



Escuela de Obstetricia y Puericultura
Casa Central

**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y CITOTÓXICA DE ACEITES ESENCIALES DE
FABIANA IMBRICATA, *MYRCEUGENIA EXSUCCA* y *PEUMUS BOLDUS*
EN LEVADURAS TIPO CÁNDIDA Y LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA**

Tesis para obtener el grado de Licenciado(a) en Obstetricia y Puericultura

Profesor Guía:

Alejandro Madrid Villegas

Doctor en Ciencias, Mención Química

Autor(es):

Ignacio Bravo Lobos

Vania Olave González

Camila Venegas Valdés

Viña del Mar, 2019

AGRADECIMIENTOS

La familia es amor, soporte y entrega, son ellas nuestro pilar fundamental dentro de nuestra carrera universitaria, y es por ello que nuestros primeros agradecimientos van hacia ellas.

A los profesores Alejandro Madrid e Iván Montenegro por ser guías, contención y motivación dentro de la investigación.

A nuestros amigos, por la paciencia y apoyo constante durante este proceso.

Al equipo que trabaja en el laboratorio, por su buena recepción y disposición a ayudarnos.

A Dobby por su compañía y alegría durante las largas horas de redacción, Q.E.P.D. corazoncito.

A nuestra paciencia para trabajar en equipo y crecer como compañeros.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	3
ÍNDICE TABLAS Y FIGURAS	7
RESUMEN	9
I. INTRODUCCIÓN	11
II. ABREVIATURAS	13
III. GLOSARIO	14
IV. MARCO TEÓRICO	15
4.1. LEVADURAS	15
4.1.1. Definición	15
4.1.2. Manifestaciones clínicas	16
4.1.3. Diagnóstico	18
4.1.4. Tratamiento	19
4.1.5. Tratamiento complementario	20
4.1.6. Tipos de candidas estudiadas	20
4.1.6.1. <i>Candida albicans</i>	20
4.1.6.2. <i>Candida lusitaniae</i>	21
4.1.6.3. <i>Candida parapsilosis</i>	21
4.1.6.4. <i>Candida guilliermondii</i>	21
4.1.6.5. <i>Candida tropicalis</i>	22
4.2. CÁNCER	23
4.2.1. Definición	23
CÁNCER DE MAMA	24
4.2.2. Manifestaciones clínicas	24
4.2.3. Diagnóstico	24
4.2.4. Tratamiento	25

4.2.5. Tratamiento complementario	25
4.3. POSIBLES TRATAMIENTOS FITOTERAPÉUTICOS A INVESTIGAR	27
4.3.1. <i>Fabiana Imbricata</i> Ruiz & Pav, “Romero Pichi”	27
4.3.1.1. Taxonomía	27
4.3.1.2. Descripción	27
4.3.1.3. Composición química	27
4.3.1.4. Relevancia científica	28
4.3.2. <i>Myrceugenia exsucca</i> (DC) O. Berg, “Pitra”	29
4.3.2.1. Taxonomía	29
4.3.2.2. Descripción	29
4.3.2.3. Composición química	29
4.3.2.4. Relevancia científica	30
4.3.3. <i>Peumus Boldus</i> Molina, “Boldo”	31
4.3.3.1 Taxonomía	31
4.3.3.2. Descripción	31
4.3.3.3. Composición química	31
4.3.3.4. Relevancia científica	32
V. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	33
5.1. Objetivo general	33
5.2. Objetivos específicos	33
5.3. Hipótesis	34
VI. MATERIAL Y MÉTODO	35
6.1. Enfoque y alcance	35
6.2. Diseño general	35
6.3. Universo, población y muestra	35
6.4. Fuente/s de información	39
6.5. Instrumentos de recolección de datos	40
6.6. Consideraciones éticas	40

6.7. MATERIALES	41
6.7.1. Material vegetal	41
6.7.2. Insumos	42
6.7.3. Equipos	43
6.7.4. Software	43
6.7.4.1. Software GEN5 BioTek	43
6.7.4.2. ChemSketch	44
6.7.4.3. SigmaPlot 12.5	44
6.7.5. Reactivos	44
6.8. MÉTODOS	45
6.8.1. Extracción del aceite	45
6.8.2. Método de difusión en agar con sacabocado con técnica Vicent & Vicent	47
6.8.3. Ensayo con método de sulforodamina B	48
VII. RESULTADOS	49
7.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>F. imbricata</i>	49
7.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>M. exsucca</i>	51
7.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>P. boldus</i>	53
7.4. ENSAYO DE ACEITES ESENCIALES EN CÁNDIDAS	55
7.4.1. <i>Fabiana imbricata</i>	55
7.4.2. <i>Myrceugenia exsucca</i>	56
7.4.3. <i>Peumus boldus</i>	57
7.4.4. Análisis de datos	58
7.4.4.1. Análisis de actividad antifúngica de AE de <i>F. imbricata</i> , <i>M. exsucca</i> y <i>P. boldus</i>	58
7.5. ENSAYO DE ACEITES ESENCIALES EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA	59
7.5.1. MCF-7	59

7.5.2. MCF-10	60
7.5.3. MDA-MB-231	61
7.5.4. Análisis de datos	62
7.5.4.1. Análisis de actividad citotóxica de los AE de <i>F. imbricata</i> , <i>M. exsucca</i> y <i>P. Boldus</i>	63
VIII. DISCUSIÓN Y RESULTADOS	64
8.1. DISCUSIÓN	64
8.2. CONCLUSIÓN	66
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
X. ANEXOS	76
ANEXO 1: CROMATOGRAMA ACEITE ESENCIAL <i>F. imbricata</i>	76
ANEXO 2: CROMATOGRAMA ACEITE ESENCIAL <i>M. exsucca</i>	76
ANEXO 3: CROMATOGRAMA ACEITE ESENCIAL <i>P. boldus</i>	77

ÍNDICE TABLAS Y FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1: Infección por candida en zona axilar.	16
Figura 2: Candidiasis vaginal	16
Figura 3: Candidiasis de pene	17
Figura 4: Candidiasis oral	17
Figura 5: Queilitis angular	17
Figura 6: Paroniquia por candida	18
Figura 7: Candidiasis en nariz	18
Figura 8: Pezón invertido	24
Figura 9: Cáncer de mama inflamatorio	24
Figura 10: <i>Fabiana imbricata</i>	27
Figura 11: Compuestos presentes en el aceite esencial de <i>F. imbricata</i>	28
Figura 12: <i>Myrceugenia exsucca</i>	29
Figura 13: Compuestos presentes en el aceite esencial de <i>M. exsucca</i>	30
Figura 14: <i>Peumus Boldus</i>	31
Figura 15: Compuestos presentes en el aceite esencial de <i>P. boldus</i>	32
Figura 16: Cima cerro las Vizcachas	41
Figura 17: Muestra de <i>F. imbricata</i> recién extraída	41
Figura 18: Hojas de <i>P. boldus</i>	45
Figura 19: Aparato de hidrodestilación tipo Clevenger	45
Figura 20: Aceite concentrado en trampa tipo Clevenger	46

Figura 21: Aceites almacenados en viales	46
Figura 22: Tabla de componentes químicos del aceite esencial de <i>F. imbricata</i>	49
Figura 23: Modelos químicos de compuestos presentes en el aceite esencial de <i>F. imbricata</i>	50
Figura 24: Tabla de componentes químicos del aceite esencial de <i>M. exsucca</i>	51
Figura 25: Modelos químicos de compuestos presentes en el aceite esencial de <i>M. exsucca</i>	52
Figura 26: Tabla de componentes químicos del aceite esencial de <i>P. boldus</i>	53
Figura 27: Modelos químicos de compuestos presentes en el aceite esencial de <i>P. boldus</i>	54
Figura 28: Ensayos en candidas con aceite esencial de <i>F. imbricata</i>	55
Figura 29: Ensayos en candidas con aceite esencial de <i>M. exsucca</i>	56
Figura 30: Ensayos en candidas con aceite esencial de <i>P. boldus</i>	57
Figura 31: Tabla de actividad presentada en cada tipo de candida frente a los distintos aceites estudiados	58
Figura 32: Ensayos en línea celular MCF-7 de cáncer de mama	59
Figura 33: Ensayos en línea celular MCF-10 de cáncer de mama	60
Figura 34: Ensayos en línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama	61
Figura 35: Tabla de actividad presentada en cada línea celular de cáncer de mama frente a los distintos aceites estudiados	62
Figura 36: Tabla de interpretación de parámetros de actividad en líneas celulares de cáncer de mama	62

RESUMEN

El cáncer de mamas constituye la primera causa de muerte de mujeres en Chile, por lo que se considera un gran problema para la salud pública, ya que se espera que sus cifras sigan en aumento. Por otro lado, se encuentra la *candida*, un tipo de hongo muy común en el ser humano. El tratamiento de estas patologías generalmente es farmacológico lo que resulta ser muy invasivo. Por lo que se espera lograr mediante tres aceites esenciales (*F. imbricata*, *M. exsucca* y *P. boldus*), un tratamiento alternativo y/o complementario.

La metodología para extraer los componentes activos de los materiales vegetales fue mediante aceites esenciales, los cuales se obtuvieron mediante el método de hidrodestilación en aparato tipo Clevenger.

Estos aceites presentan principalmente propiedades antifúngicas y antioxidantes, es por esto que se analizan en células neoplásicas de mamas (MCF-7, MCF-10 Y MDA-MB-231) y cinco tipos de *candida* (*C. albicans*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*).

Con la obtención de los resultados se evidenció que *P. boldus* presentó una alta capacidad antifúngica, generando actividad en los cinco tipos de *candida*. Mientras que *F. imbricata* solo presentó actividad en *C. guilliermondii* Y *M. exsucca* no generó ningún tipo de actividad en las *candidas* estudiadas.

Además, se demostró actividad citotóxica por parte de los 3 aceites frente a las líneas celulares estudiadas, siendo *M. exsucca* quien presentó mayor actividad frente a MCF-7 y MDA-MB-231; y *P. boldus* frente a MCF-10.

Palabras claves: *Candida*, cáncer de mamas, *Fabiana imbricata*, *Myrceugenia exsucca*, *Peumus boldus*.

I. INTRODUCCIÓN

La palabra fitoterapia es utilizada para designar la utilización de las plantas medicinales con fines terapéuticos [1]. Si bien la Organización Mundial de la Salud (OMS) valida el uso de estas terapias tanto en el tratamiento, la prevención y la cura de enfermedades, además de tener una relevancia económica importante, aún no se logra armonizar del todo con la medicina convencional. En Chile aún existe una falencia en cuanto a las publicaciones sobre medicina alternativa por parte del Ministerio de Salud, quien llamó a una licitación pública recién en el año 2007. El Estudio “Evaluación de Terapias Complementarias o Alternativas en el Sistema Público de Salud” fue realizado por la Corporación Centro de Estudios para la Calidad de Vida (CECV) respondiendo a una convocatoria de Ministerio de Salud de Chile [2]. Es importante indagar actualmente en el uso de terapias complementarias debido a la intensificación de la demanda. Según estadísticas del Ministerio de salud de Chile en el año 2012, el 55 % de la población accede a este tipo de medicina, por lo que cobra relevancia proporcionar el acceso a una atención regulada, segura, eficiente y de calidad.

Es importante recordar que las plantas medicinales fueron parte de la terapia en todos los países hasta principios del siglo XX, sin embargo, con el progresivo desarrollo científico y conocimiento químico de los metabolitos, se favoreció la entrada masiva en el mercado terapéutico de componentes obtenidos sintéticamente [3], ya no siendo la medicina natural la primera opción para el tratamiento de patologías. Sin embargo, hace aproximadamente 35 años se ha reconsiderado el estudio y uso de plantas medicinales con este objetivo, y junto con esto ha resurgido la necesidad de buscar alternativas con actividad farmacológica, dado la gran cantidad de efectos adversos que proporcionan los componentes sintéticos.

Presentamos esta propuesta de investigación en busca de una fitoterapia que pueda paliar el tratamiento con una opción más amigable para el usuario, frente a las infecciones causadas por candida y frente al cáncer de mamas. Desde nuestro rol en la matronería nos

toca observar cómo ha ido en incremento el número de personas afectadas por estas patologías, y el cómo someterse a los métodos establecidos por la medicina tradicional conlleva a ser un proceso difícil y doloroso, el cual está seguido de una serie de reacciones adversas.

II. ABREVIATURAS

AE: Aceite esencial

TR: Tiempo de reacción

OMS: Organización Mundial de la Salud

GC: Cromatografía de gases

MS: Espectrometría

DMSO: Dimetilsulfóxido

ATCC: American Type Culture Collection

III. GLOSARIO

Antimicótico: Tipo de sustancia que posee la capacidad de evitar la proliferación de algunos tipos de hongos o incluso de provocar su muerte.

Fitoterapia: Consiste en el uso de productos de origen vegetal para la prevención, tratamiento de síntomas y enfermedades. Siendo parte de las opciones de terapia natural.

Fitopatógeno: Se denomina de esta manera a un organismo que es capaz de producir alguna patología en las plantas,

Inflorescencia: Conjunto de flores que nacen agrupadas de un mismo tallo.

IV. MARCO TEÓRICO

4.1. LEVADURAS

4.1.1 Definición

Las levaduras son hongos que forman sobre los medios de cultivo colonias pastosas, constituidas en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoides o alargadas. Unas pocas presentan hifas. Las dimensiones pueden oscilar de 1 a 9 μm de ancho y 2 a más de 20 μm de longitud según la especie, nutrición, edad y otros factores [4]. Algunos hongos fitopatógenos forman colonias levaduriformes en cultivos axénicos y varios patógenos de animales se presentan como levaduras en los materiales clínicos.

Las levaduras se clasifican en base a sus caracteres morfológicos, aunque para algunos microbiólogos, sus propiedades fisiológicas tienen mayor importancia. La mayoría de las levaduras son hongos unicelulares sencillos microscópicos, la mayoría se reproducen asexualmente por gemación, y otras especies lo hacen por fisión múltiple. Las levaduras que pueden reproducirse sexualmente se conocen como “verdaderas”, este proceso implica la formación de ascosporas, sirviendo la propia levadura como asca, de aquí que ellas se clasifican como Ascomycetos; por el contrario, las “falsas” que no producen ascosporas, pertenecen a los hongos imperfectos [5].

La candidiasis es una infección causada por una levadura del tipo *Candida*, la que reside normalmente en la boca, en el tracto digestivo y en la vagina, y no suele causar ninguna lesión. Bajo ciertas condiciones, sin embargo, *Candida* infecta las membranas mucosas y las zonas húmedas de la piel [6]. Las zonas características de infección son el revestimiento de la boca, las ingles, las axilas, los espacios entre los dedos de las manos y de los pies, el pene sin circuncidar, la piel de debajo de las mamas, las uñas y los pliegues de la piel del

estómago, en algunos casos aislados, *Candida* invade los tejidos más profundos, así como la sangre, generando una candidiasis sistémica que puede ser mortal [6].

4.1.2 Manifestaciones clínicas:

Los síntomas de la candidiasis varían según la localización de la infección.

- Las infecciones en los pliegues cutáneos (infecciones intertriginosas) o en el ombligo suelen causar una erupción en la piel de color rojo intenso, en ocasiones con estrías. Pueden aparecer pequeñas pústulas, especialmente en los bordes de la erupción, y esta puede ir acompañada de prurito intenso o quemazón (**ver Figura 1**). La erupción producida por la candidiasis alrededor del ano puede ser pruriginosa, dejar la zona en carne viva y presentar un aspecto blanquecino o rojizo. Los lactantes pueden desarrollar una erupción por *candida* en la zona del pañal (dermatitis del pañal).



Figura 1: Infección por candida en zona axilar

- La candidiasis vaginal (vulvovaginitis) es frecuente, en especial en las mujeres embarazadas, las diabéticas y las que toman antibióticos. Los síntomas de estas infecciones incluyen un flujo vaginal blanco o amarillento y espeso, sensación de quemazón, prurito y enrojecimiento de las paredes (**ver Figura 2**) y del área externa de la vagina.



Figura 2: candidiasis vaginal

- La candidiasis del pene afecta con mayor frecuencia a los hombres que padecen diabetes, a los no circuncidados y a aquellos cuya pareja sexual femenina tiene candidiasis vaginal. A veces la infección no causa síntomas, pero habitualmente produce una erupción rojiza, en carne viva, prurito, quemazón o incluso una erupción dolorosa en el glande (**ver Figura 3**).



Figura 3: candidiasis de pene

- El muguet es una candidiasis que se produce dentro de la boca (candidiasis oral). Las placas color crema típicas del muguet se adhieren a la lengua y a ambos lados de la boca, y suelen ser dolorosas (**ver Figura 4**). Estas placas pueden rasparse con un dedo o con un objeto romo, y es posible que sangren tras el raspado. El muguet no es infrecuente en los niños por lo demás sanos, pero en los adultos puede ser una señal de un sistema inmunitario debilitado, posiblemente debido a un cáncer, diabetes o infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El uso de antibióticos que eliminan las bacterias antagonistas aumenta el riesgo de contraer muguet.



Figura 4: candidiasis oral

- La queilitis angular (boquera, perleche) es una candidiasis en las comisuras de la boca, que causa fisuras y pequeños cortes (**ver Figura 5**). Puede aparecer por un lamido constante de los labios, succión de los dedos, dentaduras mal ajustadas o cualquier otra situación que haga que las comisuras de la boca estén lo suficientemente húmedas como para que proliferen las levaduras.



Figura 5: queilitis angular

- La paroniquia por *candida* es la candidiasis de los pliegues o cutículas de las uñas, que produce un enrojecimiento doloroso e inflamación alrededor de las uñas (**ver Figura 6**). En infecciones persistentes, el área debajo de la uña se vuelve blanca o amarilla, y la placa ungueal se separa del lecho de la uña (onicolisis). Este trastorno es común en las personas con diabetes o con un sistema inmunitario debilitado, y en aquellas cuyas manos están sometidas a una humedad constante o se lavan con frecuencia.



Figura 6: paroniquia por candida

- La candidiasis mucocutánea crónica causa áreas rojas y llenas de pus, con costra y engrosadas que parecen psoriasis, especialmente en la nariz (**ver Figura 7**) y la frente. Las personas que la padecen también son más propensas al muguet [6].



Figura 7: candidiasis en nariz

4.1.3 Diagnóstico:

Por lo general, la candidiasis se identifica al observar la erupción característica o el residuo espeso, blanco y pastoso que genera. Para confirmar el diagnóstico de candidiasis, puede hacerse un raspado de la piel lesionada o del residuo con un escalpelo o un depresor de lengua. La muestra de raspado se examina posteriormente con el microscopio o se coloca en un medio de cultivo para identificar el hongo específico [6].

4.1.4 Tratamiento:

Normalmente, el tratamiento de la candidiasis depende de la ubicación de la infección.

- Las infecciones de los pliegues cutáneos se tratan con cremas, polvos, soluciones u otros productos antimicóticos que se aplican directamente en la piel (tópicos). Algunos ejemplos son el miconazol, el clotrimazol, el oxiconazol, el ketoconazol, el econazol, el ciclopirox y la nistatina. En las personas sanas, por lo general las infecciones de los pliegues cutáneos se curan con facilidad. Mantener la piel seca contribuye a eliminar la infección y previene su reaparición. Las soluciones que secan la piel (como la solución de Burow) o los antitranspirantes de uso tópico ayudan a mantener seca la superficie de la zona, lo cual también evita las recurrencias. Pueden administrarse medicamentos por vía oral (como el fluconazol) en caso de que sean muchos los pliegues cutáneos infectados.
- La candidiasis vaginal se trata con antimicóticos que se aplican en forma de crema sobre la zona afectada, dentro de la vagina en forma de óvulo, o por vía oral (como el fluconazol).
- La dermatitis del pañal se trata con cambios más frecuentes de pañales, uso de pañales superabsorbentes o ultra absorbentes, y la aplicación de una crema con un fármaco antimicótico (por ejemplo, butoconazol, clotrimazol, fluconazol, ketoconazol o miconazol).
- La paroniquia candidiásica se trata evitando la humedad en la zona. Se administran fármacos antimicóticos por vía oral o por vía tópica. Estas infecciones son difíciles de tratar.

- El muguet en los adultos se trata con fármacos directamente en la boca. Se administra un antimicótico (como clotrimazol) en forma de comprimidos o pastillas para disolver en la boca. También pueden hacerse gárgaras con nistatina líquida durante el mayor tiempo posible y luego escupirla o tragársela. También pueden administrarse medicamentos en forma de pastillas para tragar (como fluconazol). El muguet en los lactantes se trata con nistatina líquida, que puede aplicarse con el dedo o con un algodón en la parte interna de las mejillas.
- La candidiasis mucocutánea crónica se trata con fluconazol por vía oral. Este medicamento se administra durante un periodo de tiempo prolongado [6].

4.1.5 Tratamiento complementario:

Se han descrito distintas terapias no farmacológicas para el tratamiento de la *candida*, como por ejemplo yogurt (*lactobacillus acidophilus*) vía oral o intravaginal, probióticos (*lactobacillus fermentum*, GR-1, RC-14) vía oral, ácido bórico tópico, extractos de ajo vía oral, entre otros [7]. Sin embargo, no se ha demostrado que ningún tratamiento complementario trate las infecciones vaginales por hongos. Algunas terapias complementarias y alternativas pueden aliviar los síntomas cuando se combinan con la atención del médico [8].

4.1.6 Tipos de cándidas estudiadas:

4.1.6.1 *Candida albicans*: se considera un comensal oportunista que existe como parte de la microbiota del área mucocutánea, gastrointestinal y genitourinaria en el ser humano sano, y coloniza las membranas mucosas en el 30 a 60 % de las personas. Bajo ciertas condiciones y en el hospedero susceptible, es capaz de causar infecciones superficiales y sistémicas, siendo el hongo patógeno principal del ser humano [9].

4.1.6.2 *Candida lusitanae*: es un hongo con baja incidencia de infección en personas inmunocompetentes y suele ser un patógeno oportunista en huéspedes inmunocomprometidos [10]. Esta levadura es generalmente resistente a la anfotericina B, por lo tanto, puede presentar dificultades en su tratamiento. Es tipo de hongo puede ser confundido erróneamente con otras especies como *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e incluso *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1.6.3 *Candida parapsilosis*: es un importante patógeno humano que ha aumentado dramáticamente en las últimas dos décadas, siendo ahora una de las principales causas de enfermedad invasiva por *candida* [11]. Las personas con mayor riesgo de infección son neonatos y usuarios en cuidados intensivos, se asocia principalmente a hiperalimentación, prótesis y catéteres permanentes, así como también la propagación de la enfermedad a través del equipo de salud.

4.1.6.4 *Candida guilliermondii*: es causante de 0,7% de las candidiasis a nivel mundial y 3,7% en Latinoamérica [12]. Es parte de la flora normal de la piel y mucosa humana. Es una especie poco común de *candida* que se asocia con mayor frecuencia a onicomicosis y rara vez se ve como una causa de infección micótica invasiva. Se caracteriza por una susceptibilidad disminuida a los azoles y equinocandinas y se ha informado principalmente como una causa de candidemia en pacientes con cáncer [13] y en las últimas dos décadas las infecciones han aumentado significativamente en pacientes inmunocomprometidos y pediátricos[14].

4.1.6.5 *Candida tropicalis*: ha sido identificada como la especie de levadura patógena más prevalente del grupo no albicans. Las infecciones debidas a *candida tropicalis* se han incrementado dramáticamente a escala global, proclamando así que este organismo es una levadura patógena emergente [15]. Las razones del dominio de este organismo y su resistencia al fluconazol han sido difíciles de dilucidar. Además, queda por aclarar el mecanismo de la patogenicidad de este organismo y la consiguiente respuesta inmune.

4.2. CÁNCER

4.2.1 Definición

Corresponde al crecimiento anormal y descontrolado de células en el cuerpo, lo cual dificulta su funcionamiento [16]. Existen diferentes tipos de cáncer, todo dependerá del órgano y/o tejido en el cual se inicie, como por ejemplo pulmón, mamas, piel, huesos, entre otros.

Existen múltiples factores de riesgo para la aparición del cáncer como la exposición al benceno y otros químicos, consumo excesivo de alcohol, problemas genéticos, obesidad, exposición a la radiación, pero, sin embargo, la causa de muchos cánceres es desconocida [16].

Actualmente el cáncer se ha convertido en una de las principales causas de muerte en todo el mundo. En el 2016 constituyó el 16% del total de muertes a nivel mundial, se espera que, al no existir una mejora en el control sustancial del cáncer, la cifra de defunciones aumente considerablemente, aumentando a 13,1 millones de muertes a nivel mundial al año 2030 [17]. En Chile, constituye la segunda causa de muerte de la población, luego de las relacionadas con el sistema circulatorio. En cuanto a las proyecciones de mortalidad, cada año mueren más personas por cáncer y se espera que para el 2023 sea la primera causa de muerte en el país [17].

Entre los tipos de cánceres más comunes se encuentra el de estómago en hombres, con 2.247 muertes (25,2 por cada 100.000 habitantes), y en el caso de las mujeres el de mamas, con 1.511 muertes (16,6 por cada 100.000 habitantes) [17].

Debido a la alta incidencia y al alto índice de mortalidad es que se decide experimentar un tratamiento no farmacológico complementario para el cáncer de mama.

CÁNCER DE MAMA

El cáncer de mama es considerado uno de los principales problemas de salud pública en el mundo según la OMS y constituye la primera causa de muerte en la mujer en Chile [18]. Es una enfermedad que consiste en el crecimiento anormal y desordenado de células del epitelio de los conductos o lobulillos mamarios y que tiene la capacidad de diseminarse.

4.2.2 Manifestaciones clínicas:

Se debe sospechar de cualquier cambio en el tamaño, forma o coloración de la mama. Un bulto que se palpa como un nudo firme o un engrosamiento de la mama o la zona axilar; secreción en el pezón que se produce de forma repentina, que contenga sangre o se produzca solo en una mama; pezón invertido (**ver Figura 8**) o llagas en la forma del pezón; irritación en la piel o cambios como rugosidades, hoyuelos, escamosidad o pliegues nuevos; mamas tibias, enrojecidas e hinchadas (**ver Figura 9**), con o sin erupción cutánea similar a la de una naranja; dolor en la mama que no desaparece [19].



Figura 8: pezón invertido



Figura 9: cáncer de mama inflamatorio

4.2.3 Diagnóstico:

La confirmación diagnóstica se realiza mediante estudios de imagen como ecotomografía mamaria y mamografía.

4.2.4 Tratamiento:

El tratamiento del cáncer de mama depende del tipo y el grado de diseminación del cáncer, las personas a menudo reciben más de un tratamiento que puede variar entre: cirugía, donde se retiran los tejidos con cáncer; quimioterapia, donde se utilizan medicamentos especiales para reducir o matar las células cancerígenas; terapia hormonal, que impide que las células cancerígenas obtengan las hormonas que necesitan para desarrollarse; terapia biológica, que trabaja con el sistema inmunitario para ayudarlo a combatir las células cancerígenas; y radioterapia, donde se utilizar rayos de alta energía para eliminar las células cancerosas [20].

4.2.5 Tratamiento complementario:

No se ha comprobado qué tratamientos oncológicos alternativos curen el cáncer, sin embargo, puede ayudar para afrontar sus efectos secundarios como fatiga, náuseas y dolor. Entre algunas de estas terapias alternativas, se encuentra la acupuntura, hipnosis, masajes, meditación, técnicas de relajación y yoga [21].

Según estudios existen algunas plantas conocidas popularmente como medicinales, las cuales han presentado una actividad y son útiles en la prevención y tratamiento de cánceres, como las siguientes:

- *Artemisia annua* (*ajenjo dulce*): induce la apoptosis de células de cáncer de mamas.
- *Glycyrrhiza glabra* (*regaliz*): actúa suprimiendo la proliferación de células de cáncer de mamas.
- *Cúrcuma longa* (*cúrcuma*): ha demostrado ser eficaz para la prevención del cáncer de mamas.
- *Púnica Granatum* (*granado*): se ha empleado para evitar metástasis y progresión de cáncer de mamas [21].

Según lo expuesto anteriormente, existe según norma ministerial, la indicación y uso de fármacos y otros procedimientos para el tratamiento específico de cada patología descrita. Pero, es preciso realizar estudios bajo método científico que permitan establecer terapias complementarias eficaces que contribuyan en el tratamiento de las enfermedades mencionadas utilizando fitoterapia. Por otro lado, se pretende que al utilizar métodos fitoterapéuticos disminuyan los efectos adversos y secundarios en las usuarias que prefieran el uso de este tipo de medicina. Con estos antecedentes es que se decide entonces, evaluar la interacción de 3 aceites esenciales en distintas levaduras de tipo *candida* y líneas de células cancerígenas de mamas para verificar la presencia de actividad en éstas.

4.3. POSIBLES TRATAMIENTOS FITOTERAPÉUTICOS A INVESTIGAR

4.3.1. *Fabiana Imbricata* Ruiz & Pav, “Romero Pichi”

4.3.1.1. Taxonomía:

- Orden: Solanales
- Familia: Solanaceae [23]
- Género: *Fabiana*
- Especie: *Fabiana imbricata* Ruiz & Pav
- Sinonimia: *Fabiana imbricata* var. *biflora* y *Fabiana lutescens*.
- Origen: Nativo
- Nombre chileno: pichi, pichi romero, piche palo [24]

4.3.1.2. Descripción:

Fabiana imbricata (ver Figura 10) es un arbusto perenne de hojas imbricadas, que florece de manera abundante en primavera con pequeñas flores tubulares en el extremo de ramillas laterales [25]. Crece desde la región de Coquimbo hasta la de Magallanes [24], en áreas con constantes precipitaciones, los períodos secos cortos son posibles, pero no duran más de un mes [23]; debe estar expuesta al sol con poca sombra brindada por la vegetación cercana.



Figura 10: *Fabiana imbricata*

4.3.1.3. Composición química:

Presencia de sesquiterpeno con murolano y esqueletos amorfano [26]. Propiedades antiinflamatorias por presencia de aceite esencial, flavonoides como quercetina (1) y rutina (2), alcaloides, escopoletina (3), ácido oleanólico (4), antraquinonas (5), etc [27].

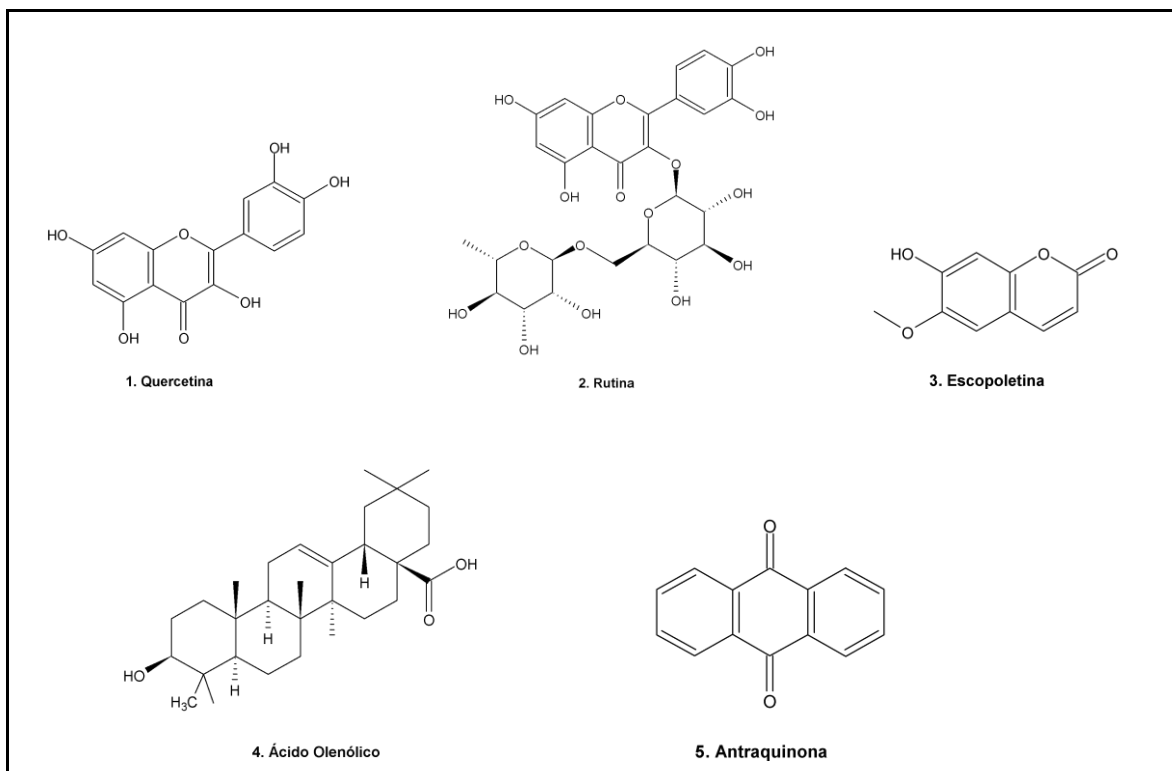


Figura 11. Compuestos presentes en el aceite esencial de *F. imbricata*

4.3.1.4. Relevancia científica:

La parte de la planta utilizada en la medicina popular son los tallos ramosos, su uso se debería a las propiedades antisépticas, diuréticas y digestivas de esta planta [24].

Se emplea principalmente en el tratamiento de afecciones de las vías urinarias (cistitis, uretritis, inflamación de la vejiga) [24].

También se considera de utilidad en las enfermedades del hígado [24].

4.3.2. *Myrceugenia exsucca* (DC.) O. Berg, “Pitra”

4.3.2.1. Taxonomía:

- Orden: Myrtales
- Familia: Myrtaceae
- Género: *Myrceugenia*
- Especie: *exsucca*
- Sinonimia: *Eugenia exsucca* DC -*Eugenia corralensis* Phil.
- Origen: Nativo
- Nombre chileno: Pitra, Pitrilla, Patagua, Petra [28]

4.3.2.2. Descripción:

Myrceugenia exsucca (ver Figura 12) es un árbol endémico que encontramos en Chile, entre las regiones de Coquimbo y Aysén, además puede ser hallada en Argentina. Este árbol se caracteriza por sus hojas verdes perennes; Inflorescencias de unas 10 flores en cada una de ellas. tronco con grandes ondulaciones verticales en su corteza y tiene una altura de 15 metros, crece en zonas de gran humedad y tiene la particularidad de desarrollarse en ambiente inundados sin que esto le afecte. Sabemos que posee propiedades medicinales tanto en sus hojas como en la corteza [29].



Figura 12: *Myrceugenia exsucca*

4-3.2.3. Composición química:

Contiene taninos, lo que confirma su uso como astringente y vulnerario; se detectan también resinas, aceites esenciales, flavonoides, quercetina, etc. [30]

M. exsucca contiene varios aceites esenciales, por ejemplo, el compuesto sulfúrico dimetil sulfuro (1), el fenilpropanoide cinamaldehído (2), los monoterpenos linalol (3), limoneno (4), borneol (5), el alcanal aldehído butírico. Las hojas se emplean contra reumatismo y enfermedades cutáneas [31].

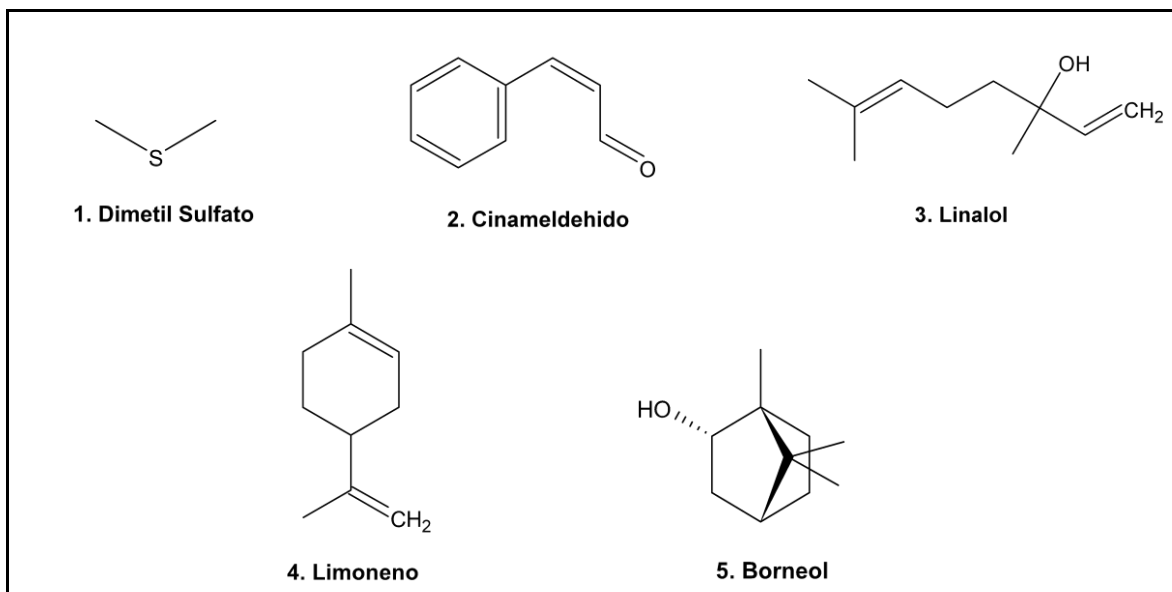


Figura 13. Compuestos presentes en el aceite esencial de *M. exsucca*

4.3.2.4. Relevancia Científica:

Se ha comprobado que los aceites y extractos pertenecientes al género *Myrceugenia*, poseen propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antinociceptivas, antiprotozoarias, antioxidantes y citotóxicas. Además, popularmente se le otorga un uso terapéutico; vulnerario, afecciones cutáneas, reuma, disentería, además de ser diaforético, diurético, estomacal y digestivo.

4.3.3. *Peumus boldus* Molina, “Boldo”

4.3.3.1 Taxonomía:

- Orden: Laurales
- Familia: Monimiaceae
- Género: *Peumus*
- Especie: *Peumus boldus* Molina
- Sinonimia: *Boldea boldus* (Molina) Looser
- Origen: Nativo
- Nombre chileno: Boldo [32]

4.3.3.2 Descripción:

Peumus boldus (ver Figura 14) es un árbol o arbusto dioico, de hasta 20 m. de altura, tronco corto con copa redondeada y frondosa, muy aromático. Hojas siempre verdes de 3-7 cm de largo por 1-5 cm de ancho, subsésiles, opuestas, coriáceas, enteras, aovadas u oblongas. Inflorescencias en racimos cortos. Flores de 5-10 mm de diámetro. Fruto en drupa desnuda en el fondo del perigonio caduco, 5-7 mm de largo, carnoso, comestible y muy dulce cuando está maduro [33].



Figura 14: *Peumus boldus*

4.3.3.3 Composición química:

Presenta alcaloides benciltetrahidroisoquinoleínicos con núcleo aporfinoide (0,2-0,5%), siendo el mayoritario la boldina (1) [34].

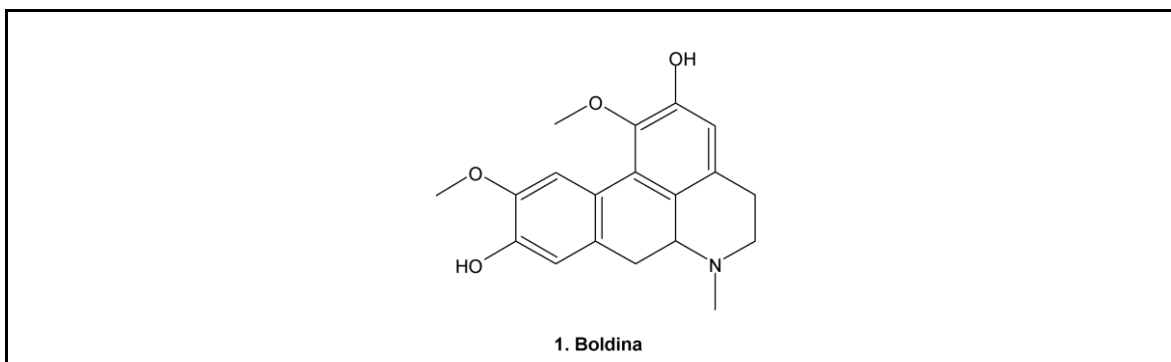


Figura 15. Compuesto presente en el aceite esencial de *P. boldus*

4.3.3.4 Relevancia científica:

Esta planta se ha presentado principalmente en el uso medicinal. Sus hojas se han utilizado para trastornos digestivos y hepáticos, además de afecciones renales: se considera que disuelve los cálculos renales y biliares. También es utilizada como estimulante y sedante nervioso [33].

No se recomienda su administración oral durante el embarazo ni en niños menores de 10 años. No se debe usar por periodos prolongados de tiempo ni infusiones demasiado concentradas. En pacientes con cálculos renales usar sólo bajo vigilancia médica. Estos productos tienen el carácter de auxiliares sintomáticos y no reemplazan lo indicado por el médico en el tratamiento de una enfermedad [33].

La boldina principal componente activo del boldo tiene propiedades hepatoprotectoras, antiinflamatorias, antioxidantes, coleréticas, gastro estimulantes, relajante muscular e inmunomoduladoras. En dosis altas tiene efecto hipnótico, convulsivante y abortivo [34].

V. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

5.1. Objetivo General:

Identificar y evaluar la actividad antifúngica y citotóxica de los aceites esenciales obtenidos desde *F. imbricata* “Romero Pichi”, *M. exsucca* “Pitra” y *P. boldus* “Boldo”.

5.2. Objetivos Específicos

1. Realizar estudios en herbolaria, para generar conocimiento sobre las propiedades de las plantas estudiadas.
2. Evaluar la actividad citotóxica y antioxidante de los aceites esenciales mencionados frente a células neoplásicas mamarias.
3. Evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales mencionados frente a las distintas especies de *Candida* estudiadas (*candida albicans*, *tropicalis*, *guilliermondii*, *parapsilosis* y *lusitaniae*).
4. Comparar la capacidad citotóxica y antioxidante entre los distintos aceites estudiados adquiridos desde *P. boldus*, *F. Imbricata* y *M. exsucca* (DC.).
5. Comparar la capacidad antifúngica entre los distintos aceites estudiados adquiridos desde *P. boldus*, *F. imbricata* y *M. exsucca* (DC.).
6. Comparar la capacidad antifúngica en las distintas especies de *Candida* estudiadas, probada frente a los distintos aceites trabajados obtenidos desde *P. boldus*, *F. imbricata* y *M. exsucca* (DC.).
7. Comparar el manejo farmacológico entre distintas patologías vulvares.

5.3. Hipótesis

Basado en los antecedentes bibliográficos expuestos, la hipótesis que sustenta la investigación es la siguiente:

Los aceites esenciales de *Peumus boldus* Molina, *Fabiana Imbricata* Ruiz & Pav y *Myrceugenia exsucca* (DC.) O. Berg. tienen efecto antifúngico y citotóxico sobre *Candida albicans*, *Candida lusitaniae*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis* y células neoplásicas mamarias.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. Enfoque y Alcance

El presente estudio tiene un enfoque cuantitativo ya que es de carácter experimental y posee un alcance correlacional ya que estamos frente a la relación de información entre diversas variables , lo que nos permite predecir un futuro comportamiento de estas.

6.2. Diseño general

El estudio que estamos presentando es de modalidad experimental correlacional según el método de clasificación de Hernández Sampieri, en vista a que en este se establece tanto variables independientes (tiempo) como dependientes (viabilidad celular, número de colonias, cantidad de AE, tipo de AE) y estas se relacionan como causa-efecto, asimismo de ser manipulables para descubrir lo que se investiga. El estudio es considerado también un ensayo controlado.

6.3. Universo, Población y Muestra

6.3.1. Universo

6.3.1.1. Hongos: Se incluye aquellos hongos pertenecientes al género de *Cándida* de las cepas; *albicans*, *tropicalis*, *guilliermondii*, *parapsilosis* y *lusitaniae*.

6.3.1.2. Células: Fueron incluidas aquellas células pertenecientes a las líneas celulares neoplásicas de mama; MCF-7, MCF-10, MDA-MB-231.

6.3.2. Población

6.3.2.1. Hongos

Cada cepa se cultivó en una placa Petri con 10 mL de Sabouraud Dextrosa con técnica de siembra por estriado, manteniendo el cultivo en incubadora por 48 hrs a 37 °C antes de ser utilizadas. Posterior a la incubación, se extrajeron colonias o microcolonias de la cepa con un hisopo estéril, luego se dispuso de un tubo de fondo cónico con 10 mL de agua destilada estéril en donde fueron inoculadas las colonias.

6.3.2.2. Células

Para el estudio se utilizaron líneas celulares neoplásicas estándar de códigos; MCF-7, MCF-10, MDA-MB-231 provenientes de American Type Culture Collection, organización sin fines de lucro que recolecta almacena y distribuye microorganismos de referencia estándar, líneas celulares y otros materiales para investigación y desarrollo.

Cada línea celular fue cultivada en un placa de micropocillos para cultivo celular de 96 pocillos Corning Costar® en medio, manteniendo estas en incubadora por 24 hrs. A 37 °C antes de ser utilizadas

6.3.3. Muestras

Fueron seleccionadas las cepas del tipo:

- *C. albicans* (ATCC 7978)
- *C. tropicalis* (9641)
- *C. guilliermondii* (2204)
- *C. parapsilosis* (ATCC 22019)
- *C. lusitaniae* (2305)

Fueron seleccionadas las cepas del tipo:

- Neoplásicas de mama MCF-7
- Neoplásicas de mama MCF-10
- Neoplásicas de mama MDA-MB-231

6.3.4. Mecanismo de determinación de muestra

6.3.4.1. Inclusión

Hongos:

- Muestra de cepas *C. albicans*
- Muestra de cepas *C. tropicalis*
- Muestra de cepas *C. guilliermondii*
- Muestra de cepas *C. parapsilosis*
- Muestra de cepas *C. Lusitaniae*
- Muestra de referencia
- Conservación de las cepas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* y *C. lusitaniae* en agua destilada estéril.
- Conservación a temperatura de 4 °C

- Cultivado en agar Sabouraud Dextrosa

Células:

- Muestras de células MCF-7
- Muestras de células MCF-10
- Muestras de células MDA-MB-231
- Muestra de referencia
- Muestra celular conservada en BRMI
- Conservación a temperatura de 37 °C
- Cultivadas en medio dmem alto o bajo en glucosa según requerimiento complementados con suero de bovino fetal

6.3.4.2.Exclusión

Hongos:

- Muestra diferente a las cepas *C. albicans*
- Muestra diferente a las cepas *C. tropicalis*
- Muestra diferente a las cepas *C. guilliermondii*
- Muestra diferente a las cepas *C. parapsilosis*
- Muestra diferente a las cepas *C. lusitaniae*
- Muestra de cepa contaminadas previo al experimento
- Muestra obtenida de manera clínica
- Cepas no conservadas en agua destilada estéril.
- Cepas conservadas a una temperatura distinta de 4 °C
- Cultivado en un agar distinto de Sabouraud Dextrosa

Células:

- Muestras de líneas celulares distintas a MCF-7
- Muestras de líneas celulares distintas a MCF-10
- Muestras de líneas celulares distintas a MDA-MB-231
- Muestra de celulares contaminadas previo al experimento
- Muestra obtenida de manera clínica
- Líneas celulares no conservadas en BRMI
- Líneas celulares conservadas a una temperatura distinta de 37 °C
- Líneas celulares cultivadas en un medio distinto dmem alto o bajo en glucosa según requerimiento complementados con suero de bovino fetal

6.4. Fuente/s de Información**6.4.1. Unidad de estudio o análisis****6.4.1.1. Hongos**

Son las Placas de Petri de 100 mm en las cuales se encuentran los cultivos de las cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* y *C.*

6.4.1.2. Células

Son las Placas de micropocillos para cultivo celular de 96 pocillos Corning Costar® en los cuales se encuentran cultivadas las líneas celulares de mama (MCF-7, MCF – 10, MDA – MB – 231).

6.4.2. Unidad informante

Datos obtenidos de cada una de estas placas de Petri definidas como unidad de estudio y análisis.

6.4.3. Unidad referencial

Laboratorio perteneciente al Edificio R3, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, Angamos 665, Viña del Mar y el laboratorio de Productos Naturales y Síntesis Orgánicas perteneciente al Departamento de ciencias, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Playa Ancha, Subida Leopoldo Carvallo 270, Playa Ancha, Valparaíso.

6.5. Instrumento/s de Recolección de Datos

El método de recolección de datos utilizado para la realización del presente estudio fue la experimentación, a través del cual se puede llevar a cabo una observación constante y delicada que se realiza en el fenómeno objeto del estudio. En este caso aplicamos experimentos confirmatorios, con el fin de comprobar o desaprobar la tesis que se plantea originalmente, esto mediante la prueba de la hipótesis que establecimos, además de seguir los métodos y procedimientos requeridos para la experimentación

6.6. Consideraciones Éticas

En esta experiencia no se experimentó con ningún ser vivo de origen animal. Y el material vegetal fue recolectado bajo los cuidados necesarios y sin alterar el crecimiento de árboles ni arbustos.

6.7. MATERIALES

6.7.1. Material vegetal:

El material fue recolectado en dos salidas a terreno. La primera se realizó en Enero del 2019, en el cerro “Las Vizcachas” Olmué (Valparaíso, Chile) a 2.046 metro de altura, donde se obtuvo *F. imbricata*. La segunda salida se realizó en Junio del 2019 en Casablanca (Valparaíso, Chile), lugar donde se recolectó *M. exsucca* y *P. boldus*. Con cada material vegetal obtenido se realizaron aceites esenciales, bajo la técnica de hidrodestilación y fueron analizados por GC-MS.



Figura 16: Cima cerro Las Vizcachas



Figura 17: Muestra de *F. imbricata* recién extraída

6.7.2. Insumos:

- Matraz de Erlenmeyer
- Matraz balón fondo redondo
- Matraz balón fondo redondo doble cuello
- Agua destilada
- Viales
- Frascos reciclados
- Tubos de fondo cónico Biologix[®] de 15 ml
- Botellas de vidrio con tapa Dura Schott[®] de 200, 500 y 1000 mL
- Bisturí n°23 E.D.L.A.B
- Hisopos de Laboratorios estériles
- Tubos para microcentrifuga de 1,5 mL Eppendorf[®]
- Cubetas de cuarzo 1 mL
- Placas de Petri de vidrio 60 y 100 mm
- Micropipeta Biopette[®], modelos p10, p100 y p200
- Papel Parafilm[®] 75m x 5 cm
- Placas de micropocillos para cultivo celular de 96 pocillos Corning Costar[®]
- Guantes de procedimiento de nitrilo Top Glove[®]
- Mascarilla Face Mask[®]
- Alcohol 70%
- Puntas de micropipetas desechables de 10, 100 y 1000 μ L

6.7.3. Equipos

- Hidrodestilador clewenger
- Manta calefactora
- Rotavapor
- Campana extractora de gases
- Autoclave JSAC60®
- Licuadora
- Balanza analítica ML204 Mettler Toledo
- Refrigerador PROGRESS 3100 Fenza®
- Freezer CVU27 Consul®
- Mechero tipo Fisher
- Vortex VELP® Scientifica
- Incubadora FOC 225E VELP® Scientifica
- Lector de microplacas EL808 BIOTEK®
- Espectrofotómetro GENESYS 10 UV Thermo Spectronic®
- Notebook HP 530 (Receptor de las lecturas de absorbencia)

6.7.4. Software

6.7.4.1. Software GEN5 BioTek

Gen5 es un software lector de microplacas y sistemas de capturas de imágenes. Dicho programa es una herramienta integrada que se usa para la recolección y análisis de imágenes y datos, su finalidad es asistir en la recolección de datos, análisis y creación de informes a partir de la información reunida. Este presenta compatibilidad con todos los sistemas de captura de imágenes, lectores multi modales y lectores de absorbancia de BioTek.

6.7.4.2. ChemSketch

ChemSketch es un programa de composición molecular utilizado para crear y modelar estructuras químicas. De la misma manera, este software posibilita visualizar moléculas y modelos moleculares en dos y tres dimensiones, lo que facilita el poder comprender la estructura de los enlaces químicos y la naturaleza de los grupos funcionales.

6.7.4.3 SigmaPlot 12.5

SigmaPlot es un conjunto de software para la realización de gráficos científicos y análisis de datos. El software tiene la capacidad de leer múltiples formatos, como las hojas de cálculo de Microsoft Excel, además este puede realizar transformaciones matemáticas y análisis estadísticos de los datos.

6.7.5. Reactivos

- Acetato de etilo
- Sulfato de sodio anhidro
- DMSO
- Ácido tricloroacético al 50%
- Ácido acético al 1%
- Sulforodamina B
- Tris base

6.8. MÉTODOS

6.8.1. Extracción del aceite:

Las hojas de *F. imbricata*, *M. exsucca* y *P. boldus* (1500 gramos de cada materia vegetal) se aislaron manualmente de las partes aéreas, las cuales fueron utilizadas dentro de la semana siguiente a la recolección para realizar los diferentes aceites esenciales de cada material. En total se elaboraron 3 aceites.



Figura 18: Hojas de *P. boldus*

Para realizar los aceites esenciales se extrajeron y masaron de 500 g de *F. imbricata*, *M. exsucca* y *P. boldus*, los cuales fueron fraccionados, mezclados con 1 litro de agua destilada y posteriormente calentados durante 6 horas por hidrodestilación (3.0 L, H₂O) en un aparato tipo Clevenger (**ver Figura 19**).

Una vez concentrado el aceite en la trampa clevenger (**ver Figura 20**), se retiró de la bureta con ayuda de acetato de etilo y fue colocado en un matraz, donde se desechó la mayor cantidad de agua posible. Se introdujo al matraz Sulfato de Sodio anhidro (Na₂SO₄) con el objetivo de absorber el agua restante en el aceite, formando restos sólidos.

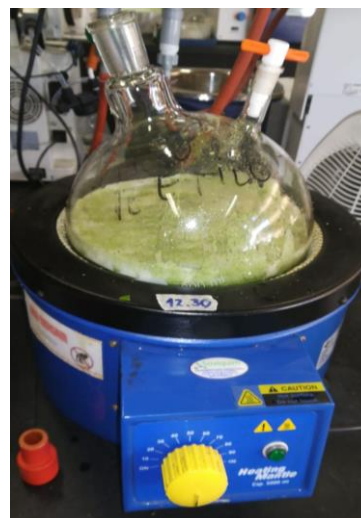


Figura 19: Aparato de hidrodestilación tipo Clevenger

El material obtenido fue introducido en un balón, el cual se llevó al rotavapor a 70 °C y a 240 mbar de presión para concentrar el aceite y extraer su solvente. El aceite obtenido fue colocado, con ayuda de acetato de etilo, en un vial previamente masado (**ver Figura 21**), el cual fue etiquetado y posteriormente forrado con papel de aluminio para prevenir daño en la muestra en caso de que esta fuera fotosensible. Por último, el vial fue colocado bajo una campana, para eliminar por evaporación los restos de acetato que aún están presentes en el aceite. El análisis del componente AE se realizó por cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases / espectrometría de masas (GC / MS) utilizando la instrumentación que se describe a continuación. Las condiciones de funcionamiento fueron las siguientes: inyección en columna; temperatura del inyector, 250 °C; temperatura del detector, 280 °C; gas portador,

He a 1,25 ml / min; programa de temperatura del horno: 40 °C durante 5 min, aumentar a 260 °C a 5 °C / min, y luego 260 °C durante 5 min. La ionización del detector de masas empleó un impacto de electrones de 70 eV. Las condiciones de grabación emplearon un tiempo de exploración de 1,5 s y un rango de masa de 40 a 400 amu. Los compuestos en los cromatogramas se identificaron mediante la comparación de sus espectros de masas con los de la Biblioteca espectral de masas NIST / EPA / NIH (2008), y mediante la comparación de su índice de retención con los informados en la literatura [15], para el mismo tipo de columna o las de normas comerciales (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania) cuando estén disponibles.



Figura 20: Aceite concentrado en trampa tipo Clevenger



Figura 21: Aceites almacenados en viales

6.8.2. Método de difusión en agar con sacabocado con técnica Vicent & Vicent

La técnica de difusión en agar con sacabocado fue creada por James G Vicent y Helen Whitgrove Vicent, esta pareja propuso que las zonas de inhibición obtenidas en los discos son más consistentes y sensibles a las fluctuaciones de concentración de los extractos. Por este motivo, el contacto entre la solución y el agar es más uniforme.

- Objetivo

Determinar el diámetro de la zona de inhibición que se produce en las placas en las que se ha realizado el método utilizando los aceites de *F. imbricata*, *M. exsucca* y *P. boldus*.

- Indicaciones

Técnica simplificada que aproxima un resultado cuantitativo e interpretativo con la concentración mínima inhibitoria. Dependiendo del diámetro de la zona se puede determinar si existe una relación inversa con la concentración inhibitoria máxima.

- Descripción

En placas con agar Sabouraud se inocula *candida albicans*, *candida parapsilosis*, *candida lusitaniae*, *candida tropicalis* y *candida guilliermondii* con tómulas estériles, frotando suavemente en toda la superficie utilizando tres direcciones diferentes. Se dejan secar las placas por 10-15 minutos antes de proceder con la técnica. Con sacabocado estéril se realizan 6 orificios con una separación mínima de 24 mm. Los agujeros formados se rotulan del 1 al 5 y una C. En los agujeros del 1 al 5 se administra de manera creciente el agente antimicrobiano con las medidas de 5, 10, 15, 20 y 25 µl. Se dejarán en incubadora a 37 °C por 24 horas. Por último, se mide el diámetro de inhibición en milímetros.

6.8.3. Ensayo con método de sulforodamina B

Las células se establecieron a 5×10^3 células por pocillo de una microplaca de 96 pocillos de fondo plano. Las células fueron incubadas a 37 °C en una mezcla humidificada al 5% de CO₂ / 95% de aire y tratados con compuestos en diferentes concentraciones durante 72 horas.

Posteriormente, se procedió a disolver cada aceite, 3 en total, en DMSO a concentración 50 g/ml, la cual fue la solución madre (1000x) a partir de la cual se consiguió una solución 0,5 ug/μl que fue la solución de trabajo (10x). Se trabajó con 5 concentraciones diferentes (10, 7.5, 5, 2.5 y 1.25 μM).

A continuación de la exposición a los 3 aceites, las células se fijaron con 50% de ácido tricloroacético a 4 °C por 1 hora. Luego, se lavaron con agua y fueron teñidas con sulforodamina B al 0,1 %. Disuelto en ácido tricloroacético al 1% (50 μl/pocillo) durante 30 minutos, y posteriormente lavado con ácido acético al 1% para eliminar la mancha no unida. La tinción ligada a proteína se solubilizó con 100 μL de 10 nM de tris base no tamponado, y la densidad celular se determinó usando un lector de placas de fluorescencia (longitud de onda 540 nm).

VII. RESULTADOS

7.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *F. imbricata*

N°	Nombre Compuesto	RT* min	RI*	Área %
1	Borneol	15.340	954	0.86
2	Terpinen-4-ol	15.656	919	3.38
3	Terpineol	16.041	919	0.51
4	Cedren	22.156	914	0.74
5	β -Cedreno	22.295	919	3,49
6	Amorfadino	23.372	922	3.84
7	Prezizaen	23.176	906	0.55
8	Benceno	23.819	792	0.55
9	4- (5,5-dimetilspiro [2.5] oct-4-il) -2-butanona	24.309	784	0.90
10	Isoshiobunona	25.727	851	1,50
11	Epóxido de calareno	25.853	773	0.49
12	Cetona de Eremofila	25.955	890	5.30
13	4H-Naphth [1,2-b] oxireno [c] furano	26.349	678	1.20
14	(7a-isopropenil-4,5-dimetiloctahidroinden-4-il) metanol	27.023	785	43,66
15	Guajol	27.343	843	17.02
16	Cedreanol	27.475	809	0.83
17	7- (1-hidroxipropan-2-il) -1,4a-dimetil-2,3,4,4a, 5,6,7,8-octahidronaftalen-2-ol	27.975	741	5.75
18	2,5-dimetil-1-fenilpirrol-3-carbaldehído	28.213	756	0.56
19	Cicloheptano, 1-etenil-1-metil-4-metileno-2- (2-metil-1-propenilo) -	28.999	788	0.41
20	7a-metil-3-propan-2-il-4,5,6,7-tetrahidro-1H-inden-2-ona	29.080	764	2.59
21	10-metil-2,5: decano 3,10-diepoxibiciclo [4.3.1]	29.676	668	0.05
22	4- (2,4-dimetil-ciclohexil) -butan-2-ona	29.747	563	0.01
23	(-) - α -gurjunene	29.798	827	0.92
24	Costol	30.101	837	2.35
25	9H-cicloisolongifoleno, 8-oxo-	30.193	798	0.04
26	14-hidroxi- δ -cadineno	30.318	820	0.64

Figura 22. Tabla de componentes químicos del aceite esencial de *F. imbricata*

Al realizar el análisis de los componentes del aceite esencial de Romero pichi encontramos dentro de sus compuestos mayoritarios; (7a-isopropenil -4,5- dimetiloctahidroinden -4-il) metanol, Guajol, y 7 - (1 - hidroxipropan - 2 - il) - 1, 4a - dimetil - 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 7, 8 - octahidronaftalen - 2 - ol, Cetona de Eremofila. Estos compuestos presentan propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes [35] [36].

Es por las propiedades que presentan los aceites analizados anteriormente, en donde la capacidad antifúngica y antioxidante se repite, esperamos que tengan alguna actividad en los tipos de candida y células de cáncer de mamas estudiadas. Todo esto sustentado por estudios anteriores de dichos compuestos mayoritarios de cada aceite.

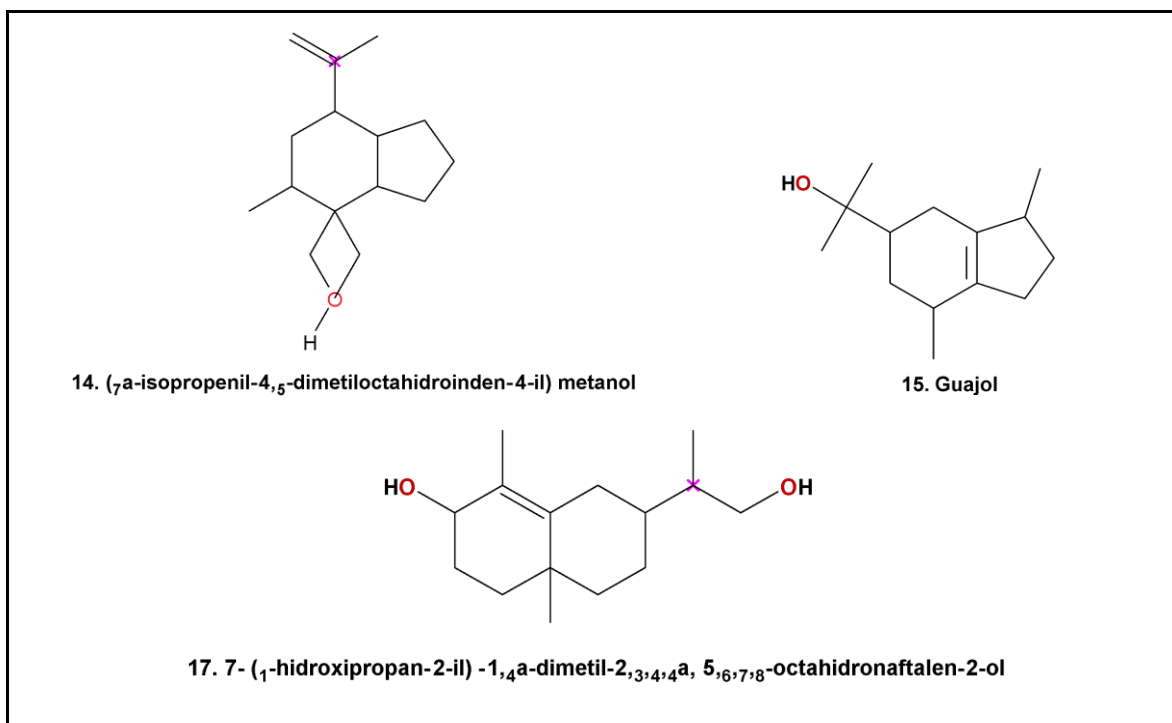


Figura 23. Modelos químicos de compuestos presentes en el aceite esencial de *F. imbricata*

7.2. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *M. exsucca*

N°	Nombre compuesto	TR* min	RI*	Área %
1	α -Pineno	8.375	941	1.12
2	β -Pineno	9.640	928	12.15
3	o-Cimeno	11.062	941	5.15
4	D-Limoneno	11.181	904	2.77
5	?-terpinene	12.092	910	4.81
6	terpinoleno	12.983	932	1.04
7	Linalol	13.320	943	1.20
8	d-Terpinen-4-ol	15.670	917	13.20
9	Terpineol	16.054	901	7.22
10	Cariofileno	22.333	969	6.49
11	Aromadendrene	22.829	939	3.59
12	2-epi-trans-?-cariofileno	23.391	945	1.62
13	viridifloreno	24.231	891	0.84
14	delta-amorfenol	24.884	888	3.51
15	Nerolidol	25.775	971	11.32
16	Ent-Spatulenol	26.950	947	9,36
17	Óxido de cariofileno	26.414	905	10.54
18	(+) - Viridiflorol	26.615	922	1.04
19	Epóxido de humuleno II	27.016	924	0.90
20	Cubenol	27.118	815	0.13
21	Epicubenol	27.407	889	0.97
23	Fitol	36.345	932	1.02

Figura 24. Tabla de componentes químicos del aceite esencial de *M. exsucca*

Al realizar el análisis de los componentes del aceite esencial de Pitra encontramos dentro de sus compuestos mayoritarios; d-Terpinen-4-ol, β -Pineno, Nerolidol, Óxido de cariofileno, Ent-Spatulenol, Terpineol, Cariofileno y o-Cimeno.

Estos componentes presentan una alta capacidad antibacteriana, antioxidante, antimicrobiana y antitumorales [37] [38] [39] [40] [41].

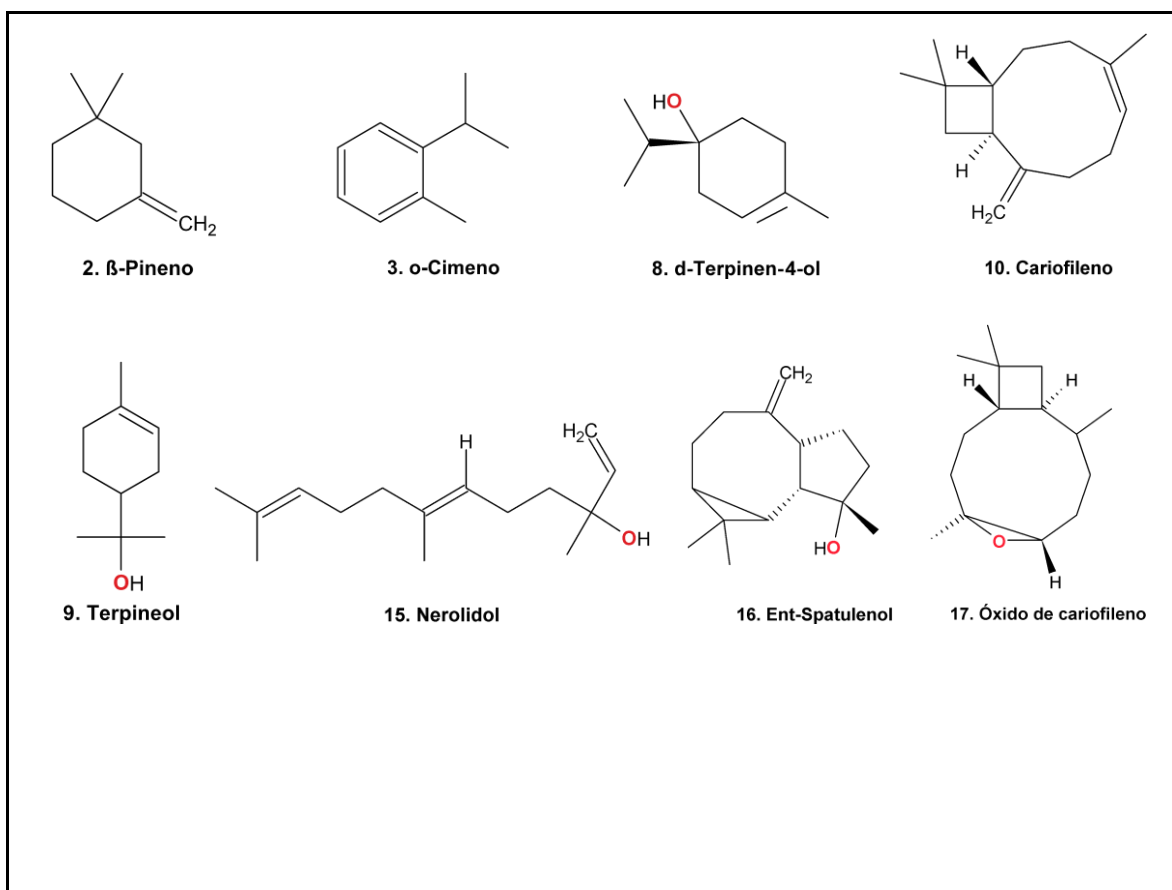


Figura 25. Modelos químicos de compuestos presentes en el aceite esencial de *M. exsucca*

7.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *P. boldus*

N°	Nombre del compuesto	TR* min	RI*	Área %
1	o-Cimeno	11.079	932	13.45
2	β-Phellandrene	11.208	887	1.15
3	Eucaliptol	11.279	965	9.71
4	Fenchone	13.004	921	1.09
5	p-ment-2-en-1-ol	13.980	803	0.55
6	(-)-trans-pinocarveol	14.538	932	2.77
7	Alcanfor	14.697	934	1.97
8	2,2-Dimetilocta-3,4-dienal	15.095	793	0.62
9	Pinocarvone	15.235	833	1.66
10	d-Terpinen-4-ol	15.656	920	2.91
11	6-isopropilciclohexen-3-ona	15.939	719	0.50
12	Terpineol	16.061	894	0.76
13	Mirtenal	16.231	874	0.55
14	o-4-Carene	17.502	858	49,95
15	p-Mentano	19.333	856	6.61
16	Metileugenol	21.860	917	1.05
17	Cariofileno	22.326	930	0.62
18	2-Tridecanona	24.095	801	0.04
19	4-epi-cubebil	24.200	762	0.01
20	Biciclogermacreno	24.271	926	0.65
21	Cadineno	24.329	575	0.00
22	Ent-Spatulenol	26.258	950	0.70
23	Globulol	26.866	860	0.10
24	Beta-Ionone	26.982	814	0.86
25	4(15),5,10(14)-Germacatrien-1-ol	28.747	900	1.01
26	Epóxido de isoaromadendreno	29.679	834	0.70

Figura 26. Tabla de componentes químicos del aceite esencial de *P. boldus*

Al realizar el análisis de los componentes del aceite esencial de Boldo encontramos dentro de sus compuestos mayoritarios; o-Cimeno, Eucaliptol, o-4-Careno, p-Mentano.

Haciendo análisis de estos compuestos podemos encontrar principalmente propiedades antibacterianas, anti tumorales, anti fúngicas y antiinflamatorias [42] [43] [44] [45].

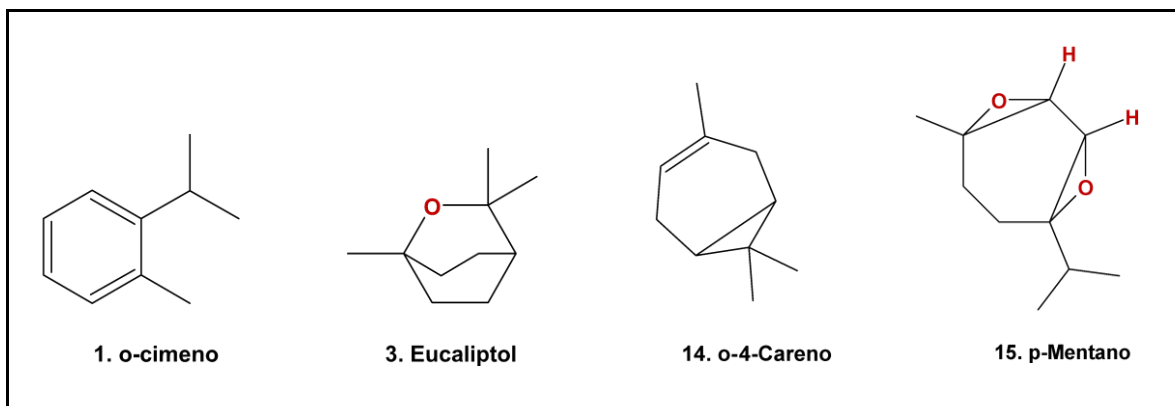


Figura 27. Modelos químicos de compuestos presentes en el aceite esencial de *P. boldus*

7.4. ENSAYO DE ACEITES ESENCIALES EN CÁNDIDAS

7.4.1. *Fabiana imbricata*

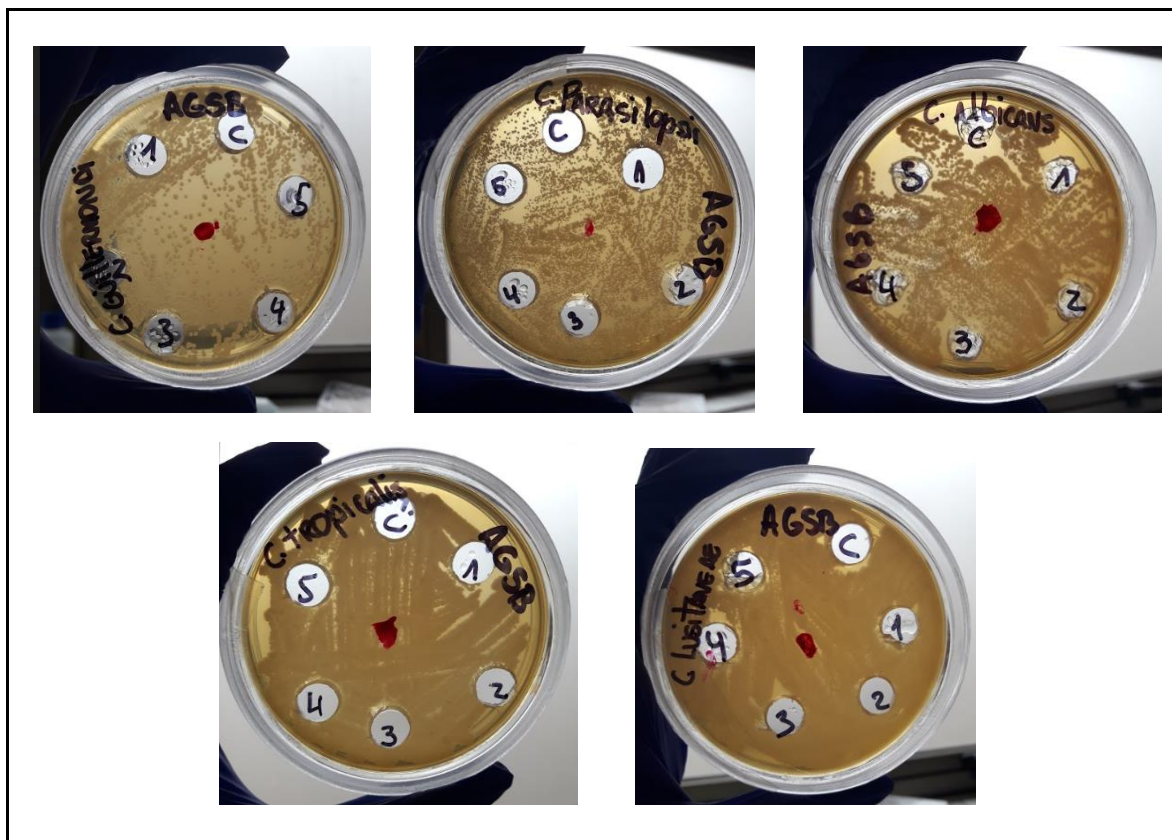


Figura 28. Ensayos en candidas con aceite esencial de *F. imbricata*

7.4.2. *Myrceugenia exsucca*

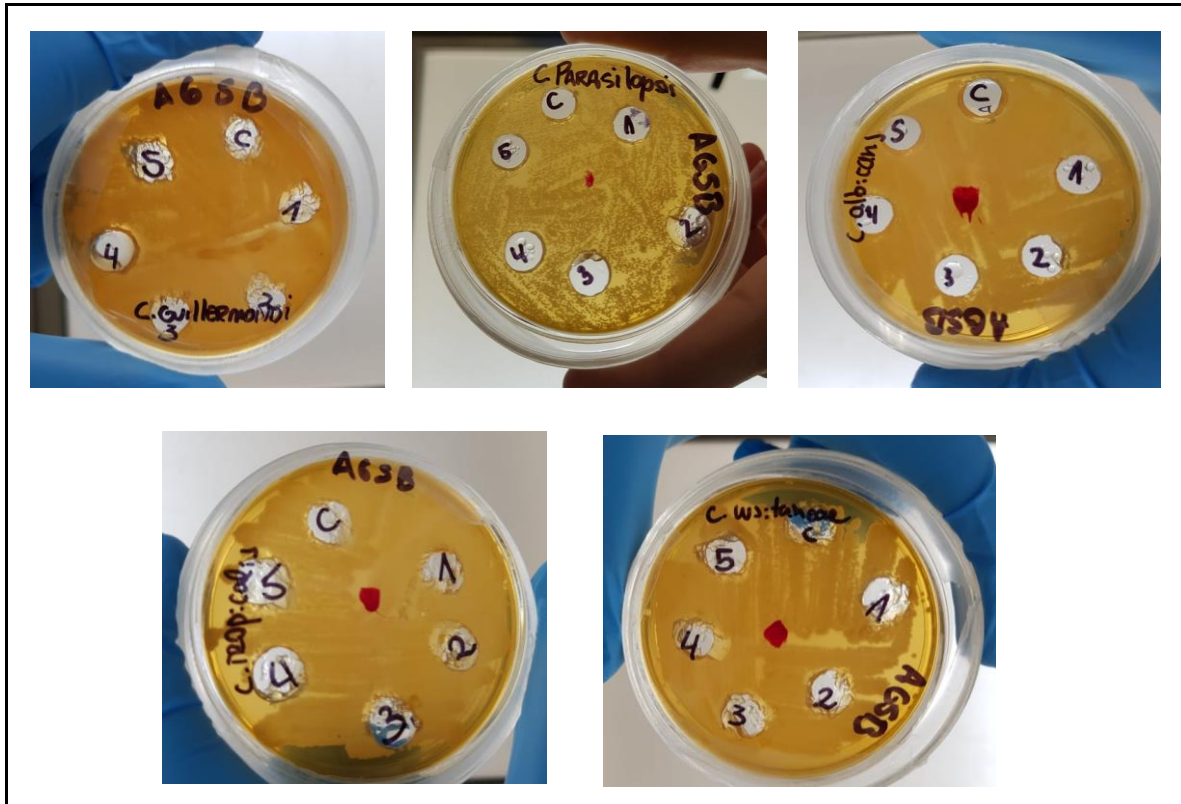


Figura 29. Ensayos en candidas con aceite esencial de *M. exsucca*

7.4.3. *Peumus boldus*

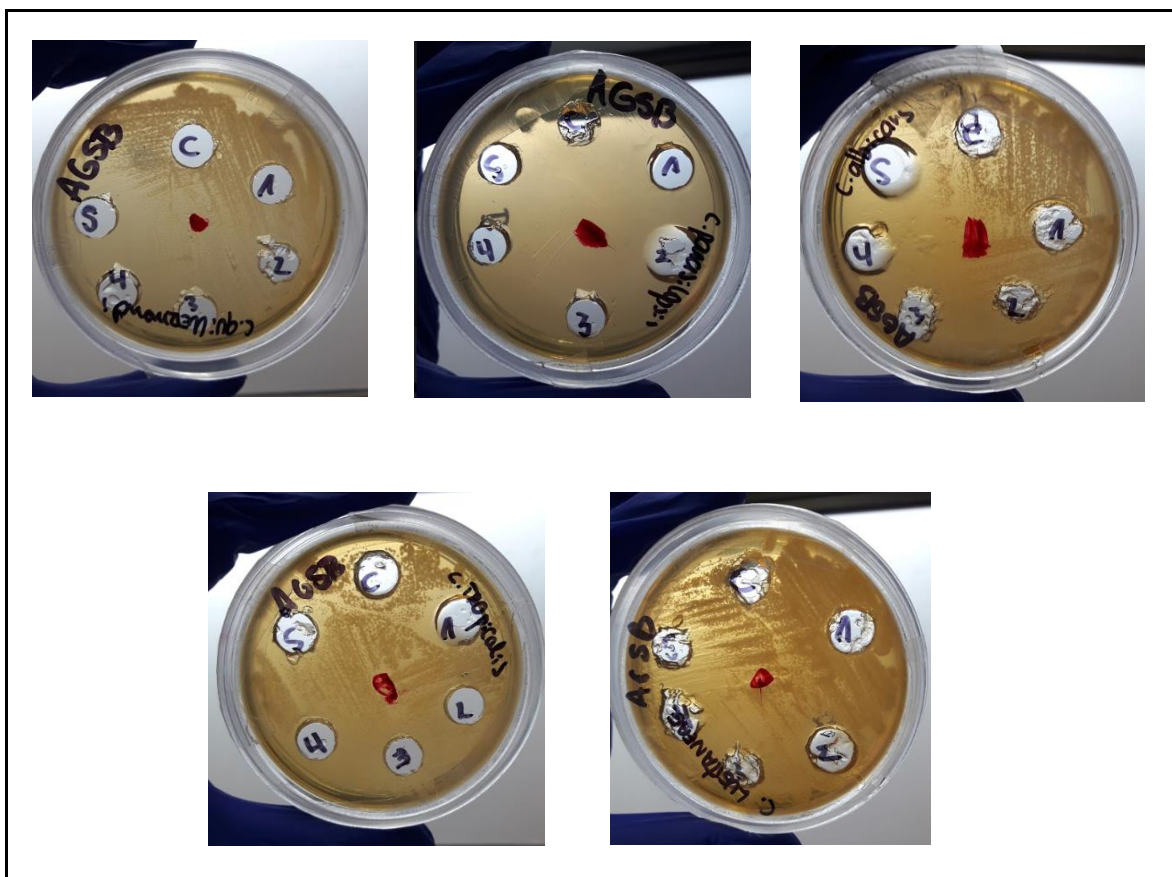


Figura 30. Ensayos en candidas con aceite esencial de *P. boldus*

7.4.4. Análisis de datos

Aceites esenciales	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. guilliermondii</i>
<i>F. imbricata</i>	>250 mg/mL	>250 mg/mL	>250 mg/mL	>250 mg/mL	150 mg/mL
<i>M. exsucca</i>	>250 mg/mL	>250 mg/mL	>250 mg/mL	>250 mg/mL	>250 mg/mL
<i>P. boldus</i>	<37,5 mg/mL	50 mg/mL	150 mg/mL	75 mg/mL	<37,5 mg/mL

Figura 31. Tabla de actividad presentada en cada tipo de *candida* frente a los distintos aceites estudiados

7.4.4.1. Análisis de actividad antifúngica de AE de *F. imbricata*, *M. exsucca* y *P. boldus*

Al analizar los resultados de la actividad presentada por cada aceite en los diferentes tipos de *candida*. Podemos evidenciar que el *P. boldus* presenta una mayor capacidad antifúngica que los otros aceites estudiados, se observó a simple vista en las placas de cultivos y se comprobó con los resultados arrojados en el software Sigmaplot. En el caso de los otros aceites se pudo ver que *F. imbricata* presentó actividad solamente en *C. guilliermondii*, mientras que *M. exsucca* no presentó ningún tipo de actividad.

7.5. ENSAYO DE ACEITES ESENCIALES EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE MAMA

7.5.1. MCF-7

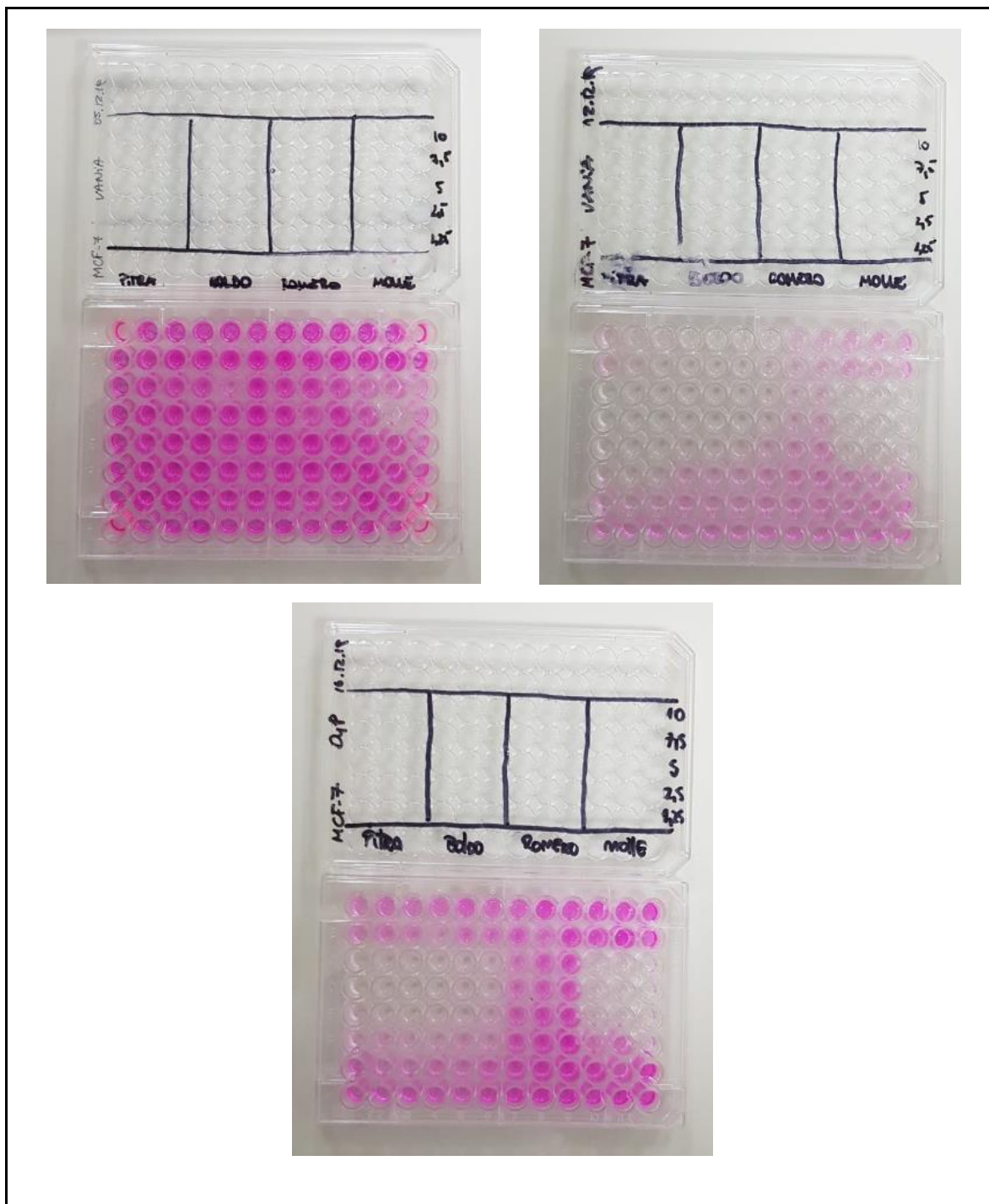
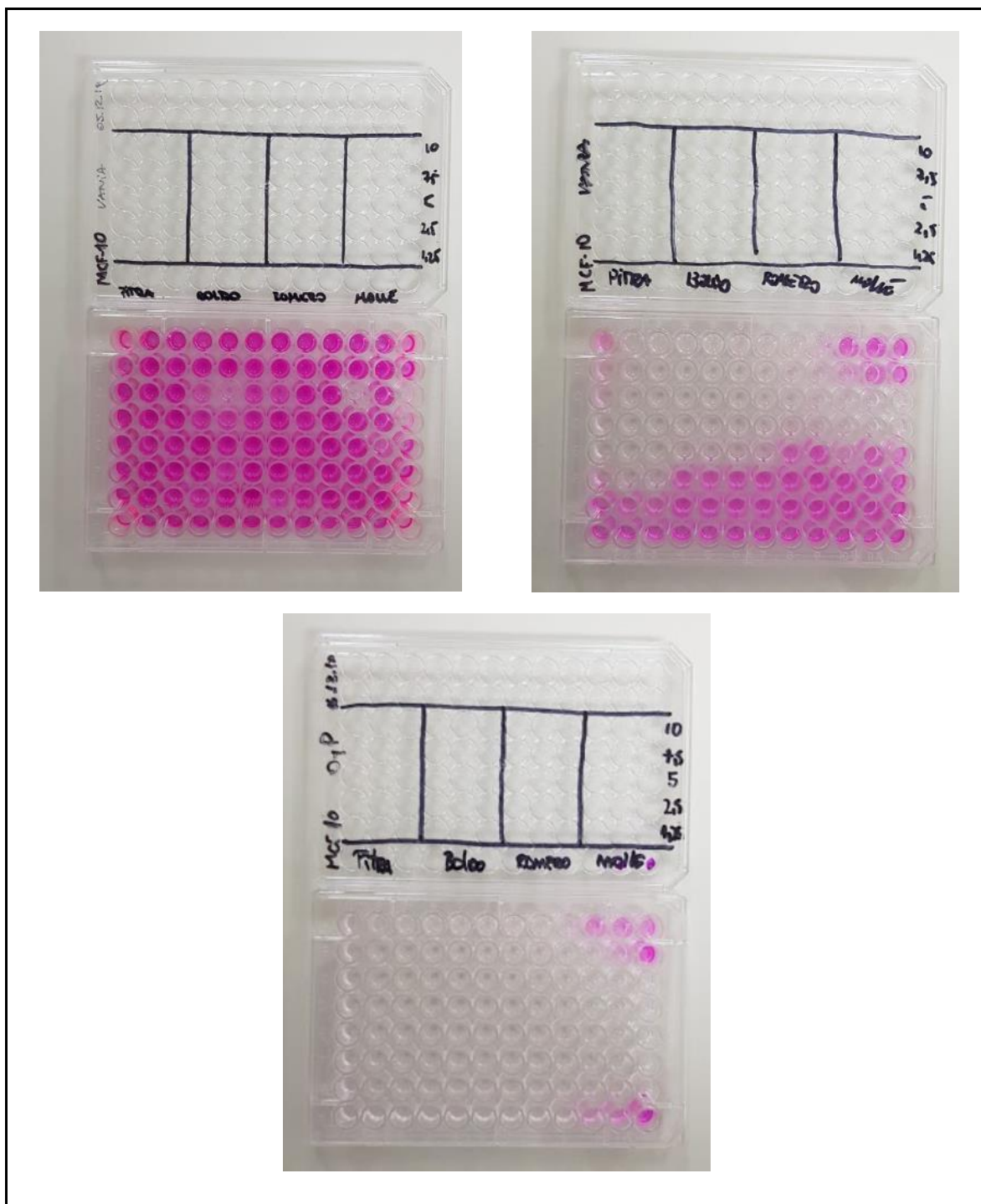


Figura 32. Ensayos en línea celular MCF-7 de cáncer de mama

7.5.2. MCF-10



7.5.3. MDA-MB-231

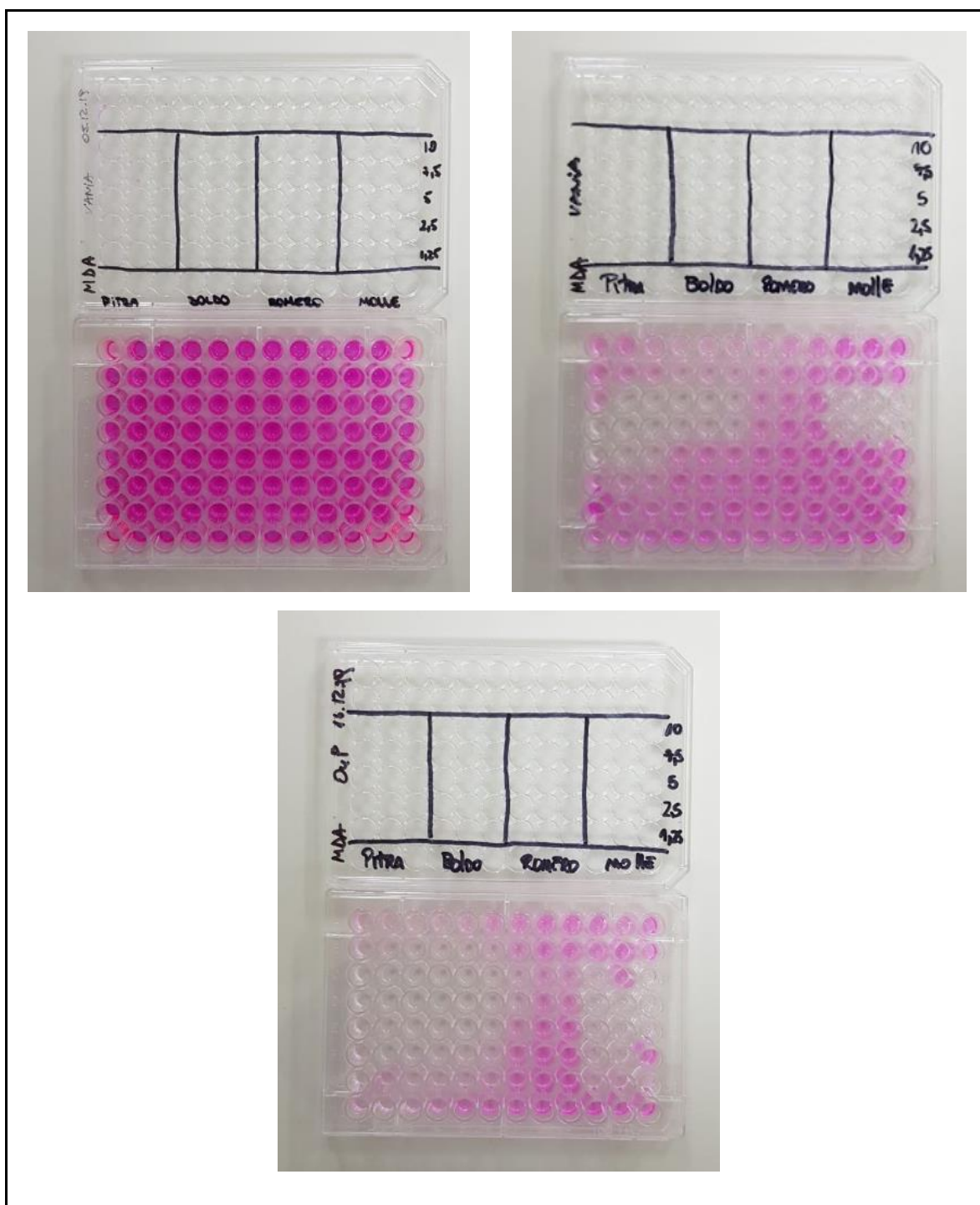


Figura 34. Ensayos en línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama

7.5.4. Análisis de datos

	IC50/mg/mL		
Aceites esenciales	MCF-7	MDA-MB-231	MCF-10
<i>Fabiana imbricata</i>	> 50,0	37,5 +- 0,3	50,0 +- 0,7
<i>Myrceugenia exsucca</i>	12,5 +- 0,3	6,25 +- 5	50,0 +- 0,7
<i>Peumus boldus</i>	25,0 +- 0,4	37,5 +- 0,2	12,5 +- 0,2
Daunorubicina	0,19	0,06	-

Figura 35. Tabla de actividad presentada en cada línea celular de cáncer de mama frente a los distintos aceites estudiados

Valores de resultados	Interpretación
< 100 µg/mL	Bueno
100 µg/mL - 500 µg/mL	Moderado
500 µg/mL - 1000 µg/mL	Débil
> 1000 µg/mL	Inactivo

Figura 36. Tabla de interpretación de parámetros de actividad en líneas celulares de cáncer de mama

7.5.4.1. Análisis de actividad citotóxica de los AE de *F. Imbricata*, *M.*

***Exsucca* y *P. Boldus*.**

Según los valores expuestos en la tabla, los cuales fueron analizados a través de SigmaPlot podemos observar que todos los aceites presentan una alta capacidad antioxidante y citotóxica, ya que en la literatura estudiada el parámetro de efectividad es considerado con buena actividad con un resultado $< 100 \mu\text{g/ml}$ (**ver Figura 36**) [46].

Podemos observar que el AE con mayor actividad fue el extraído de *M. excucca*, este resultado se ve claramente reflejado tanto en la observación visual de las placas donde se realizaron los experimentos (Figuras. 32, Figura 33 y Figura 34) las que muestran justamente que los cultivos donde hubo mayor disminución celular fueron tratados con dicho aceite. Así mismo podemos observar en la tabla (Figura 35), realizada con los datos obtenidos con la lectura de las placas en el software GEN5 BioTek y posterior analizados en SigmaPlot, dichos software arrojaron información en base a datos numéricos que expresan que el AE con mayor actividad es el anteriormente nombrado.

VIII. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

8.1. DISCUSIÓN

Los aceites esenciales estudiados arrojaron compuestos distintos a lo investigado y expuesto en el marco teórico. Como se ve evidenciado en *M. exsucca*, que presenta una diferencia en sus propiedades, según lo investigado la Pitra, presentaba propiedades antifúngicas, pero al evaluar su actividad en los cinco tipos de candida, está fue nula. Al analizar los componentes del aceite esencial, presentó principalmente propiedades antibacteriana, antioxidante, antimicrobiana y antitumorales.

Igualmente se logró comprobar nuestra hipótesis. En la cual los aceites estudiados tuvieron algún tipo de actividad en los diferentes tipos de candida, obteniendo resultados inesperados a lo investigado y expuesto en el marco teórico.

En los resultados se logró evidenciar que *P. boldus* presenta una alta capacidad antifúngica, obteniendo actividad en cada tipo de *candida* estudiado. Lo que no se evidenció anteriormente en las propiedades expuestas en el marco teórico, en la cual solo se manifiestan propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.

Por otra parte, en vista del análisis obtenido desde los resultados de las pruebas celulares en líneas cancerígenas de mama podemos observar que el Boldo (*P. boldus*), el Romero Pichi (*F. imbricata*) y la Pitra (*M. exsucca*) reducen la viabilidad celular de las células neoplásicas anteriormente nombradas, siendo la última muestra la que obtuvo mayor efectividad.

Si bien los compuestos químicos encontrados en los aceites esenciales fueron diferentes a los esperados según investigación bibliográfica, nuestros objetivos dentro de esta arista del estudio propuesto, fueron alcanzados.

Nuestra investigación indicó que en la línea celular MCF-7 y MDA-MB-231 las concentraciones de AE de *M. exsucca* fueron las con mayor alcance, considerando los valores obtenidos por la prueba realizada con Daunorrubicina, fármaco referencia, el cual, si bien arroja valores menores, nos entrega una escala favorable para el compuesto propuesto en el estudio. [47]

Si bien no se había realizado anteriormente un estudio de esta especie en dicho objeto de prueba, podemos confirmar a través del estudio de “Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon” realizado a la especie de *Eugenia uniflora*, que ambas poseen actividad antioxidantes y citotóxica, por lo cual podemos proponer que dicha capacidad es compartida entre especies de la familia de Myrtaceae. [48]

Contrastando los distintos resultados obtenidos poder afirmar en gran parte la hipótesis que propusimos, otorgándoles propiedades antioxidantes y citotóxicas a todas plantas en cuestión. No así con la capacidad antifúngica, donde la especie *M. exsucca* no mostró ninguna actividad.

Sin embargo, al obtener buenos resultados con los aceites esenciales estudiados, es qué se espera investigar y comprobar actividad con otros tipos de levaduras y células neoplásicas, así lograr elevar el conocimiento de la herbolaria que encontramos en nuestro país.

8.2. CONCLUSIÓN

Desde tiempos remotos las plantas han sido utilizadas para el tratamiento de las distintas patologías, ya que se les han asociado propiedades que han resultado ser curativas. Sin embargo, esta práctica se ve cada vez menos por el acceso que tiene hoy en día la población a los medicamentos sintéticos, los que muchas veces generan efectos no deseados en quienes los utilizan.

Es por esto que esta investigación, además de buscar recuperar parte de la cultura ancestral, estuvo enfocada en buscar propiedades curativas en plantas endémicas y de fácil acceso, y en base a estas buscar tratamientos complementarios para ciertas patologías de interés ginecológico. Es muy satisfactorio saber que las plantas estudiadas dieron buenos resultados frente a las patologías propuestas, lo cual abre una posibilidad a la medicina actual de seguir investigando sus efectos terapéuticos y optar a tener un complemento a los tratamientos convencionales y así contribuir a una mejor calidad de vida para nuestros usuarios, pudiendo con estos aceites fabricar diferentes insumos, como por ejemplo, cremas y ungüentos, y contribuir de una manera menos invasiva a la recuperación de la salud.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avello L Marcia, Cisternas F Isabel. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. [Internet]. Santiago, Chile. Disponible en:

https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872010001100014&lng=es

2. Cortinez Armando, Nogales Jorge, Sanhueza Gabriel. (2008). Estudio de evaluación de terapias complementarias en el sistema público de salud. [Internet] Santiago, Chile. Disponible en:

<https://www.minsal.cl/portal/url/item/9d59798fb14ad056e04001011f01399e.pdf>

3. Valencia Alejandra. (2013). Validación y actualización del uso de plantas medicinales presentes en la selva valdiviana. [Internet]. Valdivia, Chile. Disponible en:

<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fcv152v/doc/fcv152v.pdf>

4. Malim M.H. (2007). Levaduras. [Internet]. Argentina. Disponible en:

<http://www.unsa.edu.ar/biblio/repositorio/malim2007/4%20levaduras.pdf>

5. Frazier W.C. (1998). Levaduras. [Internet]. Cuba. Disponible en:

<http://www.ecured.cu/Levadura>

6. Aaron D. (2006). Candidiasis (infección por levaduras). [Internet]. New Hampshire, Estados Unidos. Disponible en:

<https://www.msmanuals.com/es-cl/hogar/trastornos-de-la-piel/infecciones-f%C3%BAngicas-de-la-piel/candidiasis-infecci%C3%B3n-por-levaduras>

7. Torres J. (2017). Homeopatía para la candidiasis de repetición. [Internet]. España. Disponible en:

<https://www.hablandodehomeopatia.com/homeopatia-para-la-candidiasis-de-repeticion/>

8. Pruthi S., Laughlin S. (2019). Candidosis vaginal. [Internet]. Minnesota, Estados Unidos. Disponible en:

<https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/yeast-infection/diagnosis-treatment/drc-20379004>

9. De la Calle Natalia, Santa Catalina, Cardona Nora. (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. [Internet]. Medellín, Colombia. Disponible en:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-87052012000100005

10. Ted L. Hadfield, Michael B. Smith, Richard E. Winn (1987). Mycoses Caused by *Candida lusitanae*. [Internet]. Chicago, Estados Unidos. Disponible en:

<https://academic.oup.com/cid/article-abstract/9/5/1006/479492?redirectedFrom=fulltext>

11. Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. Clinical microbiology reviews. 2008 Oct 1;21(4):606-25. Disponible en:

<https://cmr.asm.org/content/21/4/606.short>

12. Gómez S, García SM, de Bedout C, García AM. Protein profile analysis of *Candida guilliermondii* clinical isolates sensitive and resistant to fluconazole. Infectio. 2011 Mar;15(1):20-4. Disponible en:

<http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v15n1/v15n1a04.pdf>

13. Marcos-Zambrano LJ, Puig-Asensio M, Pérez-García F, Escribano P, Sánchez-Carrillo C, Zaragoza O, Padilla B, Cuenca-Estrella M, Almirante B, Martín-Gómez MT, Muñoz P. *Candida guilliermondii* complex is characterized by high antifungal resistance but low mortality in 22 cases of candidemia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017 Jul 1;61(7):e00099-17. Disponible en:

<https://aac.asm.org/content/61/7/e00099-17>

14. Tseng TY, Chen TC, Ho CM, Lin PC, Chou CH, Tsai CT, Wang JH, Chi CY, Ho MW. Clinical features, antifungal susceptibility, and outcome of *Candida guilliermondii* fungemia: an experience in a tertiary hospital in mid-Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 2018 Aug 1;51(4):552-8. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118217300506>

15. Kothavade RJ, Kura MM, Valand AG, Panthaki MH. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of medical microbiology*. 2010 Aug 1;59(8):873-80. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20413622>

16. Dugdale D, Zieve D., Conaway B. (2019). *Cáncer*. [Internet] Washington, Estados Unidos. Disponible en:

<https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001289.htm>

17. Santander S. Izquierdo C. Hasen F. (2019) *Plan Nacional del Cáncer 2018 - 2028*. [Internet]. Chile. Disponible en:

https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2019/01/2019.01.23_PLAN-NACIONAL-DE-CANCER_web.pdf

18. Ministerio de Salud- (2015). Guías Clínicas AUGE, Cáncer de mama. [Internet]. Santiago, Chile. Disponible en:

<https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/09/GPC-CaMama.pdf>

19. American Society of Clinical Oncology. (2018). Cáncer de mama: signos y síntomas. [Internet]. Disponible en:

<https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/c%C3%A1ncer-de-mama/s%C3%ADntomas-y-signos>

20. Centros para el control y la prevención de enfermedades (2018). ¿Cómo se trata el cáncer de mama? [Internet]. Disponible en:

https://www.cdc.gov/spanish/cancer/breast/basic_info/treatment.htm

21 Pruthi S., Laughlin S. (2019). Cáncer. [Internet]. Minnesota, Estados unidos. Disponible en:

https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/cancer/diagnosis-treatment/drc-20370594?mc_id=google&campaign=1051355937&geo=9048041&kw=c%C3%A1ncer%20de%20mama&ad=248623689821&network=g&sitetarget=&adgroup=55228825367&extension=&target=kwd-300543246858&matchtype=p&device=c&account=4650938658&invsrsrc=spanish&placementsite=enterprise&gclid=EAlaIQobChMI7c_prMDU5gIVYWRCh1iuwlXEAAAYASAAEgJGz_D_BwE

22. Saz-Peiró P., Tejero M. C. (2016). Fitoterapia en la prevención y tratamiento del cáncer. [Internet]. España. Disponible en:

<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5591360>

23. Descripción e imágenes de *Fabiana imbricata* (Pichi , Peta , Romero), una planta chilena nativa, suministrado por el proveedor de las semillas chilenas nativas, Chileflora.com. (s. f.).

Recuperado 14 de diciembre de 2018. Disponible en:

<http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraSpanish/HighResPages/SH0018.htm>

24. (2009). Medicamentos herbarios tradicionales. [Internet]. Santiago, Chile. Disponible en:

<https://www.minsal.cl/sites/default/files/files/Libro%20MHT%202010.pdf>

25. Doll Ursula, Norambuena Catherine, Sánchez Osvaldo. (2013). Efecto de la aplicación de IBA sobre el enraizamiento de estacas en seis especies arbustivas nativas de la región mediterránea de Chile. [Internet]. Arica, Chile. Disponible en:

https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292013000300009&lng=en&nrm=iso&tIng=en

26. Brown Geoffrey. (1993). The sesquiterpenes of *fabiana imbricata*. [Internet]. Nottingham, UK. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0031942200947757>

27. Dutkiewicz Isabela. (2016). Pequeño Manual de plantas medicinales patagónicas. [Internet]. San Carlos de Bariloche, Argentina.

Disponible en: https://es.slideshare.net/Isabella_D018/cuaderno-medicinal-dos

28. Fundación RA Philippi. *Myrceugenia exsucca*. [Internet]. Santiago, Chile.

Disponible en: <http://fundacionphilippi.cl/catalogo/myrceugenia-exsucca>

29. Moreno Quiroga Guillermo. (2012). Pitra: un árbol de amplitud anfibia [Internet]. Ñuble, Chile. Disponible en:

<http://www.nublenaturaleza.cl/articulos/flora/arboles/pitra/>

30. Aukanaw (1983-2013). La ciencia secreta de la Mapuches, recopilación [Internet] Pueblo Mapuche. Disponible en:

http://futatraw.ourproject.org/descargas/libros/aukanaw-ciencia_sec.pdf

31. Gut, Bernardo (2017) Trees Patagonia, Árboles nativos e introducidos en la patagonia [Internet], Buenos Aires, Argentina. Disponible en:

https://sib.gob.ar/ficha/PLANTAE*myrceugenia*exsucca

32. Descripción e imágenes de Peumus Boldus (2006), [Internet]. Chile. Disponible en:

<http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraSpanish/HighResPages/SH0045.htm>

33. Medicamentos herbarios tradicionales: Peumus Boldus. [Internet]. Chile. Disponible en:

<https://www.minsal.cl/portal/url/item/7d983cf52cb98bd6e04001011e011da0.pdf>

34. Botanical Online (2019). Características del boldo (peumus boldus). [Internet]. Chile. Disponible en:

<https://www.botanical-online.com/plantas-medicinales/boldo-peumus-boldus>

35. Yao XT, Ling PX, Jiang S, Lai PX, Zhu CG. Análisis del aceite esencial de Gaillardia pulchella Foug. y su actividad antioxidante. Revista de oleociencia. 2013; 62 (5): 329-33. Disponible en:

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/62/5/62_329/article/-char/ja/

36. Actividades de Shin S. Anti-Aspergillus de aceites esenciales de plantas y sus efectos combinados con ketoconazol o anfotericina B. Archivos de investigación farmacéutica. 1 de mayo de 2003; 26 (5): 389. Disponible en:

<https://www.google.com/url?q=https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02976696.pdf&sa=D&ust=1577573660611000&usg=AFQjCNGHVUcUgECSpX2B54tX6Bglt1ZBAg>

37. Yang Z, Xiao Z, Ji H. Complejo de inclusión sólido de terpineno-4-ol / β -ciclodextrina: liberación cinética, mecanismo y su actividad antibacteriana. Diario de sabores y fragancias. 2015 Mar; 30 (2): 179-87. Disponible en:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ffj.3229>

38. Coy Barrera Carlos Andrés, Eunice Acosta Gema. Antibacterial activity and chemical composition of essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*), thyme (*Thymus vulgaris*) and turmeric (*Curcuma longa*) from Colombia. Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2013 Jun [citado 2019 Dic 29] ; 18(2): 237-246. Disponible en:

[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000200007&lng=es.](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000200007&lng=es)

39. Chan WK, Tan LT, Chan KG, Lee LH, Goh BH. Nerolidol: un alcohol sesquiterpeno con actividades farmacológicas y biológicas multifacéticas. Moléculas. 2016 mayo; 21 (5): 529. Disponible en:

<https://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/529/htm>

40. Park SN, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D, Kook JK. Efecto antimicrobiano de linalool y α -terpineol contra bacterias periodontopáticas y cariogénicas. Anaerobio. 2012 1 de junio; 18 (3): 369-72. Disponible en:

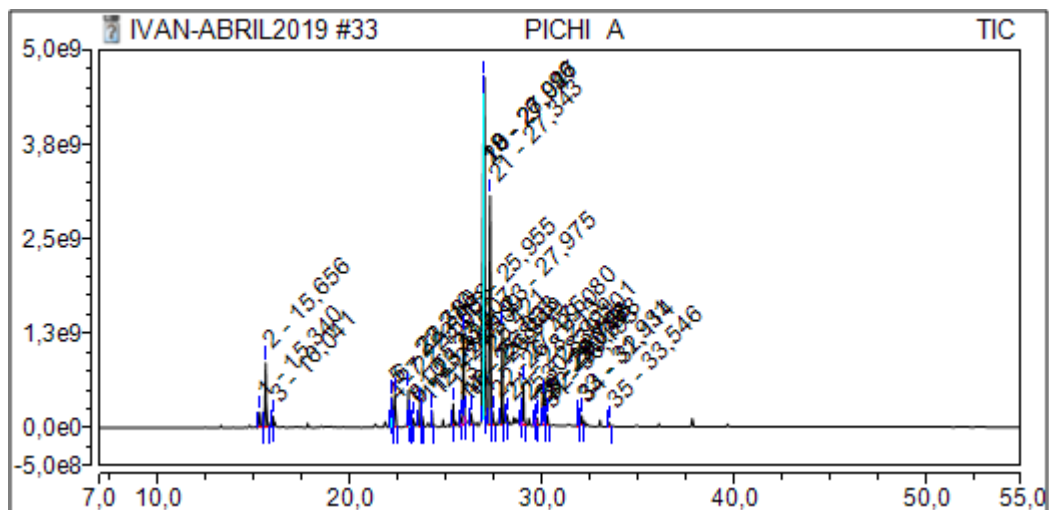
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996412000418>

41. Henrique HC, Freitas MA, Gondim CN, Albuquerque RS, Ferreira JV, Andrade JC. Actividad antimicrobiana in vitro de Geraniol e Cariofileno sobre Staphylococcus aureus. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2015 Jan 29;20(1). Disponible en:
<http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/128>
42. Hidalgo M. (2011) Eucaliptol. [Internet]. España. Disponible en:
http://cerezo.pntic.mec.es/~jgarc247/2_bachto/anho_internacional_quimica/03eucaliptl.htm
43. Akhtar M. S., Swamy M. (2018). Anticancer plants: properties and application, vol 1. [Internet]. Shahjahanpur, India. Disponible en:
https://books.google.cl/books?id=LJtiDwAAQBAJ&pg=PA43&lpg=PA43&dq=o+cymene+properties&source=bl&ots=bK-4d10ulZ&sig=ACfU3U2h-iOA_LWl1QeVKNAP-fdYWZmBVA&hl=es&sa=X&ved=2ahUKewjzp6Kgo9bmAhVQK7kGHWldBlkQ6AEwCHoECAoQAAQ
44. Royal Queen Seeds (2019). Careno: un terpeno con propiedades antiinflamatorias y de curación ósea. [Internet]. Chile. Disponible en:
<https://www.royalqueenseeds.es/blog-careno-un-terpeno-con-propiedades-antiinflamatorias-y-de-curacion-osea-n1202>
45. Arango WM, Ruíz JM, Jaramillo CA. Fungicidal activity of Eucalyptus tereticornis essential oil on the pathogenic fungus Fusarium oxysporum. Revista Cubana de Farmacia. 2011;45(2):264-74. Disponible en:
<https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenl.cgi?IDARTICULO=33900>

46. Barbiéri F., Pessini G., Rogério N. (2002). Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. [Internet]. Río de Janeiro, Brasil.
47. Tapia RA, Cantuarias L, Cuéllar M, Villena J. Microwave-assisted reaction of 2,3-dichloronaphthoquinone with aminopyridines. Journal of the Brazilian Chemical Society. 2009;20(5):999-1002. Disponible en:
http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532009000500027&script=sci_arttext
48. Figueiredo PL, Pinto LC, da Costa JS, da Silva AR, Mourão RH, Montenegro RC, da Silva JK, Maia JG. Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon. Journal of ethnopharmacology. 2019 Mar 25;232:30-8. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30543916>

X. ANEXOS

ANEXO 1: CROMATOGRAMA ACEITE ESENCIAL *F. imbricata*



ANEXO 3: CROMATOGRAMA ACEITE ESENCIAL *P. boldus*

