6.1 Efectos de los aceites de menta, clavo y canela sobre la inhibición de crecimiento en *Saccharomyces cerevisiae*.

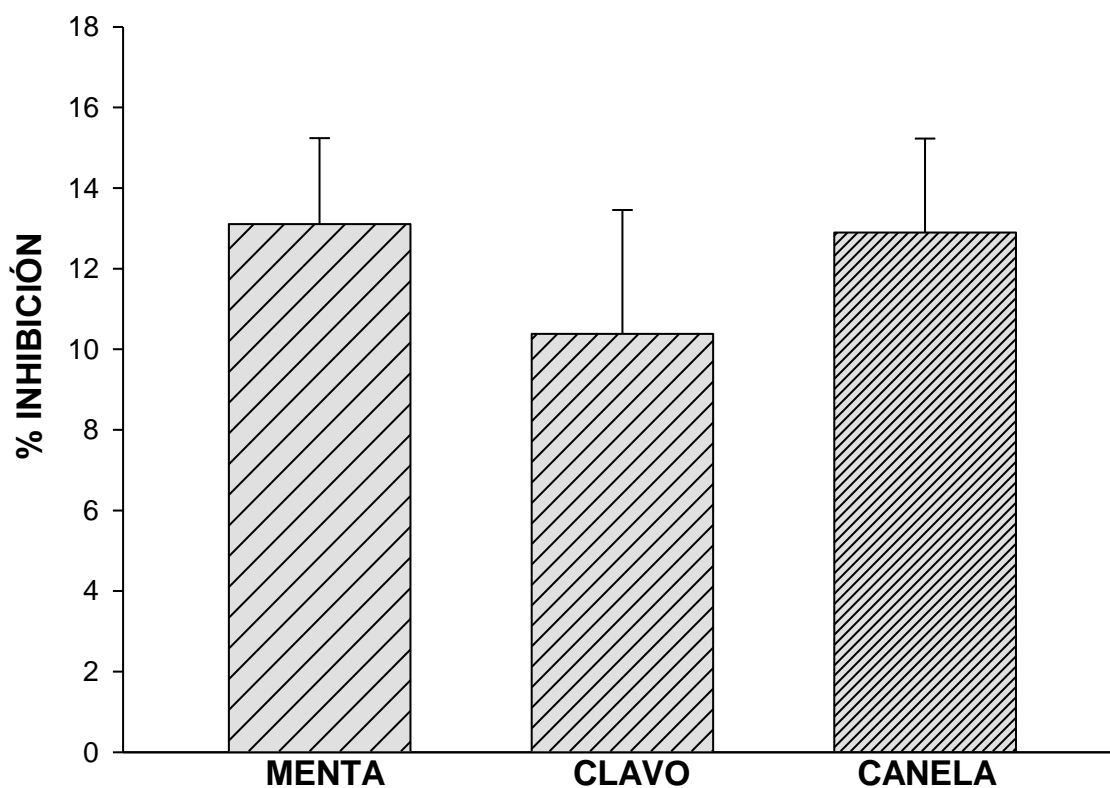
Se midió el porcentaje de inhibición del crecimiento celular inducido por el tratamiento con los aceites esenciales, por comparación del peso de las células obtenido después de su tratamiento con respecto al control.

En la Fig. 11 se observa la inhibición máxima del crecimiento de aprox. 80% con 0.16% de aceite esencial de canela, y no se observó un aumento significativo de este efecto a concentraciones de 0.31%, 0.63%, y 1.25%. En cuanto al aceite esencial de menta, se obtuvo una inhibición similar a la obtenida con el aceite de canela al 0.16% y 0.31%. Sin embargo, hubo una ligera disminución del crecimiento a 0.63% y 1.25%. Respecto al aceite esencial de clavo, el efecto inhibitorio al 0.16% y 0.31%, fue aprox. un 10% menor al observado con las mismas concentraciones de los otros dos aceites. Además, el efecto inhibitorio fue menor conforme aumentó la concentración de aceite, llegando a ser de aprox. un 60% con 1.25% de aceite.

En virtud del fuerte efecto inhibitorio de los aceites, se decidió disminuir la concentración de los aceites para obtener una suficiente cantidad de células para determinar los efectos de los aceites a nivel mitocondrial. Esto se logró disminuyendo hasta dos órdenes de magnitud la concentración de los aceites a un porcentaje de 0.005%, donde se observó alrededor de un 12% de inhibición con cualquier aceite (Fig. 12). Cabe hacerse mención que no se pudo obtener un 50% de inhibición por los aceites, ya que cualquier aumento en la concentración de estos por arriba del 0.005% provocó una inhibición de casi el 80% (dato no mostrado).



**Figura 11.** Inhibición del crecimiento celular de *Saccharomyces cerevisiae* por los aceites esenciales de menta, clavo y canela. Las células se incubaron con los aceites en medio YPD durante 24 h. Los datos se presentan como la media  $\pm$  e.e. de  $n=3$  (ANOVA).

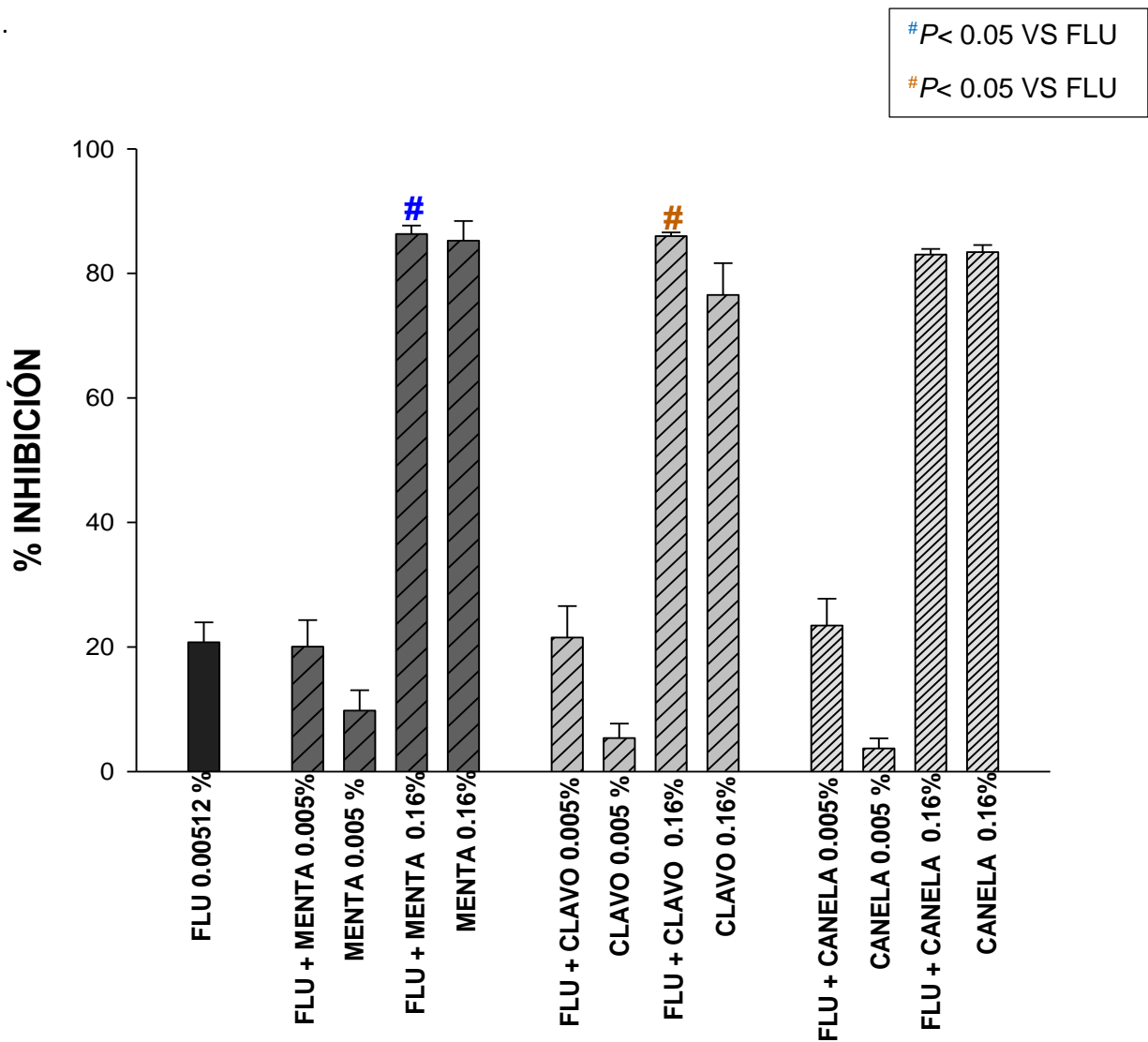


**Figura 12.** Inhibición del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* por el tratamiento con 0.005% (V/V) de aceite esencial de menta, clavo o canela en medio YPD durante 24 h. Los datos se presentan como la media  $\pm$  e.e. de n=3 (ANOVA y test de Dunnett  $P < 0.05$ ).

## 6.2 Efecto del tratamiento simultaneo con fluconazol y aceites esenciales en el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se estudió si la adición de los aceites esenciales de manera individual puede sinergizar los efectos del fluconazol. Se observó que 0.512µg/mL de fluconazol inhibe en 20% el crecimiento de *S. cerevisiae*, lo cual fue mayor al porcentaje de inhibición obtenido individualmente con 0.005% de cada aceite. El efecto antifúngico del fluconazol no fue mejorado por el tratamiento conjunto con ninguno de los aceites al 0.005% (Fig. 13). Por el contrario, la inhibición del crecimiento fue mucho mayor con 0.16% de aceites que con la concentración usada de fluconazol. En este caso, los efectos inhibitorios de los aceites no fueron mayores cuando se combinó 0.16% de cada aceite con 0.512 µg/mL de fluconazol. En conclusión, no se observó sinergia efectos entre ninguno de los aceites y el fluconazol en su efecto antifúngico sobre *S. cerevisiae*.



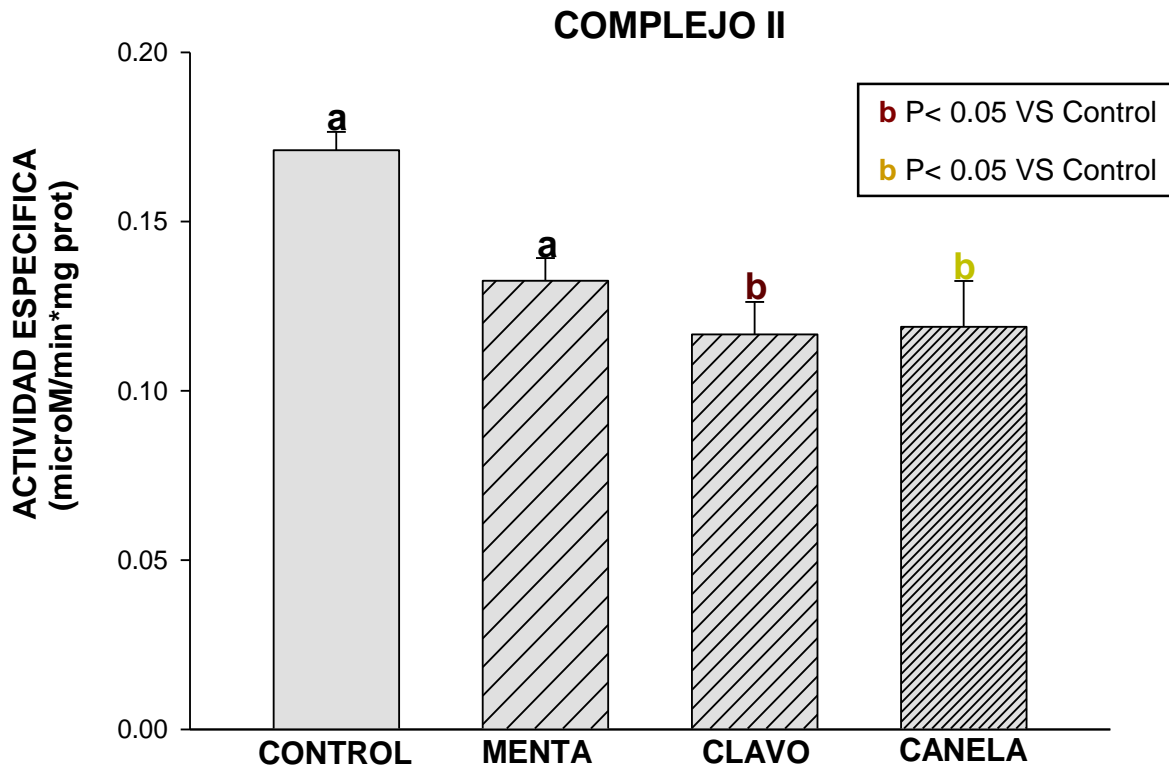


**Figura 13.** Inhibición del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* por la combinación de aceites de menta, clavo o canela y 512  $\mu\text{g/ml}$  de fluconazol en YPD durante 24 h. Los datos se presentan como la media  $\pm$  e.e. de  $n=3$  (ANOVA y test de Dunnett  $P<0.05$ ).

### 6.3 Efectos de los aceites de menta, clavo y canela sobre la actividad de los complejos de la CTE en *Saccharomyces cerevisiae*.

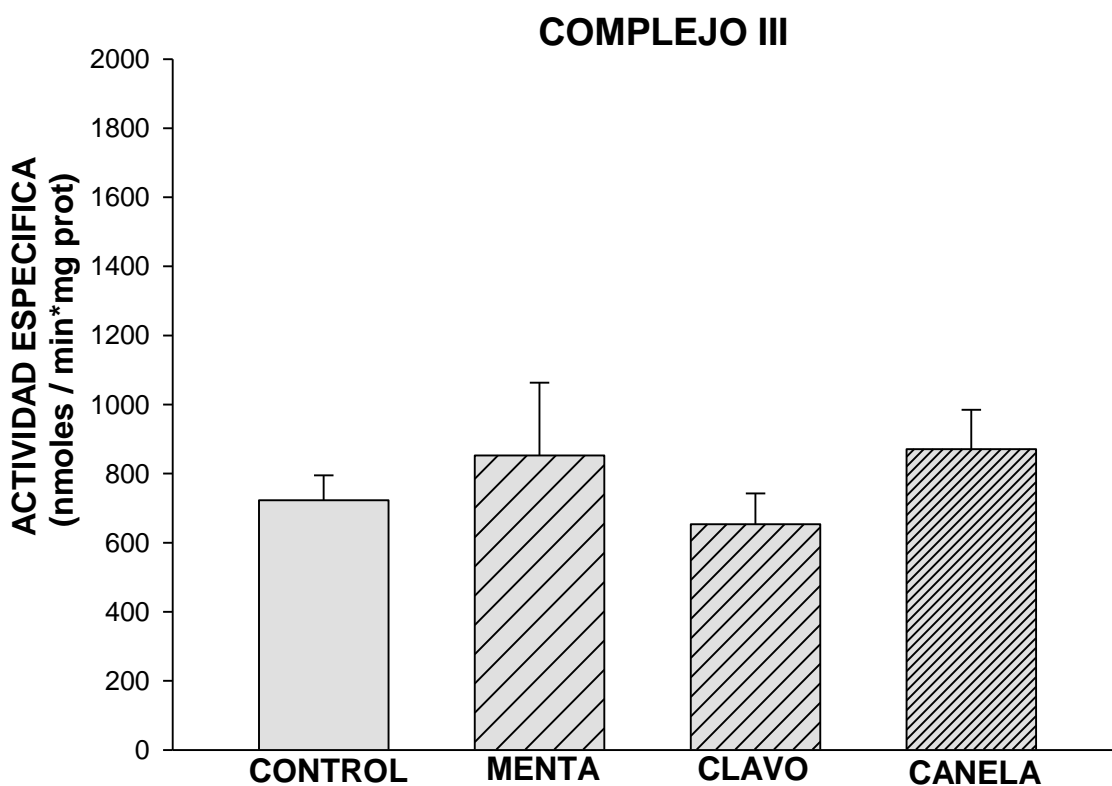
Para determinar si la inhibición del crecimiento ejercida por 0.005% de los aceites esenciales (Figs. 11 y 12) puede estar relacionada con una disminución de la actividad de la CTE, se evaluaron las actividades de los complejos II, III y IV de la CTE de mitocondrias aisladas de células de *S. cerevisiae* que fueron tratadas durante 24 h con los aceites.

En la Fig. 14 se muestra que la incubación con 0.005% de los aceites esenciales de menta, clavo y canela disminuyó en 22.6%, 31.8% y 30.7%, respectivamente, la actividad del complejo II.



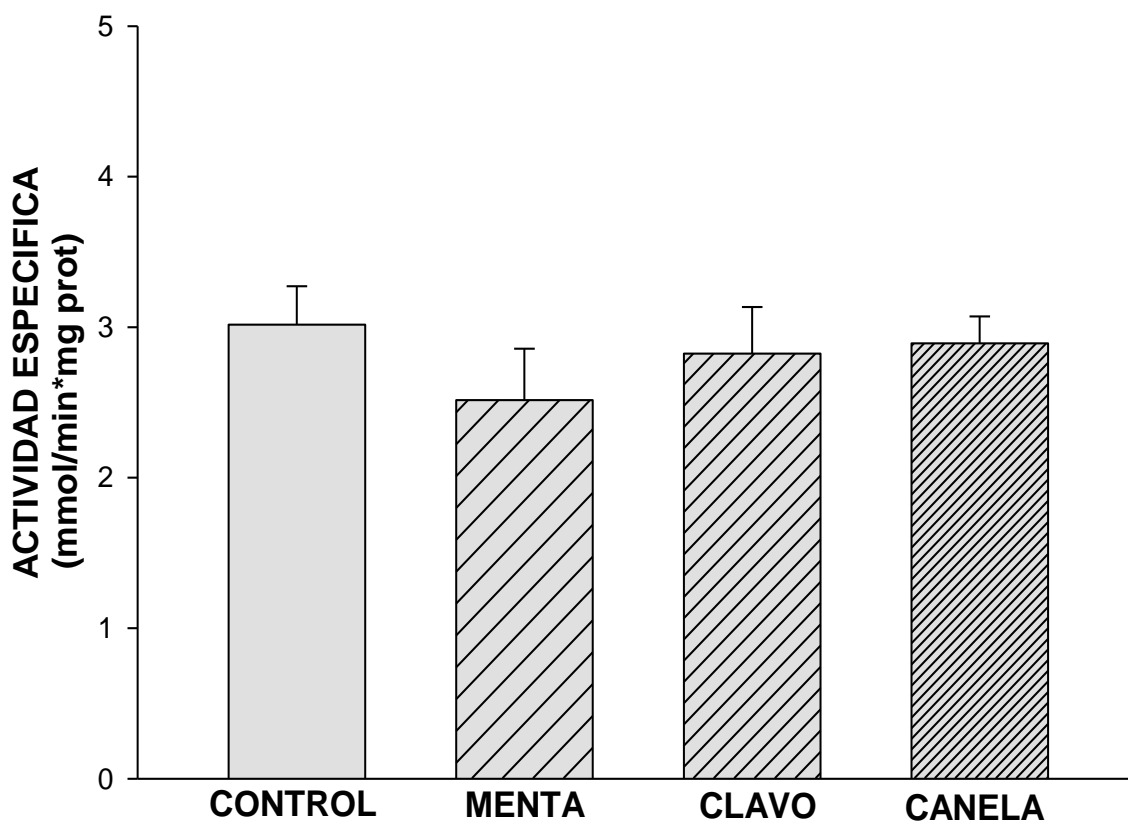
**Figura 14.** Actividad del complejo II de mitocondrias aisladas de células de *Saccharomyces cerevisiae* previamente incubadas con 0.005% (V/V) de aceites de menta, clavo o canela en medio YPD durante 24 h. Los datos se presentan como la media  $\pm$  e.e. de  $n=3$  (ANOVA y test de Dunnett  $P<0.05$ ).

En contraste, el tratamiento con los aceites esenciales no ejerció ningún efecto estadísticamente significativo en las actividades de los complejos III y IV. El complejo III (Fig. 15), tuvo una actividad respecto al control del 117.9%, 90.4% y 120.5% con los aceites esenciales de menta, clavo y canela, respectivamente. En cambio, el complejo IV (Fig. 16) tuvo una actividad de 83.4%, 93.7% y 95.9% respecto al control con los aceites esenciales de menta, clavo y canela. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas para ningún tratamiento.



**Figura 15.** Actividad del complejo III de mitocondrias aisladas de células de *Saccharomyces cerevisiae* previamente incubadas con 0.005% (V/V) de aceites de menta, clavo o canela en medio YPD durante 24 h. Los datos se presentan como la media  $\pm$  e.e. de n=3 (ANOVA y test de Dunnett  $P < 0.05$ ).

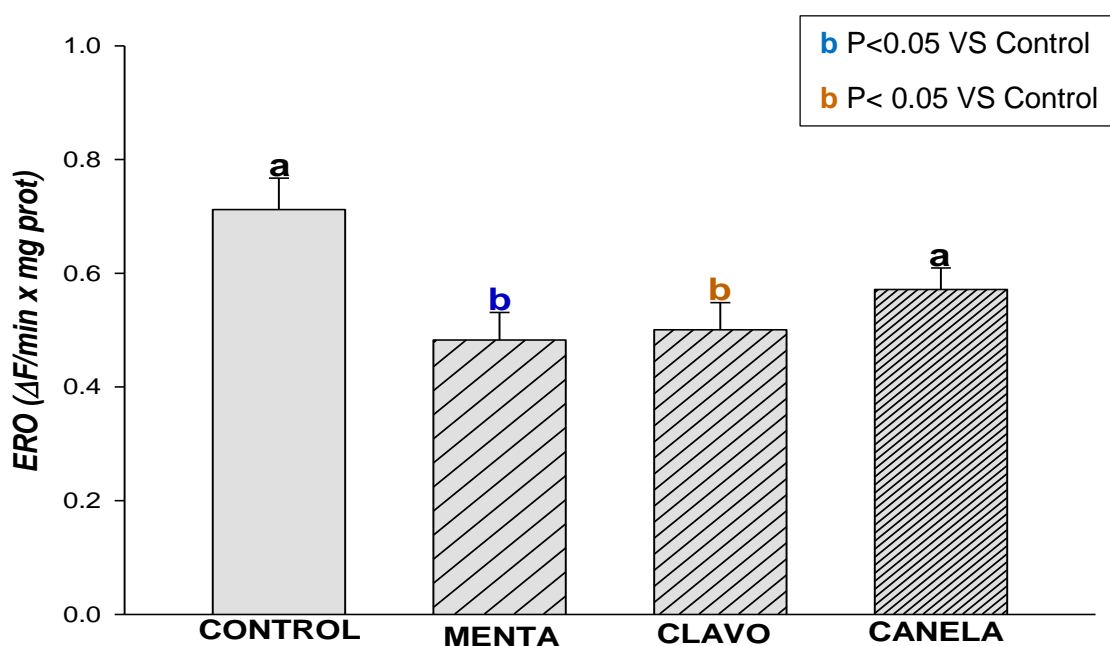
## COMPLEJO IV



**Figura 16.** Actividad del complejo IV de mitocondrias aisladas de células de *Saccharomyces cerevisiae* previamente incubadas con 0.005% (V/V) de aceites de menta, clavo o canela en medio YPD durante 24 h. Los datos se presentan como la media  $\pm$  e.e. de n=3 (ANOVA y test de Dunnett  $P < 0.05$ ).

#### 6.4 Efecto de los aceites de menta, clavo y canela sobre la producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae*.

En la Fig. 17 se puede observar que el tratamiento de las células de la levadura con 0.005% de los aceites de menta, clavo y canela disminuyen en mitocondrias aisladas los niveles de ERO producidas con un sustrato del complejo II en un 67.8%, 70.3% y 80.3%, respectivamente. Estos efectos fueron estadísticamente significativos solo con los aceites esenciales de menta y clavo.



**Figura 17.** Producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) en mitocondrias aisladas de células de *Saccharomyces cerevisiae* previamente incubadas con 0.005% (V/V) de aceites de menta, clavo o canela en medio YPD durante 24 h. Los datos se presentan como la media  $\pm$  e.e. de n=3 (ANOVA y test de Dunnett P<0.05).

## 7. DISCUSIÓN

La frecuencia de infecciones micóticas oportunistas se debe en gran medida a los mecanismos que las cepas de interés clínico han desarrollado a lo largo del tiempo debido a la demanda y al uso indiscriminado de antimicóticos. Se ha demostrado que el uso constante de antimicóticos ya sea a corto o largo plazo desencadenan los mecanismos de resistencia de los microorganismos patógenos (Franz et al., 1998). El estudio de nuevos tratamientos que ayuden a erradicar las infecciones micóticas es de suma importancia para la población en general. Los aceites de menta, clavo y canela contienen principios activos como son mentona, mentol, cinamaldehído y eugenol con propiedades antifúngicas. Aunque también presentan propiedad antioxidante, que previene el desarrollo del estrés oxidativo.

El presente trabajo plantea que los aceites de menta, clavo y canela contribuyen a la inhibición del desarrollo microbiano. Las mitocondrias tienen un papel esencial en la patogenicidad y la resistencia a los fármacos antimicóticos. Por tanto, las mitocondrias representan un objetivo atractivo para el desarrollo de nuevas estrategias antifúngicas. Al estar relacionada con el metabolismo energético, el estrés oxidativo, la señalización celular y la muerte celular, la mitocondria controla hasta cierto punto la vida y la muerte en las células eucariotas. Se ha propuesto la disfunción mitocondrial como mecanismo de acción mediante el cual dichos aceites esenciales actúan sobre células de *S. cerevisiae*. De ser así, este modelo se puede aplicar en hongos patógenos dado que estudios anteriores sugieren un vínculo entre la respiración y la integridad de la pared celular (Duvenage et al., 2019). Sin embargo, el modo de acción de estos aceites esenciales aún no está claro.

Se realizó una curva dosis – respuesta para determinar la dosis letal 50 de los aceites. Se observó de manera sorprendente que el efecto máximo de los aceites se obtuvo a concentraciones tan bajas como 0.16%, y que, en el caso de los aceites de menta y clavo, el poder inhibitorio disminuyó a concentraciones de entre 0.31%, a 1.25% (Fig. 11). Una posible explicación para ello es que el incremento en la concentración de aceites aumente de manera paralela el contenido

de antioxidantes dentro de las células, ya que estos aceites se caracterizan por contener antioxidantes de naturaleza lipofílica (Chaieb et al., 2007; de Sousa Barros et al., 2015; Unlu et al., 2010), lo que podría contrarrestar el efecto negativo que tienen los componentes de los aceites sobre enzimas de membrana (Rao et al., 2019) tales como los complejos de la CTE.

En virtud de que concentraciones de entre 0.16% a 1.25% inhibieron en alrededor de un 70 a un 90% el crecimiento de la levadura, se decidió bajar las concentraciones de los aceites esenciales para alcanzar la dosis letal 50 y tener un número más grande de células para poder aislar mitocondrias (Figs. 11 y 12). Sin embargo, se encontró que la ventana de efectos de los aceites es muy estrecha, ya que diferentes concentraciones entre 0.005% y 0.16% provocaban una inhibición mayor del 50% por lo que se decidió estudiar los efectos a nivel mitocondrial en células con 0.005% de los aceites, con la desventaja de que a esta concentración el porcentaje de inhibición del crecimiento no fue muy alto. Por lo que se tiene como perspectiva estudiar los efectos a nivel mitocondrial de los aceites a las concentraciones de entre 0.16% a 1.25%, pero agregando los aceites esenciales una vez que las células hayan alcanzado la fase estacionaria.

Es importante mencionar que estos resultados vienen apoyados de algunos casos de aceites esenciales y su actividad antifúngica donde, por ejemplo, (Hammer et al., 2004) demostraron las actividades antifúngicas del aceite del árbol del té contra *C. albicans*, *C. glabrata* y *S. cerevisiae*, con concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) que oscilan entre el 0,5% y el 1% (v / v). Recientemente, (Powers et al., 2018) seleccionaron un total de 60 aceites esenciales disponibles comercialmente, tales como aceite esencial de corteza de canela, aceite esencial de limón, aceite esencial de menta, entre otros, contra *Aspergillus niger*, *C. albicans* y *C. neoformans*. En este caso, la CMI de los aceites esenciales osciló entre el 0,02% y el 1,250% (v / v). Por otro lado, (Hu et al., 2019) publicaron las actividades antifúngicas de la corteza de canela, menta, citronela, anís, pimienta y aceite esencial de clavo contra *A. niger*, *A. oryzae* y *A. ochraceus* con MIC de 0,06% a 0,2% (v / v).



En la medición de la actividad de los complejos de la cadena de transporte de electrones, los resultados demuestran que la actividad del complejo II de las mitocondrias de *S. cerevisiae* se ve disminuido mediante el tratamiento con aceite de clavo y canela con respecto al grupo control, mientras que la menta no causo ninguna diferencia en este complejo (Figura 14). No obstante, se debe tener en cuenta la complejidad de la composición de cada aceite esencial, por lo que el mecanismo de acción podría ser distinto en cada caso (Yang et al., 2021). Por otra parte, en la actividad del complejo III y IV (Figura 15 y 16) no se obtuvo diferencia estadística, por consiguiente, el único complejo que sufrió daño fue el II. Esto se relaciona con un estudio el cual muestra que el aceite esencial de *Salvia officinalis* inhibe la entrada de electrones a la CTE, a través del complejo II, en larvas de *Aedes aegypti* y esto se atribuye a la permeabilidad de 1,8-cineol y  $\alpha$ -tujona a las membranas biológicas, compuestos lipídicos y solubles en agua. Una posible explicación es que ocurra una modificación en las vías metabólicas que proporcionan los sustratos necesarios para la entrada de electrones de este complejo, o por una disminución en el flujo de electrones a la ubiquinona (Q), afectando la producción de ATP (Castillo-Morales et al., 2019).

La disminución de la actividad del complejo II (Fig. 14) correlaciona con la menor producción de ERO observada con el tratamiento de los aceites (Fig. 17), dado que este parámetro se midió usando succinato, el sustrato de este complejo. Por lo tanto, se puede proponer que al haber menor flujo de electrones en la cadena debido a una menor oxidación del succinato en el complejo II, podría haber menor disponibilidad de electrones para que el complejo III, el sitio principal de producción de ERO en la CTE de *S. cerevisiae*, reduzca de manera no catalítica al oxígeno para producir radical superóxido. La otra posible explicación para este fenómeno es que alguno de los componentes antioxidantes del aceite este disminuyendo la producción de ERO a nivel mitocondrial. Esta idea parece factible por el hecho de que las ERO se producen en las inmediaciones de la membrana interna mitocondrial y a que los compuestos lipofílicos del aceite podrían acumularse en estructuras hidrofóbicas como lo son las membranas biológicas. En un estudio con el aceite esencial de las hojas de *Vernonia brasiliensis*, un aceite rico en terpenos, se

observaron cambios ultraestructurales en las mitocondrias, la disminución del potencial de membrana mitocondrial y el aumento de la producción de ROS, que en conjunto indujeron la muerte celular por apoptosis tardía (Mondêgo-Oliveira et al., 2021).

Muchos compuestos antioxidantes actúan por un único mecanismo, pero otros como por ejemplo los compuestos fenólicos pueden tener acciones combinadas. Los compuestos fenólicos estabilizan los radicales libres al ceder un hidrogeno de sus grupos hidroxilos, formándose un puente de hidrogeno entre dos grupos cercanos. El grado de actividad de los compuestos fenólicos y de otros muchos antioxidantes, está relacionado con el número de grupos hidroxilo que posee la molécula. Cabe destacar que también puede existir un sinergismo entre las distintas moléculas antioxidantes *in vitro* e *in vivo* (Choe & Min, 2006; Rao et al., 2019). Los resultados de este trabajo indican que el efecto tóxico de los aceites no está relacionado con daño oxidativo en las células debido a una mayor producción de ERO. Sin embargo, se ha encontrado que la disminución de la actividad del complejo II puede tener un impacto profundo en todo el funcionamiento de la mitocondria, llevando a una disminución de la síntesis de ATP, pérdida de la integridad mitocondrial e inducción de muerte celular (Harmuth et al., 2018).

Se realizó un experimento adicional en el que se estudió el comportamiento que se tuvo al adicionar 0.00512% de fluconazol con aceites de menta, clavo y canela al 0.005% y 0.16%. (Fig. 13). Se demostró que el efecto del fluconazol no fue mejorado por el tratamiento conjunto con ninguno de los aceites a dichas concentraciones, esto podría ser debido a que la dosis de fluconazol utilizada no fue lo suficientemente alta para causar un efecto sinérgico.

Es de resaltarse que concentraciones de los aceites tan bajas como 0.16% provoquen un efecto inhibitorio del crecimiento de casi la totalidad de las células, lo que sugiere que estos aceites podrían utilizarse a muy bajas dosis, al menos en infecciones fúngicas tópicas, donde se evitaría la ingesta del aceite y sus probables efectos tóxicos. Sin embargo, en función de lo anterior, parece factible estudiar los efectos tóxicos en mamíferos de estos aceites en toda la gama de concentraciones

estudiadas, para ver la factibilidad de su administración contra micosis profundas por otras vías de administración. Su uso como nueva terapia antifúngica podría sustituir a los medicamentos convencionales. Sin embargo, estas suposiciones deben tomarse con precaución dado que los efectos fungicidas fueron estudiados en *S. cerevisiae* pero no en *Cándida spp.*, por lo que otra perspectiva es realizar el presente estudio en este último hongo.

## 8. CONCLUSIÓN

Los aceites de menta, clavo y canela inhiben a bajas concentraciones el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae*, lo cual podría estar relacionado con una disminución de la actividad del complejo II, lo que causa una disminución en la producción de ERO.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Hack, M. E., Alagawany, M., Abdel-Moneim, A.-M. E., Mohammed, N. G., Khafaga, A. F., Bin-Jumah, M., Othman, S. I., Allam, A. A., & Elnesr, S. S. (2020). Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) Oil as a Potential Alternative to Antibiotics in Poultry. *Antibiotics*, *9*(5), 210.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9050210>
- Arenas Guzmán, R. (2014). *Micología médica ilustrada*. <http://www.ebooks7-24.com/?il=841>
- Argentina & Comisión Permanente de la Farmacopea Argentina. (2003). *Farmacopea Argentina*. Ministerio de Salud de la Nación.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(2), 446-475.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Bakker, B. M., Overkamp, K. M., van Maris, A. J. A., Kötter, P., Luttik, M. A. H., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*(1), 15-37. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00570.x>
- BANG, K.-H., LEE, D.-W., PARK, H.-M., & RHEE, Y.-H. (2000). Inhibition of Fungal Cell Wall Synthesizing Enzymes by trans-Cinnamaldehyde. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *64*(5), 1061-1063.  
<https://doi.org/10.1271/bbb.64.1061>

- Bassolé, I. H. N., & Juliani, H. R. (2012). Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, 17(4), 3989-4006.  
<https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- Bentinger, M., Brismar, K., & Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7 Suppl, S41-50.  
<https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.02.006>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2011). *Bioquímica*. Reverté.
- Bonifaz Trujillo, J. A. (2012). *Micología médica básica*.  
<http://site.ebrary.com/id/10757986>
- Braconi, D., Bernardini, G., & Santucci, A. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* as a model in ecotoxicological studies: A post-genomics perspective. *Journal of Proteomics*, 137, 19-34. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.001>
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223-253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Campoy, S., & Adrio, J. L. (2017). Antifungals. *Biochemical Pharmacology*, 133, 86-96. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.11.019>
- Castillo-Morales, R. M., Carreño Otero, A. L., Mendez-Sanchez, S. C., Da Silva, M. A. N., Stashenko, E. E., & Duque, J. E. (2019). Mitochondrial affectation, DNA damage and AChE inhibition induced by *Salvia officinalis* essential oil on *Aedes aegypti* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*:

*Toxicology & Pharmacology*, 221, 29-37.

<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.03.006>

- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., & Bakhrouf, A. (2007). The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): A short review. *Phytotherapy Research: PTR*, 21(6), 501-506. <https://doi.org/10.1002/ptr.2124>
- Choe, E., & Min, D. B. (2006). Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(4), 169-186. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x>
- Cortés-Rojo, C., Calderón-Cortés, E., Clemente-Guerrero, M., Estrada-Villagómez, M., Manzo-Avalos, S., Mejía-Zepeda, R., Boldogh, I., & Saavedra-Molina, A. (2009). Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 41(1), 15-28. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9200-3>
- Crane, F. L., Hatefi, Y., Lester, R. L., & Widmer, C. (1957). Isolation of a quinone from beef heart mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 25(1), 220-221. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(57\)90457-2](https://doi.org/10.1016/0006-3002(57)90457-2)
- da Silva Dantas, A., Patterson, M. J., Smith, D. A., Maccallum, D. M., Erwig, L. P., Morgan, B. A., & Quinn, J. (2010). Thioredoxin regulates multiple hydrogen

peroxide-induced signaling pathways in *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology*, 30(19), 4550-4563. <https://doi.org/10.1128/MCB.00313-10>

Dantas, A. D. S., Day, A., Ikeh, M., Kos, I., Achan, B., & Quinn, J. (2015). Oxidative Stress Responses in the Human Fungal Pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules*, 5(1), 142-165. <https://doi.org/10.3390/biom5010142>

De Deken, R. H. (1966). The Crabtree Effect: A Regulatory System in Yeast. *Journal of General Microbiology*, 44(2), 149-156. <https://doi.org/10.1099/00221287-44-2-149>

de Sousa Barros, A., de Moraes, S. M., Ferreira, P. A. T., Vieira, Í. G. P., Craveiro, A. A., dos Santos Fontenelle, R. O., de Menezes, J. E. S. A., da Silva, F. W. F., & de Sousa, H. A. (2015). Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. *Industrial Crops and Products*, 76, 557-564. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.004>

Debruyne, D., & Ryckelynck, J.-P. (1993). Clinical Pharmacokinetics of Fluconazole. *Clinical Pharmacokinetics*, 24(1), 10-27. <https://doi.org/10.2165/00003088-199324010-00002>

Diezmann, S., Cox, C. J., Schönian, G., Vilgalys, R. J., & Mitchell, T. G. (2004). Phylogeny and Evolution of Medical Species of *Candida* and Related Taxa: A Multigenic Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5624-5635. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5624-5635.2004>



- Duvenage, L., Walker, L. A., Bojarczuk, A., Johnston, S. A., MacCallum, D. M., Munro, C. A., & Gourlay, C. W. (2019). Inhibition of Classical and Alternative Modes of Respiration in *Candida albicans* Leads to Cell Wall Remodeling and Increased Macrophage Recognition. *MBio*, *10*(1).  
<https://doi.org/10.1128/mBio.02535-18>
- Esper, R. C., Rivera, O. I. F., Maldonado, R. N., Zepeda, A. D., Calatayud, Á. A. P., & Trujillo, A. O. (2016). *Especies reactivas de oxígeno, sepsis y teoría metabólica del choque séptico*. 13.
- Estrella, M. C. (2010). Antifungicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: Importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Revista Española de Quimioterapia*, *23*(4), 169-176.
- Figueras, C., Heredia, C. D. de, García, J. J., Navarro, M., Ruiz-Contreras, J., Rossich, R., Rumbao, J., Frick, M. A., & Roselló, E. M. (2011). Recomendaciones de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre diagnóstico y tratamiento de la candidiasis invasiva. *Anales de Pediatría*, *74*(5), 337. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2010.12.012>
- Folch-Mallol, J. L., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., & Robles, A. A. C. (2004). La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, *46*(1-2), 24-46.

- Franz, R., Kelly, S. L., Lamb, D. C., Kelly, D. E., Ruhnke, M., & Morschhäuser, J. (1998). Multiple Molecular Mechanisms Contribute to a Stepwise Development of Fluconazole Resistance in Clinical *Candida albicans* Strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *42*(12), 3065-3072. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.12.3065>
- Fuentes, M., Hermosilla, G., Alburquenque, C., Falconer, M. A., Amaro, J., & Tapia, C. (2014). Caracterización de los mecanismos de resistencia a azoles en aislados clínicos chilenos de *Candida albicans*. *Revista chilena de infectología*, *31*(5), 511-517. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000500001>
- Gessler, N. N., Aver'yanov, A. A., & Belozerskaya, T. A. (2007). Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry. Biokhimiia*, *72*(10), 1091-1109. <https://doi.org/10.1134/s0006297907100070>
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, *274*(5287), 546-567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (2004). Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *53*(6), 1081-1085. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh243>

Harmuth, T., Prell-Schicker, C., Weber, J. J., Gellerich, F., Funke, C., Drießen, S., Magg, J. C. D., Kriebiel, G., Wolburg, H., Hayer, S. N., Hauser, S., Krüger, R., Schöls, L., Riess, O., & Hübener-Schmid, J. (2018). Mitochondrial Morphology, Function and Homeostasis Are Impaired by Expression of an N-terminal Calpain Cleavage Fragment of Ataxin-3. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00368>

Harper, H. A., Murray, R. K., & Rivera Muñoz, B. (2013). *Harper: Bioquímica ilustrada*. McGraw-Hill.  
[http://ZV4FY5PR5L.search.serialssolutions.com/?V=1.0&L=ZV4FY5PR5L&S=JCs&C=TC\\_027892459&T=marc&tab=BOOKS](http://ZV4FY5PR5L.search.serialssolutions.com/?V=1.0&L=ZV4FY5PR5L&S=JCs&C=TC_027892459&T=marc&tab=BOOKS)

Herrero, E., Ros, J., Bellí, G., & Cabisco, E. (2008). Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1780(11), 1217-1235.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.004>

Herro, E., & Jacob, S. E. (2010). *Mentha piperita* (peppermint). *Dermatitis: Contact, Atopic, Occupational, Drug*, 21(6), 327-329.

Hirst, J. (2009). Towards the molecular mechanism of respiratory complex I. *The Biochemical Journal*, 425(2), 327-339. <https://doi.org/10.1042/BJ20091382>

Horton, H. R. (Ed.). (2006). *Principles of biochemistry* (4th ed). Pearson Prentice Hall.

- Horton, H. R. (2008). *Principios de bioquímica*. Pearson Educación.
- Hsouna, A. B., Touj, N., Hammami, I., Dridi, K., Al-Ayed, A. S., & Hamdi, N. (2019). Chemical Composition and in vivo Efficacy of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. in the Suppression of Crown Gall Disease on Tomato Plants. *Journal of Oleo Science*, 68(5), 419-426.  
<https://doi.org/10.5650/jos.ess18261>
- Hu, F., Tu, X.-F., Thakur, K., Hu, F., Li, X.-L., Zhang, Y.-S., Zhang, J.-G., & Wei, Z.-J. (2019). Comparison of antifungal activity of essential oils from different plants against three fungi. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 134, 110821. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110821>
- Huang, S., & Millar, A. H. (2013). Succinate dehydrogenase: The complex roles of a simple enzyme. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(3), 344-349.  
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2013.02.007>
- Ibrahim, N. H., Melake, N. A., Somily, A. M., Zakaria, A. S., Baddour, M. M., & Mahmoud, A. Z. (2015). The effect of antifungal combination on transcripts of a subset of drug-resistance genes in clinical isolates of *Candida* species induced biofilms. *Saudi Pharmaceutical Journal: SPJ: The Official Publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 23(1), 55-66.  
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2013.12.007>

- Iraqi, I., Kienda, G., Soeur, J., Faye, G., Baldacci, G., Kolodner, R. D., & Huang, M.-E. (2009). Peroxiredoxin Tsa1 Is the Key Peroxidase Suppressing Genome Instability and Protecting against Cell Death in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*, 5(6), e1000524.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000524>
- Itoh, H., Takahashi, A., Adachi, K., Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., & Kinosita, K. (2004). Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase. *Nature*, 427(6973), 465-468. <https://doi.org/10.1038/nature02212>
- Jamieson, D. J., Stephen, D. W. S., & Terrière, E. C. (1996). Analysis of the adaptive oxidative stress response of *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*, 138(1), 83-88. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08139.x>
- Karathia, H., Vilapriyo, E., Sorribas, A., & Alves, R. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLOS ONE*, 6(2), e16015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016015>
- Kusch, H., Engelmann, S., Albrecht, D., Morschhäuser, J., & Hecker, M. (2007). Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Proteomics*, 7(5), 686-697. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600575>
- Lazo, V., Hernández, G., & Méndez, R. (2018). Candidiasis sistémica en pacientes críticos, factores predictores de riesgo. *Horizonte Médico (Lima)*, 18(1), 75-85. <https://doi.org/10.24265/horizmed.2018.v18n1.11>
- Lehninger, A. L., Cox, M. M., & Nelson, D. L. (2006). *Principios de bioquímica*. Omega.

- Lenaz, G., Fato, R., Genova, M. L., Bergamini, C., Bianchi, C., & Biondi, A. (2006). Mitochondrial Complex I: Structural and functional aspects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(9), 1406-1420. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.05.007>
- Lenaz, G., & Genova, M. L. (2007). Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: Random collisions vs. solid state electron channeling. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 292(4), C1221-1239. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00263.2006>
- Liu, Y., Fiskum, G., & Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Neurochemistry*, 80(5), 780-787. <https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2002.00744.x>
- Lorenz, M. C., Bender, J. A., & Fink, G. R. (2004). Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryotic Cell*, 3(5), 1076-1087. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1076-1087.2004>
- Macedo-Márquez, A. (2012). LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROS) EN LAS MITOCONDRIAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE. 15(2), 7.
- Maertens, J. A. (2004). History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1470-9465.2004.00841.x>

- Manzano-Gayosso, P., Méndez-Tovar, L. J., Hernández-Hernández, F., & López-Martínez, R. (2008). La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. *Gaceta Médica de México*, 144(1), 23-26.
- Martínez, M., López-Ribot, J. L., Kirkpatrick, W. R., Bachmann, S. P., Perea, S., Ruesga, M. T., & Patterson, T. F. (2002). Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(3), 515-524.  
<https://doi.org/10.1093/jac/49.3.515>
- Mathews, C. K., Van Holde, K. E., & Ahern, K. G. (2002). *Bioquímica (3a. Ed.)*. Pearson Educación.
- McCusker, J. H. (2006). *Saccharomyces cerevisiae*: An Emerging and Model Pathogenic Fungus. En *Molecular Principles of Fungal Pathogenesis* (pp. 245-259). John Wiley & Sons, Ltd.  
<https://doi.org/10.1128/9781555815776.ch18>
- McKay, D. L., & Blumberg, J. B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research: PTR*, 20(8), 619-633. <https://doi.org/10.1002/ptr.1936>
- McKee, T., McKee, J. R., & González de Buitrago, J. M. (2005). *Bioquímica: La base molecular de la vida*. McGraw-Hill Interamericana.

- Mondêgo-Oliveira, R., de Sá Sousa, J. C., Moragas-Tellis, C. J., de Souza, P. V. R., dos Santos Chagas, M. do S., Behrens, M. D., Jesús Hardoim, D. de, Taniwaki, N. N., Chometon, T. Q., Bertho, A. L., Calabrese, K. da S., Almeida-Souza, F., & Abreu-Silva, A. L. (2021). Vernonia brasiliensis (L.) Druce induces ultrastructural changes and apoptosis-like death of Leishmania infantum promastigotes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 133, 111025. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111025>
- Nakagawa, Y., Kanbe, T., & Mizuguchi, I. (2003). Disruption of the human pathogenic yeast *Candida albicans* catalase gene decreases survival in mouse-model infection and elevates susceptibility to higher temperature and to detergents. *Microbiology and Immunology*, 47(6), 395-403. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03376.x>
- Nasution, O., Srinivasa, K., Kim, M., Kim, Y.-J., Kim, W., Jeong, W., & Choi, W. (2008). Hydrogen Peroxide Induces Hyphal Differentiation in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 7(11), 2008-2011. <https://doi.org/10.1128/EC.00105-08>
- Nelson, D. L., Cox, M. C., & Lehninger, A. L. (2019). *Lehninger, principios de bioquímica*.
- Ortega-Peña, S., & Hernández-Zamora, E. (2019). Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: Fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 75(2), 665. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.M18000012>



Ortiz-Avila, O., Esquivel-Martínez, M., Olmos-Orizaba, B. E., Saavedra-Molina, A., Rodríguez-Orozco, A. R., & Cortés-Rojo, C. (2015). Avocado Oil Improves Mitochondrial Function and Decreases Oxidative Stress in Brain of Diabetic Rats. *Journal of Diabetes Research*, 2015, e485759.

<https://doi.org/10.1155/2015/485759>

Pinto, E., Vale-Silva, L., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2009). Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Journal of Medical Microbiology*, 58(Pt 11), 1454-1462. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.010538-0>

Powers, C. N., Osier, J. L., McFeeters, R. L., Brazell, C. B., Olsen, E. L., Moriarity, D. M., Satyal, P., & Setzer, W. N. (2018). Antifungal and Cytotoxic Activities of Sixty Commercially-Available Essential Oils. *Molecules*, 23(7), 1549.

<https://doi.org/10.3390/molecules23071549>

Rao, J., Chen, B., & McClements, D. J. (2019). Improving the Efficacy of Essential Oils as Antimicrobials in Foods: Mechanisms of Action. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1), 365-387.

<https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121727>

Reyes-Montes, M. del R., Duarte-Escalante, E., Martínez-Herrera, E., Acosta-Altamirano, G., & Frías-De León, M. G. (2017). Current status of the etiology of candidiasis in Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(4), 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.05.001>

- Rieske, J. S., MacLennan, D. H., & Coleman, R. (1964). Isolation and properties of an iron-protein from the (reduced coenzyme Q)-cytochrome C reductase complex of the respiratory chain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *15*(4), 338-344. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(64\)90171-8](https://doi.org/10.1016/0006-291X(64)90171-8)
- Roetzer, A., Gratz, N., Kovarik, P., & Schüller, C. (2010). Autophagy supports *Candida glabrata* survival during phagocytosis. *Cellular Microbiology*, *12*(2), 199-216. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01391.x>
- Rubin-Bejerano, I., Fraser, I., Grisafi, P., & Fink, G. R. (2003). Phagocytosis by neutrophils induces an amino acid deprivation response in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(19), 11007-11012.
- Ruiz-Pérez, N. J., Arriaga-Alba, M., Ocharán-Hernández, M. E., Sánchez-Navarrete, J., Pérez-Cruz, E., Rodríguez-Wong, U., & Cruz-Rico, J. (2013). *Aspectos farmacocinéticos del fluconazol*. 6.
- Sadeghi, S., Davoodvandi, A., Pourhanifeh, M. H., Sharifi, N., ArefNezhad, R., Sahebhasagh, R., Moghadam, S. A., Sahebkar, A., & Mirzaei, H. (2019). Anti-cancer effects of cinnamon: Insights into its apoptosis effects. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *178*, 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.067>

- Singh, J., Baghotia, A., & Goel, S. P. (2012). *Eugenia caryophyllata* Thunberg (family Myrtaceae): A review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(4), 1469-1475.
- Singh, N., Rao, A. S., Nandal, A., Kumar, S., Yadav, S. S., Ganaie, S. A., & Narasimhan, B. (2021). Phytochemical and pharmacological review of *Cinnamomum verum* J. Presl-a versatile spice used in food and nutrition. *Food Chemistry*, 338, 127773.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127773>
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, 552(Pt 2), 335-344.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1561-1568.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002>
- Unlu, M., Ergene, E., Unlu, G. V., Zeytinoglu, H. S., & Vural, N. (2010). Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(11), 3274-3280.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.09.001>

- Valdés, G., & Susana, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), 1-1.
- Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science (New York, N. Y.)*, 283(5407), 1482-1488.  
<https://doi.org/10.1126/science.283.5407.1482>
- Wang, Y., Cao, Y.-Y., Jia, X.-M., Cao, Y.-B., Gao, P.-H., Fu, X.-P., Ying, K., Chen, W.-S., & Jiang, Y.-Y. (2006). Cap1p is involved in multiple pathways of oxidative stress response in *Candida albicans*. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(7), 1201-1209.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.019>
- Weber, J., & Senior, A. E. (2003). ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase. *FEBS Letters*, 545(1), 61-70.  
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00394-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00394-6)
- Wolf, D. E., Hoffman, C. H., Trenner, N. R., Arison, B. H., Shunk, C. H., Linn, B. O., McPherson, J. F., & Folkers, K. (1958). COENZYME Q. I. STRUCTURE STUDIES ON THE COENZYME Q GROUP. *Journal of the American Chemical Society*, 80(17), 4752-4752. <https://doi.org/10.1021/ja01550a096>
- Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., & Deisenhofer, J. (1997). Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science (New York, N. Y.)*, 277(5322), 60-66. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.60>

- Yan, N. (2015). Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. *Annual Review of Biophysics*, 44(1), 257-283.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-033901>
- Yang, S.-K., Tan, N.-P., Chong, C.-W., Abushelaibi, A., Lim, S.-H.-E., & Lai, K.-S. (2021). The Missing Piece: Recent Approaches Investigating the Antimicrobial Mode of Action of Essential Oils. *Evolutionary Bioinformatics*, 17, 1176934320938391. <https://doi.org/10.1177/1176934320938391>
- Zhang, X., De Micheli, M., Coleman, S. T., Sanglard, D., & Moye-Rowley, W. S. (2002). Analysis of the oxidative stress regulation of the *Candida albicans* transcription factor, Cap1p: Regulation of *C. albicans* Cap1p. *Molecular Microbiology*, 36(3), 618-629. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01877.x>