



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EVALUACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Bursera morelensis* SOBRE
ALGUNOS PROCESOS DE PATOGENICIDAD DE *Candida albicans*.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

CLAUDIA REBECA RIVERA YÁÑEZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ
UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS, FES Iztacala UNAM.

COMITÉ TUTOR:

Dr. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

Dr. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDEZ
UNIDAD DE BIOMEDICINA, FES Iztacala UNAM

MEXICO, CDMX, MAYO DE 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

ÍNDICE	II
ÍNDICE DE CUADROS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
RESUMEN	2
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>C. albicans</i>	7
Cambio Morfológico.....	8
Formación de Tubo Germinativo	8
Adhesión.....	10
Formación de Biofilm	12
Secreción de enzimas.....	15
CANDIDIASIS	17
Candidiasis vulvovaginal (CVV)	19
ANTIFÚNGICOS.....	20
MEDICINA TRADICIONAL	23
ACEITES ESENCIALES	25
Clasificación y tipos de aceites esenciales	26
2. Pregunta de investigación.....	29
3. Hipótesis	29
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivo General	30
4.2 Objetivos Particulares	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 Obtención del aceite esencial	31

5.2 Obtención de compuestos puros.....	31
5.3 Análisis de la composición química.....	31
5.4 Cepas Fúngicas	32
5.5 Evaluación Cualitativa.....	32
5.6 Evaluación Cuantitativa.....	32
5.7 Inhibición del Crecimiento del Tubo Germinativo.....	32
5.8 Tinción con blanco de Calcofluor y yoduro de propidio.....	33
5.9 Expresión del gen int1.....	33
5.10 Estudio in vivo.....	33
5.10.1 Inoculación y producción de la infección.....	34
5.10.2 Tratamiento a base de aceite esencial	34
5.10.3 Histología.....	35
6. RESULTADOS	36
6.1 Rendimiento.....	36
6.2 Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas	37
6.3 Evaluación Cualitativa.....	40
6.4 Evaluación Cuantitativa.....	43
6.5 Inhibición del Crecimiento del tubo Germinativo	44
6.6 Evaluación de la actividad in vivo del aceite esencial de <i>B. morelensis</i> sobre la infección vaginal ocasionada por <i>C. albicans</i>	49
6.6.1 Evolución de la infección en el modelo experimental murino de candidiasis vaginal.	49
6.6.2 Evaluación de la actividad del aceite esencial de <i>B. morelensis</i> en el modelo experimental murino de candidiasis vaginal.	52
.....	54
6.7 Expresión de la proteína INT1p.....	56
7. DISCUSIÓN.....	59
8. CONCLUSIONES	66
9. ANEXO 1	67
APENDICES	67

10.1 APÉNDICE 1	68
Bursera morelensis Ramírez. Burseraceae	68
10.2 APÉNDICE 2.....	70
Método de Hidrodestilación.....	70
10.3 APÉNDICE 3.....	70
Método de difusión en agar (Modificado para levaduras)	70
10.4 APÉNDICE 4.....	71
Microtécnica de Dilución en caldo para aceites esenciales	71
10.5 APÉNDICE 5.....	73
Método de inhibición del Crecimiento del tubo germinativo	73
10.6 APÉNDICE 6.....	74
Actividad del aceite esencial sobre la transcripción del gen int1	74
10.7 APÉNDICE 7	76
Modelo murino de candidiasis vaginal para la evaluación del efecto anti-Candida de aceites esenciales.....	76
10.8 APÉNDICE 8.....	77
Técnica Histológica	77
10. ANEXO 2	79
Artículo Publicado Indexado	79
12. REFERENCIAS.....	92

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. PRINCIPALES ADHESINAS PRESENTES EN <i>C. ALBICANS</i>	12
CUADRO 2. TIPO Y FUNCIÓN DE LAS ENZIMAS EXTRACELULARES DE <i>C. ALBICANS</i>	16
CUADRO 3. GRUPOS DE TRATAMIENTOS EN MODELO MURINO DE CANDIDIASIS VAGINAL	34
CUADRO 4. RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>BURSERA MORELANSIS</i>	36
CUADRO 5. COMPUESTOS QUE INTEGRAN EL ACEITE ESENCIAL DE <i>B. MORELANSIS</i>	38
CUADRO 6. PRUEBA CUALITATIVA ANTI- <i>CANDIDA</i> DEL ACEITE ESENCIAL Y LOS COMPUESTOS PUROS DE <i>B. MORELANSIS</i>	41
CUADRO 7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>B. MORELANSIS</i> Y SUS COMPUESTOS PUROS CONTRA LAS DIFERENTES CEPAS DE <i>C. ALBICANS</i>	43
CUADRO 8. PRIMERS UTILIZADOS PARA PCR.	75

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. HIFA (CORTE LONGITUDINAL), LEVADURA (CORTE TRANSVERSAL) [1]	10
FIGURA 2. FORMACIÓN DEL BIOFILM DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> [52].	13
FIGURA 3. CLASIFICACIÓN Y ALGUNOS EJEMPLOS DE MONOTERPENOS [102].	27
FIGURA 4. CLASIFICACIÓN Y EJEMPLOS DE SESQUITERPENOS [102, 117].	28
FIGURA 5. ESQUEMA DE SINCRONIZACIÓN, INOCULACIONES, TRATAMIENTOS Y SACRIFICIO DENTRO DEL MODELO EXPERIMENTAL MURINO	35
FIGURA 6. CROMATOGRAMA DE GASES DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>B. MORELANSIS</i>	37

FIGURA 7. EVALUACIÓN CUALITATIVA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>B. MORELANSIS</i> Y DOS COMPUESTOS PUROS PRESENTES EN EL MISMO	42
FIGURA 8. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>B. MORELANSIS</i> SOBRE EL CRECIMIENTO DEL TUBO GERMINATIVO DE <i>C. ALBICANS</i> 14065.....	44
FIGURA 9. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>B. MORELANSIS</i> SOBRE EL DESARROLLO DEL TUBO GERMINATIVO DE <i>C. ALBICANS</i>	45
FIGURA 10. EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>B. MORELANSIS</i> SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA CELULAR DE <i>C. ALBICANS</i> 14065.....	49
FIGURA 11. CORTES HISTOLÓGICOS GRUPO CONTROL	50
FIGURA 12. CORTES HISTOLÓGICOS DEL PROGRESO DE LA INFECCIÓN DE LA VAGINA CON <i>C. ALBICANS</i> 14065 A LAS 3, 24, 48 Y 72 H POST-INFECCIÓN.....	52
FIGURA 13. CORTES HISTOLÓGICOS DEL TEJIDO VAGINAL DE RATONES INFECTADOS CON <i>C. ALBICANS</i> 14065 Y TRATADOS CON NISTATINA (CONTROL) A LAS 24 Y 48 H	54
FIGURA 14. CORTES HISTOLÓGICOS DEL TEJIDO VAGINAL DE RATONES INFECTADOS CON <i>C. ALBICANS</i> 14065 Y TRATADOS CON ACEITE ESENCIAL DE <i>B. MORELANSIS</i> A LAS 24 Y 48 H..	55
FIGURA 15. ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR OBTENIDOS DE <i>C. ALBICANS</i>	56
FIGURA 16. TR-PCR DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN INT1 DE <i>C. ALBICANS</i> EXPUESTA A DIFERENTES RETOS CON EL ACEITE ESENCIAL DE <i>B. MORELANSIS</i> , A-PINENO Y F-TERPINENO .	57
FIGURA 17. ÁRBOL DE <i>BURSELA MORELANSIS</i>	69

A mí Papá:

Porque todo en esta vida se tiene que luchar, porque cada día debemos de esforzarnos para alcanzar nuestros objetivos, porque fuiste uno de los más grandes pilares en mi vida y mi formación académica, mi niña interna te extraña muchísimo y busca un abrazo, mi adolescente recuerda los regaños y llamadas de atención con el único fin de evitar el desvío de camino, la adulta siempre buscara tu consejo y hermosas pláticas que quedaran por siempre en el recuerdo, la vieja espera que al final del camino mi despedida sea tan digna y benevolente como la tuya. Eres y serás siempre Papá Gus.

Con un beso hasta el cielo. RBK

RESUMEN

Las micosis oportunistas se asocian principalmente con pacientes inmunocomprometidos, pero inclusive pacientes sanos pueden verse invadidos por este tipo de infecciones. Uno de los agentes responsables de estas infecciones son las especies del género *Candida* siendo la cepa más común *Candida albicans*; a la infección causada por las especies de este género se les da el nombre de candidiasis. A pesar de la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de dichas infecciones, se conocen problemas de resistencia, espectro de acción, costo y efectos adversos. Por tal motivo es necesario orientar la búsqueda hacia nuevos antimicóticos que superen dichas limitaciones, siendo los aceites esenciales una alternativa para el tratamiento de las candidiasis, ya que se conoce de su actividad antifúngica tanto *in vivo* como *in vitro*. Teniendo en cuenta lo anterior el objetivo de este trabajo es evaluar las propiedades anti-*Candida* del aceite esencial de *B. morelensis*, debido a esto es que se realizaron diversas pruebas biológicas sobre cuatro diferentes cepas de *C. albicans* para comprobar dicha actividad. Aplicando una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-MS), se obtuvo la composición química del aceite esencial de *B. morelensis*, mostrando la presencia de 13 compuestos, siendo el γ -terpineno el más abundante (65.46%), seguido del β -felandreno con un total del 18.27%, en tercer lugar se encuentra el α -cariofileno (5.13%) y por último el α -pineno (2.85%). Posteriormente se realizaron pruebas cualitativas (difusión en agar) y cuantitativas (microdilución en caldo) obteniéndose para el primer ensayo halos de inhibición de hasta 11.83 mm de diámetro. En el ensayo cuantitativo las concentraciones obtenidas en la cepa más sensible (*C. albicans* 14065) fueron de 2 mg/mL para Concentración Fungicida Mínima (CFM) y 0.5 mg/mL para Concentración Fungicida media (CF₅₀) (mínima y media deben de ser iguales ya sean mayúsculas o minúsculas). También se evaluó la capacidad de inhibición del crecimiento de tubo germinativo, teniendo como resultado un 87.94% de inhibición a la concentración de 8 mg/mL y una Concentración Letal media (CL₅₀)= 1.4 mg/mL; para evaluar la integridad

de la pared celular se realizó una tinción con Blanco de Calcofluor y yoduro de propidio, observándose una clara pérdida de la integridad de la misma a las concentraciones de 10 y 2 mg/mL. Para evaluar la actividad del aceite esencial sobre la capacidad de adhesión de la levadura se llevó a cabo una prueba de RT-PCR, donde se evaluó la actividad del aceite esencial de *B. morelensis* a las concentraciones de CF₂₅ (0.125 mg/mL) y CF_{12.5} (0.065 mg/mL) y los compuestos γ -terpineno y α -pineno a las concentraciones de CF₅₀ y CF₂₅, observándose una clara disminución de la transcripción del gen INT1, el cual codifica para la adhesina Int1p. Por último, en un modelo murino de candidiasis vaginal, se probó la actividad del aceite esencial a una concentración de 2 mg/mL (CFM) en dos periodos distintos de tiempo, 24 y 48 h, observándose en los cortes histológicos teñidos previamente con la tinción de PAS la ausencia de levaduras en la cavidad vaginal

ABSTRACT

The candidiasis caused by *C. albicans* is a public health problem. The abuse of antifungals has contributed to the development of resistance. *B. morelensis* has demonstrated antibacterial and antifungal activities. In this work the activity of the essential oil of *B. morelensis* was evaluated and for its two pure compounds with analysis of the different mechanisms of pathogenesis important for *C. albicans*. The essential oil was obtained by the hydro-distillation method and analyzed using GC-MS. The anti-*Candida* activity was compared between the essential oil, γ -terpinene and α -pinene. GC-MS of the essential oil demonstrated the presence of 13 compounds. The essential oil showed antifungal activity against four *C. albicans* strains. The most sensitive strain was *C. albicans* 14065 (MFC 2.0 mg/mL and MIC₅₀ 0.125 mg/mL) with γ -terpinene and α -pinene having MFCs of 4.0 and 16.0 mg/mL respectively. The essential oil inhibited the growth of the germ tube in 87.94% (8.0 mg/mL). Furthermore, it was observed that the essential oil diminishes the transcription of the gene *int1*. Finally, the activity of the essential oil was tested in a murine model of vaginal candidiasis, where the oil was tested at a concentration of 2 mg/mL (CFM) at two different periods of time, 24 and 48 h, observed in the cuts histologicals stained previously with PAS staining the absence of yeast in the vaginal cavity.

1. INTRODUCCIÓN

Las micosis son enfermedades causadas por una invasión en los tejidos por parte de algunos hongos [1]. La mayoría de los hongos poseen escaso poder patógeno, por lo que todas las micosis, en principio son oportunistas y es el estado inmunológico del paciente lo que determina la gravedad de la infección[2]. El establecimiento de una micosis implica la capacidad del microorganismo de crecer en las condiciones de pH, temperatura y potencial redox presentes en los tejidos del hospedero, las cuales generalmente son poco favorables para el crecimiento y desarrollo de los hongos. De tal manera que los agentes infectantes deben poseer, ciertas características que les permitan sobrevivir en estos ambientes así como, mecanismos para evadir las defensas del hospedero[3].

Las micosis se pueden clasificar de acuerdo a su topografía en cuatro grupos:

- a) *Micosis generalizadas o profundas*: Estas afectan fundamentalmente los órganos internos. A menudo se hallan diseminadas en el organismo y afectan distintos tejidos.
- b) *Micosis subcutáneas*: Afectan la piel, tejido subcutáneo, fascias y huesos.
- c) *Micosis cutáneas*: Pueden afectar la epidermis, cabellos y uñas. Los hongos responsables de estas infecciones se denominan dermatofitos.
- d) *Micosis superficiales*: Afectan sólo los cabellos y capas más superficiales de la epidermis. [4]

Si bien dentro de la anterior clasificación no se especifica la existencia de micosis causadas por hongos de bajo poder patógeno (oportunistas), estas pueden ser localizadas o estar invadiendo diferentes órganos y sistemas dependiendo del daño inmunológico que presente el hospedero [5], debido a que el delicado equilibrio

entre huésped y hongo patógeno puede convertirse en una relación parásita y resultar en una grave enfermedad[6].

Muchos son los hongos que pueden causar enfermedad al ser humano, tales como *Trichophyton mentagrophytes* (Pie de atleta), *Trichophyton rubrum* (Onicomycosis), *Aspergillus* (Aspergilosis), por mencionar algunos. Sin embargo uno de los más importantes en cuanto a micosis oportunistas se refiere es *Candida albicans*, ya que a nivel intrahospitalario las infecciones del torrente sanguíneo causadas por esta levadura han aumentado de un 29 a 50% en las últimas dos décadas [7], destacando el hecho de que a éste hongo lo encontramos como un comensal inofensivo en la mayoría de las personas sanas, sin embargo, esta condición puede cambiar radicalmente si el paciente desarrolla un estado de inmunosupresión, desarrollando así la capacidad de causar infecciones sistémicas superficiales y potencialmente mortales [8].

C. albicans es un hongo polimórfico [9] ya que puede presentar morfología levaduriforme o bien, crecer como hongo filamentoso formando hifas verdaderas, éste es un organismo eucarionte, diploide, desprovisto de reproducción sexual que puede desarrollarse, multiplicarse y colonizar diferentes ambientes. Su nombre proviene del latín *candidus* y *albicans*, participio presente de *albicare* (blanco).

Esta especie se ubica en la siguiente clasificación taxonómica:

Phylum *Ascomycota*
Subphylum *Saccharomycotina*
Clase *Saccharomycetes*
Orden *Saccharomycetales*
Familia *Saccharomycetaceae*
Género *Candida*
Especie *C. albicans*

Esta levadura puede habitar en las membranas mucosas de la cavidad oral y vaginal, así como en el tracto gastrointestinal y respiratorio de los humanos formando parte de la microbiota normal de estos tejidos, lo cual lo hace un microorganismo muy versátil. Es un patógeno oportunista por excelencia, ya que un descontrol o desequilibrio de los mecanismos de defensa del hospedero es aprovechado por este hongo para desarrollarse y establecer la infección [10-19].

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.

FACTORES DE VIRULENCIA DE C. albicans

Los factores de virulencia son las estrategias con las cuales agentes patógenos al ser humano llegan a producir invasión, infección, modulación de la respuesta inmune a su favor y dificultad en el tratamiento contra ellos. Esto sumado a características del huésped, de las cuales toman ventaja, como la humedad en ciertas áreas del cuerpo, la inmunosupresión y la presencia de artefactos médicos invasivos [20].

Es importante destacar que para un microorganismo comensal, sobrevivir en diferentes nichos del huésped es crucial, las especies de *Candida* se encuentran continuamente en un entorno hostil, evadiendo el sistema inmune del hospedero, cambios de pH, así como competencia por adquisición de nutrientes con otros microorganismos de la microbiota [6, 21, 22].

C. albicans no es la excepción, ya que esta levadura posee diversos atributos celulares y moleculares que le permiten el desarrollo y establecimiento de una infección [23]. Bajo ciertas condiciones y presentando el huésped un cuadro de susceptibilidad, el delicado equilibrio entre huésped y hongo se rompe [6], siendo este capaz de causar infecciones superficiales y sistémicas, siendo el hongo patógeno principal del ser humano [24].

A continuación se describen, de manera independiente, cada uno de estos factores.

Cambio Morfológico

El cambio morfológico o morfogénesis se refiere a la transición entre las levaduras (unicelulares) y la forma de crecimiento filamentosa del microorganismo, que puede convertirse de forma reversible de levadura a células con crecimiento de hifa o pseudohifa [6].

Si bien este tipo de cambio morfológico es de gran importancia para la levadura, por consiguiente esta reacciona a un determinado número de señales del medio donde se desarrolla, tales como, pH y temperatura, mencionándose que estos son determinantes para el cambio morfológico [22]. Investigaciones han demostrado que la fase levaduriforme se favorece a una temperatura de 25°C y un pH ácido, sin embargo para propiciar el crecimiento de hifas es necesaria una temperatura de 37°C y un pH neutro [20], así como la presencia de suero, considerando el pH como un inductor potencial para la diferenciación y desarrollo de la levadura [25].

Formación de Tubo Germinativo

C. albicans es un miembro benigno de la microbiota de la mucosa, pero puede causar infecciones en esta, así como infecciones invasivas diseminadas, que pueden amenazar la vida de individuos susceptibles. La penetración del hongo en los tejidos del huésped marca, en muchos casos, el límite del proceso infeccioso, ya que *C. albicans* generalmente no continúa la invasión en el huésped inmunológicamente sano [26]. Debido a esto, la capacidad para cambiar de levadura a la forma de crecimiento de hifas de *C. albicans* es uno de los atributos de virulencia más investigados [27].

Destacando el hecho de que esta levadura tiene la particularidad de poder hacer cambios reversibles entre las formas de levadura, hifa y pseudohifa [28], en comparación de otros patógenos fúngicos dimórficos del ser humano, tales como *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Penicillium marneffeii* que normalmente crecen en forma filamentosa fuera del cuerpo humano pero se convierten en levaduras en los tejidos humanos [29], *C. albicans* por su parte puede crecer de ambas formas dentro del huésped, confiriéndole una alta plasticidad morfológica [27] (Figura 1).

Como tal, la morfogénesis se refiere a la transición entre las levaduras (unicelulares) y la forma de crecimiento filamentosa del microorganismo, que puede convertirse de forma reversible a células de levadura, con crecimiento de hifa (figura 1) o pseudohifa [6].

La conversión de levadura a hifa se realiza por medio de una estructura denominada tubo germinativo, el cual por definición es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que su célula madre [30] a este cambio en la estructura de la levadura se denomina transición dimórfica y es, como se había mencionado, un proceso reversible. La transición morfológica levadura-micelio es un proceso multifactorial cuya regulación no está todavía claramente determinada, sin embargo, se tiene conocimiento de que esta conversión depende de factores ambientales como pH, temperatura, fuente de carbono, entre otros [31-33].

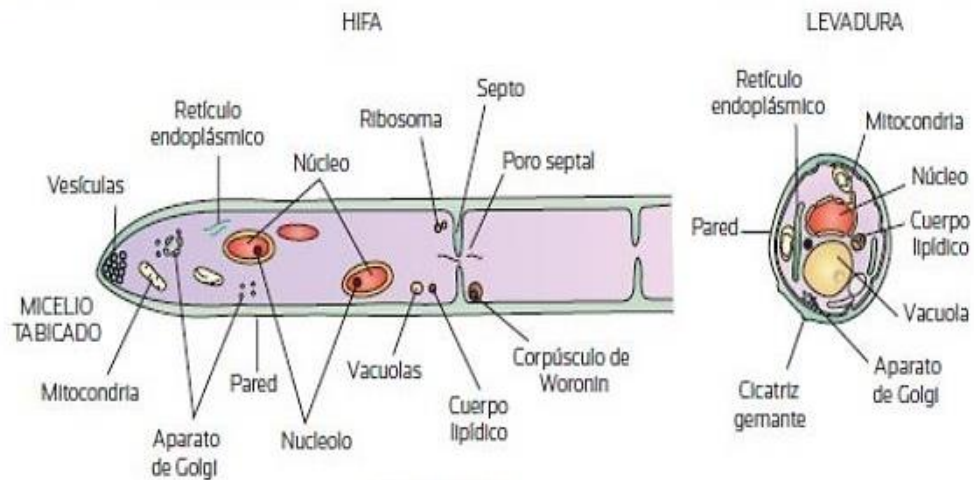


Figura 1. Hifa (corte longitudinal), Levadura (Corte transversal) [1]

Se ha comprobado que el crecimiento de forma filamentososa tiene ventajas sobre la levadura en la penetración de la célula o tejido y aunque la hifa puede ser idónea para abrir la brecha entre las barreras tisulares, gracias a que su punta es el sitio de secreción de enzimas capaces de degradar proteínas, lípidos y otros componentes celulares, ésta facilita su infiltración en sustratos sólidos y tejidos [34]. *C. albicans* también utiliza el tigmotropismo como mecanismo guía para la penetración profunda del epitelio [35] y no solo eso, se ha comprobado que levaduras que son fagocitadas por macrófagos tienen la capacidad de formar hifas dentro de éstos, perforándolos y dando muerte a estas células del sistema inmune [21].

Adhesión

Otro de los factores de virulencia realmente importante para *C. albicans* es la adhesión al epitelio del hospedero, ya que es un prerequisite para la colonización, y un paso fundamental para el establecimiento de la infección [10, 36-39]. Después de colonizar las superficies mucosas del hospedero, las especies de *Candida* pueden

invadir el espacio vascular, penetrando la barrera mucosa, donde continúan desarrollándose, causando enfermedad hematógena diseminada [40]. Sin este paso fundamental sería imposible que se desarrolle la invasión del tejido.

La fase inicial de la adhesión de *C. albicans* al acondicionador de tejidos es mediada por factores no específicos (hidrofobicidad superficial y fuerzas electrostáticas) y por componentes de la pared celular (manoproteínas y proteínas fibrilares) que actúan como adhesinas y reconocen receptores en células epiteliales, matriz extracelular y superficies colonizadas por estreptococos bucales [41, 42]. Una vez adherido, el microorganismo puede reproducirse, desarrollar biopelículas, cambiar su tipo de crecimiento del estado de blastoconidio a pseudohifas e hifas verdaderas, las cuales pueden guiar su crecimiento a través de contacto por las discontinuidades de las células de la mucosa bucal, penetrar entre ellas, invadir tejidos profundos y dificultar la fagocitosis [43, 44].

Tipos de Adhesinas e Importancia

Existen diferentes tipos de proteínas que se expresan en la pared celular de *C. albicans* involucradas con la adhesión de la misma, conocidas como adhesinas, las cuales se pueden definir como una biomolécula que promueve la adhesión a la célula huésped o a los ligandos de la misma [6, 20, 45], estas se unen a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamífero, como fibronectina, laminina, fibrinógeno y colágeno tipo I y IV [3, 37, 39]. El gran repertorio de adhesinas desplegado por esta levadura refleja la variedad de sitios en el hospedero que pueden ser invadidos [36, 37, 39] así bien la expresión de cada una de ellas depende, entre otras cosas, del sitio en el que se instale la levadura. Por otro lado la interacción de estas adhesinas con el hospedero también tiene implicaciones directas para la patogénesis, ya que pueden modular (activar o inhibir) la respuesta inmune [40].

Cuadro 1. Principales Adhesinas presentes en *C. albicans*.

Proteína	Ligando y/o función	Referencia
Als	Glicosilfosfatidilinositol (GPI). Familia de 8 proteínas relacionadas con el proceso de adhesión a las células del huésped	[6, 20, 46, 47]
HWp1p	β -glucano de la pared celular. Facilita adherencia a las células epiteliales orales, ayuda a la filamentación.	[6, 48, 49]
Int1p	Laminina y colágeno tipo I y IV. Esencial en adhesión y filamentación	[6, 20, 45]
Mnt1p	Actúa como Mannosil transferasa.	[50]
Eap1	Interviene en la unión al poliestireno.	[20]
Mp65	Actúa como glucagonasa.	[51]

Formación de Biofilm

Una vez que *C. albicans* ha puesto en marcha toda la serie de mecanismos con los que cuenta para generar infección, comienza un tipo de crecimiento, que si bien no es exclusivo de este microorganismo, confiere características fundamentales para que el ataque sobre éste sea aún más complicado, a esto se le llama desarrollo de biofilm.

La formación de biofilms de *C. albicans* se distingue por la adhesión inicial de las células de levadura, seguida por la germinación y formación de microcolonias, filamentación, desarrollo de monocapa, proliferación y maduración (Figura 2) [6].

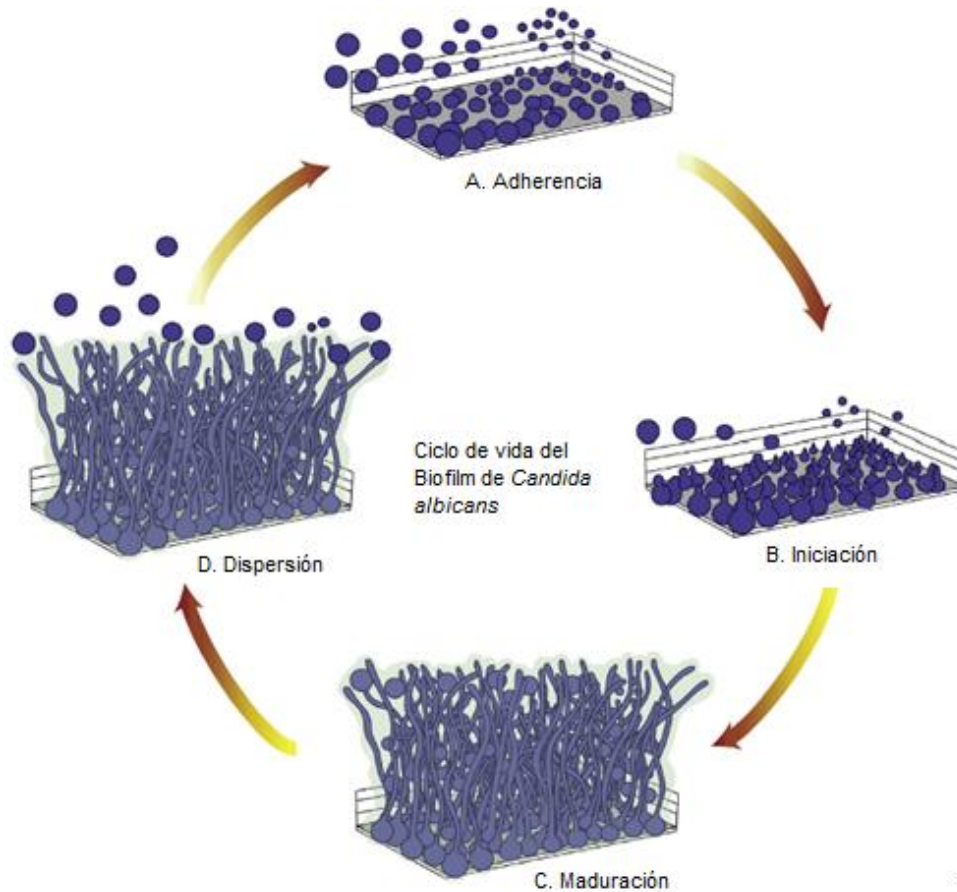


Figura 2. Formación del Biofilm de *Candida albicans* [52].

A. Adhesión de levaduras sobre superficie epitelial. B. Inicio de la formación del biofilm, donde las células proliferan para formar una capa basal de células adherentes. C. Maduración del biofilm, donde las capas complejas de células polimórficas se desarrollan y se entretrejen para convertirse en una matriz extracelular. D. Dispersión, donde las células levaduriformes salen de la biopelícula madura para infectar nuevos sitios.

Los biofilms consisten en una estructura de levaduras e hifas embebidas en una matriz extracelular producida por sí misma [20], se distingue por la adhesión inicial de

las células de levadura, seguida por la germinación y formación de microcolonias, filamentación, desarrollo de monocapa, proliferación y maduración [6], esto dificulta el tratamiento de pacientes con infecciones sistémicas, representando importantes repercusiones clínicas debido a su mayor resistencia a la terapia antifúngica y la capacidad de las células dentro de biofilms para soportar las defensas inmunitarias del huésped [53, 54] incluyendo también, falla en artefactos médicos como catéteres y válvulas cardíacas que le sirven al hongo como superficie de adhesión [55].

Rivera y colaboradores [6], mencionan que la formación de biofilms se manifiesta en tres fases: temprana (0 a 11 horas), intermedia (12 a 30 horas) y madura (38 a 72 horas).

Aunque no existen muchos estudios sobre los mecanismos implicados en la adhesión de las células fúngicas en general y de los hongos levaduriformes en particular, a substratos biológicos o inertes, en comparación con los abundantes trabajos que se han publicado sobre estos aspectos en relación con las bacterias, la importancia que sin duda tiene la capacidad de adherencia del agente patógeno a los tejidos y células del huésped como factor de virulencia, esto ha estimulado considerablemente el interés de los investigadores por estudiar dicho proceso en el caso de *C. albicans* [56]. Sin embargo, es importante destacar que el crecimiento de microorganismos adheridos a superficies se conoce desde hace mucho tiempo, pero ha sido hasta hace poco que se ha visto su gran impacto médico e industrial [57].

Secreción de enzimas

Las enzimas pueden proponerse como un factor de virulencia determinante en *C. albicans* [58], ya que tienen la capacidad de romper polímeros que proporcionan nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos, así como de inactivar las moléculas útiles en la defensa del organismo [6, 34]. De hecho la actividad proteolítica de la levadura fue la primera en describirse en 1965, mencionándose que de esta manera *C. albicans* era capaz de obtener nitrógeno para su metabolismo [59].

Tipos e Importancia

Tres son las diferentes enzimas extracelulares secretadas por *C. albicans* (proteasas, fosfolipasas y lipasas)

De manera particular la importancia de las aspartil proteasas (Asp) radica no sólo en su amplio número de miembros (10) sino en la especificidad que *C. albicans* ha desarrollado para la expresión de las mismas, siendo las diferencias de pH y los distintos sustratos donde la levadura puede instalarse, los que determinan esta expresión [60], incluso cepas que han sido expuestas a diferentes antifúngicos expresan una mayor cantidad de estas enzimas a manera de protección [58].

Otras de las enzimas con las que cuenta *C. albicans* son las fosfolipasas (PL), este es un grupo heterogéneo capaz de hidrolizar uno o más enlaces éster en los glicerofosfolípidos [59].

Cuadro 2. Tipo y función de las enzimas extracelulares de *C. albicans*.

Enzima	Tipo	Función	Referencias
Asp	Aspartil proteasas	Asp1, Asp 2, Asp 3 Secretadas por levaduras, contribuyen al daño tisular e invasión del epitelio oral y la epidermis. Asp 4, Asp 5, Asp 6 Secretadas por hifas, importantes en infección sistémica y defensa contra macrófagos	[20, 61, 62]
PLB	Fosfolipasa	PLB1 Ha demostrado ser necesaria para la virulencia en modelo animal de candidiasis. PLB1A Se secreta y detecta en la punta de las hifas durante la invasión a los tejidos.	[6]
PLA, PLC y PLD	Fosfolipasas	Ayudan a <i>C. albicans</i> a hidrolizar proteínas del hospedero como colágeno, laminina, fibronectina, mucina, lactoferrina e inmunoglobulinas.	[20]
LIP1-LIP10	Lipasas	La activación de estas enzimas depende del estado de infección más que del lugar de la misma.	[6, 20]

Los factores de virulencia (explicados anteriormente) están encaminados al desencadenamiento de un proceso infeccioso en el huésped, produciendo un cuadro clínico que recibe el nombre de candidiasis.

CANDIDIASIS

C. albicans puede producir distintos tipos de infecciones conocidas genéricamente con el nombre de candidiasis. En realidad este término se refiere a cualquier infección causada por especies del género *Candida*. El desarrollo de la enfermedad se puede dividir en cuatro etapas:

1. Colonización: en ésta participan la adhesión epitelial y adquisición de nutrientes por medio de la acción de adhesinas, enzimas hidrolíticas, formación de hifas y cambio de fenotipo.
2. Infección superficial: en esta etapa es importante la penetración epitelial por medio de degradación de proteínas del hospedero por enzimas hidrolíticas y formación de hifas.
3. Infección profunda: participan la penetración tisular, invasión vascular y evasión inmune por medio de enzimas hidrolíticas y también la formación de hifas.
4. Infección diseminada: *C. albicans* la realiza a través de la adherencia al endotelio, infección de tejidos del hospedero, activación del sistema de coagulación por intervención de adhesinas, enzimas hidrolíticas, formación de hifas nuevamente y cambio de fenotipo. Estudios *in vitro*, en animales y humanos, han implicado a las proteinasas como factor de virulencia en *C. albicans* [61].

Esta enfermedad puede llegar a producir un amplio espectro de estados clínicos, que van desde las enfermedades agudas de membranas y la piel, a las crónicas que a veces pueden llegar a ser mortales, también encontramos las de tipo sistémico, esta última constituye un problema creciente especialmente en pacientes inmunocomprometidos [63] ya que su diagnóstico es difícil debido a la ausencia de síntomas patognomónicos de la enfermedad y a la dificultad de aislar el hongo en los hemocultivos. Esta dificultad diagnóstica puede hacer que el tratamiento antifúngico

se inicie tardíamente, lo cual incrementa la morbilidad y mortalidad en estos pacientes [64]. La infección es favorecida por la desaparición de uno o más de los diversos factores de defensa del huésped, tanto generales como locales, incluyendo pequeñas desintegraciones y rupturas en mucosas o piel [65].

La candidiasis puede agruparse en tres categorías:

1. **Candidiasis cutánea.** La infección de la piel, uñas y mucosas por *Candida* puede ser causada por condiciones que dan como resultado la maceración crónica de estas áreas, cambios fisiológicos en el huésped o estado inmune comprometido [66]. Un ejemplo es el intertrigo que se presenta en pliegues húmedos de la piel, entre las nalgas o ingles de personas con obesidad o en los dedos de trabajadores que conservan sus manos todo el día en el agua y suelen tener la piel macerada [65].

2. **Candidiasis sistémica.** Numerosas manifestaciones sistémicas de candidiasis pueden ocurrir luego de la introducción de *Candida* en el torrente circulatorio. Puede haber candidemia como resultado de contaminación de catéteres, procedimientos quirúrgicos, traumatismo de la piel o tracto gastrointestinal o aspiración [66]. Durante la diseminación, la infección puede afectar prácticamente cualquiera o muchos órganos, en especial riñones, sistema nervioso central, corazón y ojos [65].

3. **Candidiasis mucocutánea crónica (CMC).** Esta condición se define como una condición invariablemente con *C. albicans* de cualquiera o de todas las superficies epiteliales del cuerpo, piel, mucosa oral, tracto respiratorio superior, epitelio gastrointestinal, urinario y genital, cabe mencionar que la CMC comienza tempranamente y a menudo persiste durante toda la vida [66].

Candidiasis vulvovaginal (CVV)

Todas las infecciones del aparato genital femenino presentan una sintomatología que puede ser común. Resulta muy difícil distinguir dichas infecciones entre sí solo sobre la base de la sintomatología, siendo absolutamente necesario fundamentarse en la exploración y el estudio microbiológico para establecer el diagnóstico [67].

La CVV fue descrita por primera vez por J.S. Wilkinson en 1949 al establecer una relación entre la existencia de hongos en la vagina y la aparición de una vaginitis. A partir de ese momento los conocimientos fueron evolucionando progresivamente [68]. La frecuencia de esta enfermedad se observa principalmente en mujeres con diabetes, embarazadas o en pacientes tratadas con anticonceptivos orales. La infección se caracteriza por la presencia de secreción espesa y grumosa, de aspecto lechoso, blanca o blanco-amarillenta (con aspecto de leche cortada) y placas pseudomembranosas de color blanco grisáceo, que se encuentran en la mucosa vaginal, así como inflamación vulvar y vaginal e incluso fisuras [67]. Toda la zona genital está muy inflamada y por lo general, el prurito es intenso [69, 70]. Se puede presentar como episodio aislado o como episodios recurrentes. Entre el 5 y el 10% de mujeres sufren episodios recurrentes de vulvovaginitis [71].

Se ha reconocido que la CVV es un proceso muy común en las mujeres adultas, con un pico máximo de incidencia entre los 20 y 40 años. Se calcula que a los 25 años, del 40 al 50% de las mujeres habrá tenido al menos un episodio de CVV [72-74] y se calcula que alrededor del 5% de las mujeres que han sufrido de CVV tienen cuadros recurrentes de la enfermedad [75].

El incremento de la prevalencia de las infecciones fúngicas observado en las últimas décadas ha producido un aumento en la utilización de fármacos antifúngicos, tanto así, que en la actualidad se cuenta con clasificaciones de los tipos de

antifúngicos, espectro de acción y mecanismos de acción de cada uno de ellos, mismos que serán descritos a continuación.

ANTIFÚNGICOS

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de la célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, ya sea, directa o indirectamente, facilitando los sistemas de defensa del huésped [76].

Algunas de las familias más representativas y comerciales de antifúngicos se describen a continuación:

Polienos

Los polienos son macrólidos con cadenas insaturadas con una gran actividad antifúngica. Existen cientos de compuestos de esta clase cuyas características son una escasa biodisponibilidad digestiva, una baja solubilidad en agua y su alta toxicidad, lo que obligó a detener el desarrollo de casi todas estas moléculas, a excepción de anfotericina B y de nistatina [77, 78]. La nistatina es producida a partir del un actinomiceto *Streptomyces noursei*, siendo el primer antifúngico de su clase, sus características corresponden a la de una molécula del tipo polieno tetraeno [76]; se tiene conocimiento de que en su formulación convencional produce unos efectos tóxicos tan graves que no puede emplearse en infusión parenteral y sólo se emplea en forma de ungüentos o soluciones en infecciones superficiales.

La anfotericina B ha sido durante casi cuatro décadas el único fármaco disponible para el tratamiento de la infección fúngica invasora [79], no obstante es casi el único tratamiento eficaz de las infecciones fúngicas sistémicas de mediados del siglo XX.

Mecanismo de acción

Para la Nistatina el mecanismo de acción reportado se basa en la unión de la molécula al ergosterol de la membrana fúngica, alterando la permeabilidad de esta, lo que permite una pérdida de potasio (K^+) glúcidos y metabolitos, con la consiguiente muerte celular [80].

En el caso de la anfotericina B, su mecanismo de acción se debe a la interacción directa con el ergosterol de la membrana celular fúngica, la anfotericina B no interfiere con la síntesis de membrana sino que la desestabiliza, facilitando la formación de canales con la pérdida consecuente de iones y componentes celulares [81]. En lo que a *C. albicans* se refiere dicho antifúngico actúa inhibiendo una bomba de protones induciendo la peroxidación de los lípidos de las membranas [82].

Los polienos en general, se unen a todos los esteroides, aunque muestran una mayor afinidad por el ergosterol que forma parte de la membrana fúngica. La unión con los esteroides de membrana genera la formación de canales por los que la célula fúngica pierde iones y moléculas. También se une con esteroides intracelulares causando daños celulares, principalmente en las vías de la respiración celular y, además, tiene efectos inmunomoduladores, ya que puede activar algunas funciones de los linfocitos, como la secreción de linfoquinas [83].

Azoles

Los azoles constituyeron uno de los principales avances terapéuticos de la micología. Son moléculas sintéticas con un anillo de cinco carbonos unido a una cadena alifática con un grupo fenilo. Existen dos familias de azoles que se distinguen por las moléculas de nitrógeno que contiene el anillo azólico, dos en el caso de los imidazoles y tres en el de los triazoles. Los triazoles como fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol muestran una afinidad cientos de veces superior por las

enzimas fúngicas que por las enzimas humanas, de ahí que muestren mucha menos toxicidad que los imidazoles, por lo que pueden administrarse a dosis más elevadas.

Mecanismo de Acción

Los azoles actúan inhibiendo la enzima citocromo P-450 que interviene en la síntesis del ergosterol, que es el mayor esteroide de la membrana celular del hongo. Se ligan a un nitrógeno libre del anillo azol inhibiendo la 14 α demetilación del lanosterol, llevando a la depleción del ergosterol, lo que finalmente afecta la permeabilidad de la membrana del hongo y los sistemas enzimáticos unidos a la membrana, involucrados en la síntesis de la pared celular. La selectividad de los azoles por la enzima P-450 del hongo está dada por la unión del N1 del grupo aromático de los azoles a aminoácidos específicos de la membrana celular del hongo que no están presentes en las proteínas de los mamíferos [84].

Equinocandinas

Las equinocandinas son lipopéptidos anfófilos semisintéticos, pertenecientes a una familia de fármacos de la clase de las candinas. Su actividad antifúngica fue descubierta por azar en sus dos prototipos: echinocandina B y aculeacín A en la década de 1970 [85], iniciando su desarrollo en 1974, aunque la aprobación para ser utilizadas en humanos no llegó hasta el año 2001, fecha en la que se licenció el primer fármaco de esta clase, caspofungina. En la actualidad disponemos, además de caspofungina, de otras dos equinocandinas con indicaciones clínicas, micafungina y anidulafungina [86].

Mecanismo de Acción

La principal novedad de estos antifúngicos es su mecanismo de acción, ya que actúan sobre la 1,3-beta-glucano sintetasa, enzima necesaria para la formación de polímeros de 1,3-beta-glucano, uno de los componentes de la pared fúngica. La inhibición de esta enzima reduce la síntesis del glucano, lo que causa inestabilidad osmótica en la célula fúngica y su posterior muerte [83]. Ellas se unen a una proteína FKS1P, pero aún no se sabe si el sitio de unión a esta proteína es interno o externo a la membrana celular [87].

Por desgracia actualmente los fármacos utilizados para combatir las infecciones micóticas tienen una serie de efectos adversos, en específico, la anfotericina B tiene efectos tóxicos a nivel renal, ya que es causante de nefrotoxicidad cuando es administrada por vía intravenosa, de igual manera el Ketoconazol es capaz de provocar efectos endócrinos en pacientes a los que se les administra [88]. Cabe mencionar que el papel cada vez más importante de los hongos dentro de las enfermedades infecciosas humanas ha ejercido una fuerte influencia sobre la investigación y desarrollo de nuevos y variados fármacos, con un mayor espectro de acción y menor toxicidad que los actuales [89].

MEDICINA TRADICIONAL

En todo el mundo, la medicina tradicional es el pilar principal de la prestación de servicios de salud, o su complemento. En algunos países, la medicina tradicional o medicina no convencional suele denominarse medicina complementaria, debe agregarse que la medicina tradicional es una parte importante y con frecuencia subestimada de la atención de salud. Se practica en casi todos los países del mundo, y la demanda va en aumento, se estima que aproximadamente el 80% de población

mundial recibe o utilizan la medicina tradicional para aliviar diversos padecimientos[90]. La medicina tradicional con calidad, seguridad y eficacia comprobadas contribuye a asegurar el acceso de todas las personas a la atención de la salud. Muchos países reconocen actualmente la necesidad de elaborar un enfoque coherente e integral de la atención de salud, que facilite a los gobiernos, a los profesionales sanitarios y, muy especialmente, a los usuarios de los servicios de salud, el acceso a la medicina tradicional de manera segura, respetuosa y efectiva [91].

La medicina tradicional mexicana, es el conjunto de sistemas de atención a la salud que tiene sus raíces en profundos conocimientos sobre la salud y la enfermedad que los diferentes pueblos indígenas y rurales de nuestro país han acumulado a través de su historia, fundamentados en una interpretación del mundo (cosmovisión), de la salud y enfermedad de origen prehispánico, que ha incorporado elementos provenientes de otras medicinas, como la medicina antigua española, la medicina africana y en menor medida por la interacción de la propia medicina occidental. En México la medicina tradicional, conforma lo que hoy llamamos el “sistema real de salud” de millones de mexicanos del siglo XXI, habitantes del campo y la ciudad, la cual está asociada fuertemente a las plantas medicinales, su recurso más abundante, accesible y conocido [92].

México cuenta con alrededor de 4 000 especies de plantas con flores (aproximadamente 15% de la flora total) que tienen atributos medicinales, es decir que más o menos una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en el 5% de estas especies [93].

Es importante destacar que dentro de la medicina tradicional muchos son los padecimientos para los que se utilizan las especies vegetales, pero el uso de determinadas especies sólo es difundido o se conoce en determinadas zonas, tal es el caso del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, donde el uso de su flora ha sido investigado,

llegando a realizarse listados [94, 95] que con ayuda de los pobladores son una de las mejores maneras de dar a conocer la riqueza que en cuanto a medicina tradicional se tiene en la zona.

Una de las varias familias de plantas utilizadas de manera tradicional para tratar y curar diversos padecimientos son las Burseraceae, estas son conocidas por producir aceites y resinas aromáticas apreciadas por la humanidad desde la antigüedad [96]. En México existen poco más de 100 especies diferentes de *Bursera* [97], mismas que se encuentran principalmente en las selvas caducifolias o bosques tropicales caducifolios [98]. En el México prehispánico algunas especies de Burseras eran utilizadas para aromatizar templos y de forma medicinal, siendo éste último uso el que direccionó recientes investigaciones, evidenciando las diferentes actividades biológicas de este género, pero en particular el aceite esencial de *Bursera morelensis* (aceitillo) ha demostrado no solo actividad antimicrobiana [99], anti-*candida* [92] incluso antiinflamatoria [100].

Esta especie como se menciona anteriormente no solo destaca por sus actividades biológicas, sino por el endemismo que presenta en el valle de Tehuacán-Cuicatlán.

ACEITES ESENCIALES

Por definición los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas [101, 102]. Estos son una mezcla compleja de moléculas, que generalmente contiene más de 20 componentes diferentes de bajo peso molecular con concentraciones muy variables [103]. Estas sustancias son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas, están constituidos por terpenos con actividad y composición variada; después de la

extracción generalmente son líquidos y rara vez sólidos o pastosos [104]. Diversas investigaciones han permitido establecer su actividad antibacteriana [96, 105], antiinflamatoria [92, 106, 107], antiparasitaria [105, 108], antiviral [102, 109], insecticida [110-112] e incluso antimicótica [100].

Clasificación y tipos de aceites esenciales

Los aceites esenciales están constituidos principalmente por dos grupos de distinto origen de biosíntesis [113-115]. El mayor de los grupos está compuesto por terpenos y terpenoides, además de otros constituyentes tanto aromáticos como alifáticos, todos caracterizados por un bajo peso molecular [102].

Los terpenos se forman por cinco carbonos unidos a los cuales se les da el nombre de isopreno. La biosíntesis de los terpenos se da por la ruta del ácido mevalónico [116], la cual, consiste en la síntesis por parte de su precursor, el isopentenil difosfato (IPP), la adición repetitiva de IPPs forma el precursor prenildifosfato, el cual dará lugar a las diferentes clases de terpenos, la modificación del prenildifosfato por sintetasas específicas de los terpenos ayudan a formar el esqueleto de éstos, finalmente la modificación enzimática secundaria en este esqueleto ayuda a la atribución de las diferentes propiedades funcionales de los terpenos. Muchos de los terpenos son monoterpenos (C_{10}) y sesquiterpenos (C_{15}), pero hemiterpenos (C_5), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}) son también parte de estos, así como los terpenos que contienen oxígeno que reciben el

nombre de terpenoides (Figura 3) [102].

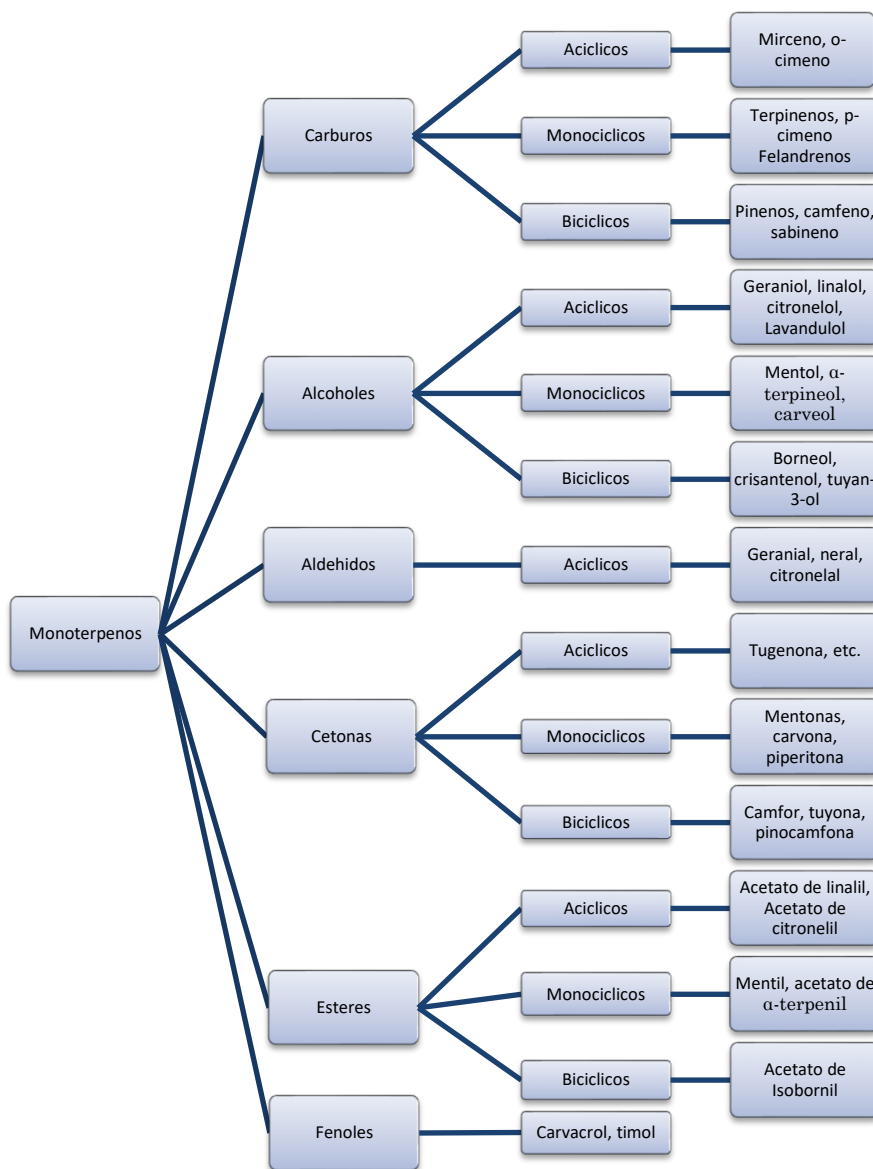


Figura 3. Clasificación y algunos ejemplos de Monoterpenos [102].

Los monoterpenos son el grupo más representativo en los aceites esenciales y se obtiene de la unión de dos unidades de isopreno (C₁₀), constituyendo el 90% de las

moléculas presentes en los mismos. Razón por la cual estos compuestos tienen una gran variedad, la cual se representa en la figura 3.

Los sesquiterpenos están formados por el ensamble de tres unidades de isopreno (C_{15}), la extensión de la cadena aumenta el número de ciclizaciones que da lugar a una gran variedad de estructuras. La estructura y función de los sesquiterpenos es muy similar a los monoterpenos y su clasificación se muestra en la figura 4.

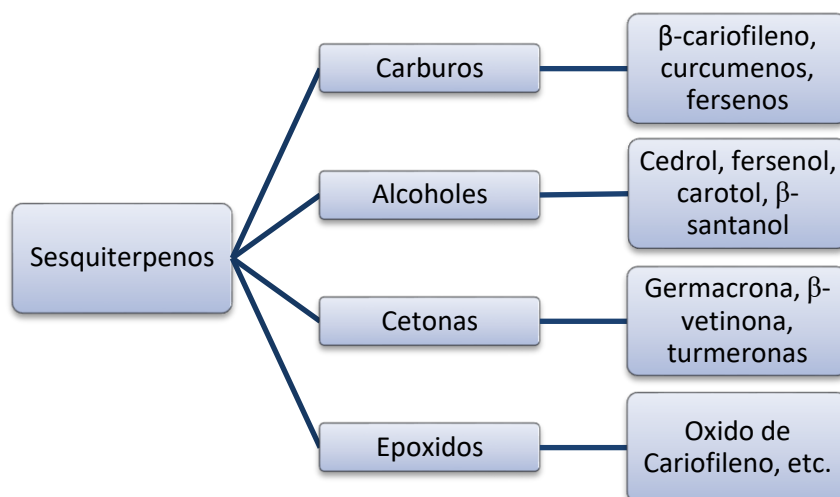


Figura 4. Clasificación y ejemplos de Sesquiterpenos [102, 117].

Los compuestos aromáticos son derivados del fenilpropano y se encuentran en menor cantidad que los terpenos. Las rutas biosintéticas de los terpenos y fenilpropanoides generalmente están separadas dentro de las plantas, pero existen ocasiones en que estas pueden coexistir, dando lugar a este tipo de compuestos.

Los aceites esenciales son una alternativa para el tratamiento de candidiasis, ya que se conoce de su actividad antifúngica tanto *in vivo* como *in vitro* [118], de manera específica el aceite esencial de *B. morelensis* ha demostrado gran capacidad de inhibición contra microorganismos [92, 96], cabe destacar que *B. morelensis*

(Apéndice 1) además de ser una especie endémica, sus aceites son utilizados tanto en la cosmética, ceremonias religiosas, así como en la medicina popular [119], además de su gran importancia ecológica al ser una especie endémica del valle de Tehuacán-Cuicatlán.

2. Pregunta de investigación

¿Cuáles serán los mecanismos de acción del aceite esencial de *B. morelensis* sobre *C. albicans*?

3. Hipótesis

Si se ha demostrado que el aceite de *B. morelensis* inhibe el crecimiento de *C. albicans* y para que se dé la infección de este microorganismo se requieren de procesos de morfogénesis, adhesión, formación de biofilms y secreción de proteasas, entonces, es probable que el aceite actúe a nivel de estos procesos.

4. OBJETIVOS

4.1 *Objetivo General*

Evaluar las propiedades anti-*Candida* del aceite esencial de *B. morelensis*.

4.2 *Objetivos Particulares*

1. Determinar la composición química del aceite esencial de *B. morelensis* con una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).
2. Determinar la actividad (cualitativa y cuantitativamente) del aceite esencial sobre *C. albicans*.
3. Determinar la actividad del aceite esencial sobre algunos mecanismos de patogenicidad (formación del tubo germinativo, formación de biofilm, expresión de la proteína INT1p, síntesis de enzimas y adhesinas) de *C. albicans*.
4. Evaluar la actividad *in vivo* del aceite esencial de *B. morelensis* sobre la infección ocasionada por *C. albicans*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención del aceite esencial

B. morelensis fue colectada en el poblado de San Rafael Coxcatlan Puebla en abril de 2011. A partir del tronco se obtuvo el aceite esencial por la técnica de arrastre de vapor.

5.2 Obtención de compuestos puros

Los compuestos α pineno y γ terpineno fueron comprados a Sigma-Aldrich.

5.3 Análisis de la composición química

El análisis del aceite esencial de *B. morelensis* se realizó mediante una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) utilizando un Cromatógrafo modelo 6850 acoplado a un Espectrómetro de masas modelo 5975C, marca Agilent Technologies. El análisis se llevó a cabo utilizando una columna HP-5MS de marca Agilent Technologies, de 30 metros de longitud, 0.25 mm diámetro interno y película de 0.25 μm , el tipo de inyección fue *Split*, y la cantidad de muestra empleada fue 1 μL . Las condiciones de separación fueron a una temperatura inicial de 70°C durante dos minutos aumentando con dos rampas de calentamiento, la primera a 20°C por minuto hasta los 230°C; y la segunda, aumentando 8°C por minuto hasta los 280°C y se mantiene durante cinco minutos, el gas de acarreo fue He. El flujo inicial en la columna fue de 1 mL/min, con una presión de 61.85 Kpa (8.77psi) y una velocidad lineal de 30 cm/s. El tiempo total del análisis fue de 25 minutos. El rango de masas detectado fue de 35m/z a 750m/z, la muestra se ionizó por impacto electrónico a 70 eV, la temperatura alcanzada de la fuente de ionización fue de 230°C, y el cuadripolo de 150°C. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de la base de datos de la biblioteca NIST Versión 8.0.

5.4 Cepas Fúngicas

Las cepas utilizadas fueron *C. albicans* ATCC 14065, *C. albicans* (donada por la M. en C. María de Jesús Sánchez Onofre de la FES-Cuautitlán), *C. albicans* ATCC 32354 y *C. albicans* CDBB-L- 1003.

5.5 Evaluación Cualitativa

La evaluación de la actividad anti-*Candida* cualitativa se realizó por medio de la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer [120] (Ápndice 3), donde se impregnaron sensidiscos con 5 µL del aceite esencial o los compuestos puros, como control positivo se impregnaron sensidiscos con 25 µg de Nistatina. Los resultados se obtuvieron midiendo el diámetro del halo de inhibición, el resultado se reporta en mm (milímetros). Todos los bioensayos se realizaron por triplicado. El análisis inferencial fue realizado por medio de un análisis de varianza bifactorial.

5.6 Evaluación Cuantitativa

Se determinó la Concentración Fungicida 25 (CF₂₅), CF₅₀, CF₇₅ y Concentración Fungicida Mínima (CFM) por la microtécnica de dilución en caldo [121] (Ápndice 4), utilizando un abanico de diferentes concentraciones (8.0, 6.0, 4.0, 3.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL) para el aceite esencial. En el caso de los compuestos puros las concentraciones utilizadas fueron 16.0, 14.0, 12.0, 10.0, 8.0, 6.0, 4.0, 2.0, 1.0 mg/mL. Cada bioensayo se realizó por triplicado.

5.7 Inhibición del Crecimiento del Tubo Germinativo

Se llevó a cabo una prueba para evaluar la inhibición del crecimiento del tubo germinativo por el método descrito por Ishida y colaboradores en 2006 [122] (Ápndice 5), donde las concentraciones utilizadas fueron determinadas mediante los resultados obtenidos en la prueba cuantitativa, cada una de las muestras se contaron en cámara de Neubauer. Como control negativo se usó Tween 80. El crecimiento del tubo germinativo se indujo utilizando Suero Fetal Bovino (SFB) como medio de crecimiento, de 2 a 4 h. Después de la interacción se toma una alícuota de 10 µL y se coloca en la

cámara de Neubauer donde se buscó la presencia de crecimiento del tubo germinativo. Se reportó el porcentaje de inhibición por concentración, así como la CI_{50} (concentración inhibitoria al 50%)..

5.8 Tinción con blanco de Calcofluor y yoduro de propidio

La interacción del aceite esencial con la cepa 14065 fue teñida con blanco de calcofluor [1] y yoduro de propidio, a la concentración de CFM (2.0 mg/mL) y a la concentración de 10.0 mg/mL (cinco veces por encima de la anterior), esto con el fin de observar los cambios estructurales que pudieran presentar las levaduras después de la interacción con el aceite esencial de *B. morelensis*, el tubo control constó de Levadura y SFB, se utilizó un microscopio de luz con campo claro y fluorescencia.

5.9 Expresión del gen int1

Para evaluar la capacidad de adhesión es necesario determinar el nivel de expresión del gen *int1*, para lo cual se utilizó la técnica descrita por Khodavandi y colaboradores en 2011 [123] (Ápndice 6), donde primero se hizo la interacción de la cepa 14065 con el aceite de *B. morelensis*, así como los compuestos puros α -pineno y γ -terpineno, realizándose posteriormente la extracción del RNA. Para evaluar la expresión del gen se realizó un RT-PCR utilizando los *primers* descritos en dicha investigación. Se utilizaron *primers* específicos para Actina.

5.10 Estudio in vivo

Este estudio se realizó con ratones CD1 hembras de 7 semanas, las cuales fueron sincronizadas 6 días previos a las inoculaciones. Los animales se mantuvieron en condiciones de pseudoestro mediante una inyección vía subcutánea de 0.2 mg de valerato de estradiol en 100 μ L de aceite de ajonjolí administrada semanalmente durante el tiempo que duró el experimento.

5.10.1 Inoculación y producción de la infección

Seis días después de la primera inyección de Valerato de estradiol se comenzó a provocar la infección vía vaginal, con un inóculo de levaduras (1×10^9 células), el cual fue administrado en dos ocasiones con un intervalo de 24 horas [75].

5.10.2 Tratamiento a base de aceite esencial

Se utilizaron grupos con una N= 5 ratones (sexo femenino), descritos en el cuadro 3.

Cuadro 3. Grupos de tratamientos en modelo murino de candidiasis vaginal

Grupos Control	Grupos experimentales
Sanos	Infección y tratamiento con aceite esencial por 24 y 48 horas.
Infección sin tratamiento	Infección y tratamiento con Nistatina por 24 y 48 horas.
Infección e inoculaciones de aceite de ajonjolí (C-)	Infección y tratamiento con aceite esencial por 15 días.
Infección y sacrificio a las 3, 24, 48 y 72 horas.	
Infección y sacrificio a los 15 días	

El tratamiento con aceite esencial, así como los grupos control se establecieron calculando los mg/Kg de peso de los ratones.

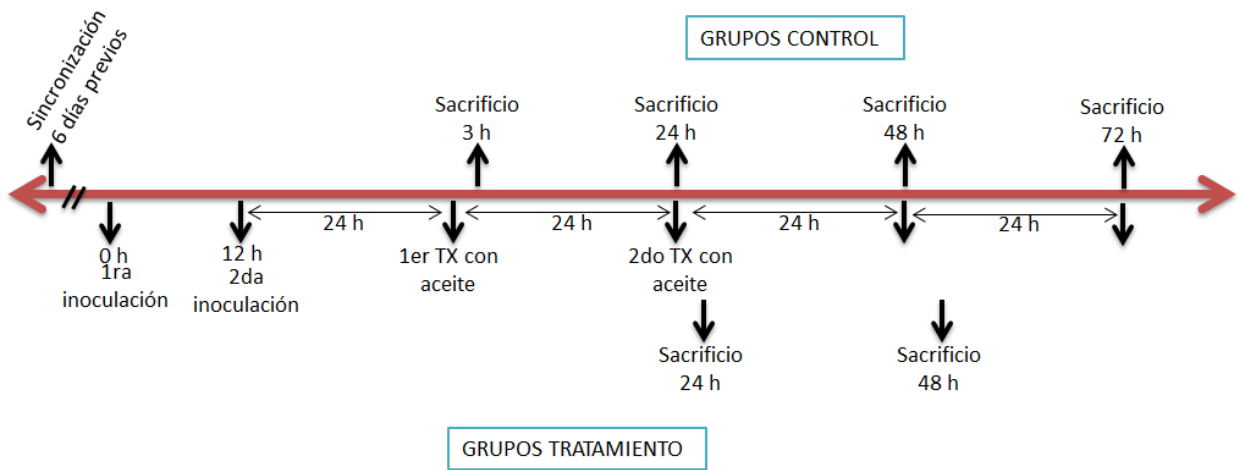


Figura 5. Esquema de sincronización, inoculaciones, tratamientos y sacrificio dentro del modelo experimental murino

5.10.3 Histología

Para el análisis histológico se llevó a cabo la remoción de la vagina a las 3, 24, 48 y 72 horas después de la infección, esta fue fijada con fijador de Zinc, posteriormente se realizó la técnica histológica habitual (apéndice 8). Se obtuvieron cortes de 5 μ m los cuales fueron procesados con la tinción de P.A.S (Reacción del ácido peryódico de Schiff) [75].

6. RESULTADOS

6.1 Rendimiento

Dentro de esta investigación fue importante determinar el rendimiento del aceite, ya que este dato puede ayudar en futuras investigaciones, debido a que se sabe que el rendimiento en cuanto a aceites esenciales se refiere es relativamente bajo. Como se observa en el Cuadro 4 se obtuvieron 1.340 g de aceite esencial de 870 g de material fresco (ramas).

Cuadro 4. Rendimiento del aceite esencial de *Bursera morelensis*

	Material fresco (g)	Aceite esencial (g)	Porcentaje	Densidad (g/mL)
<i>Bursera morelensis</i>	870	1.340	0.149	0.82

6.2 Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas

Ya que el aceite esencial es una mezcla de compuestos de naturaleza no polar principalmente, este fue sometido a un análisis por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría Masas (Figura 6). Se obtuvieron 13 compuestos que constituyen el aceite de la especie, los tiempos de retención y abundancia se muestran en el Cuadro 5.

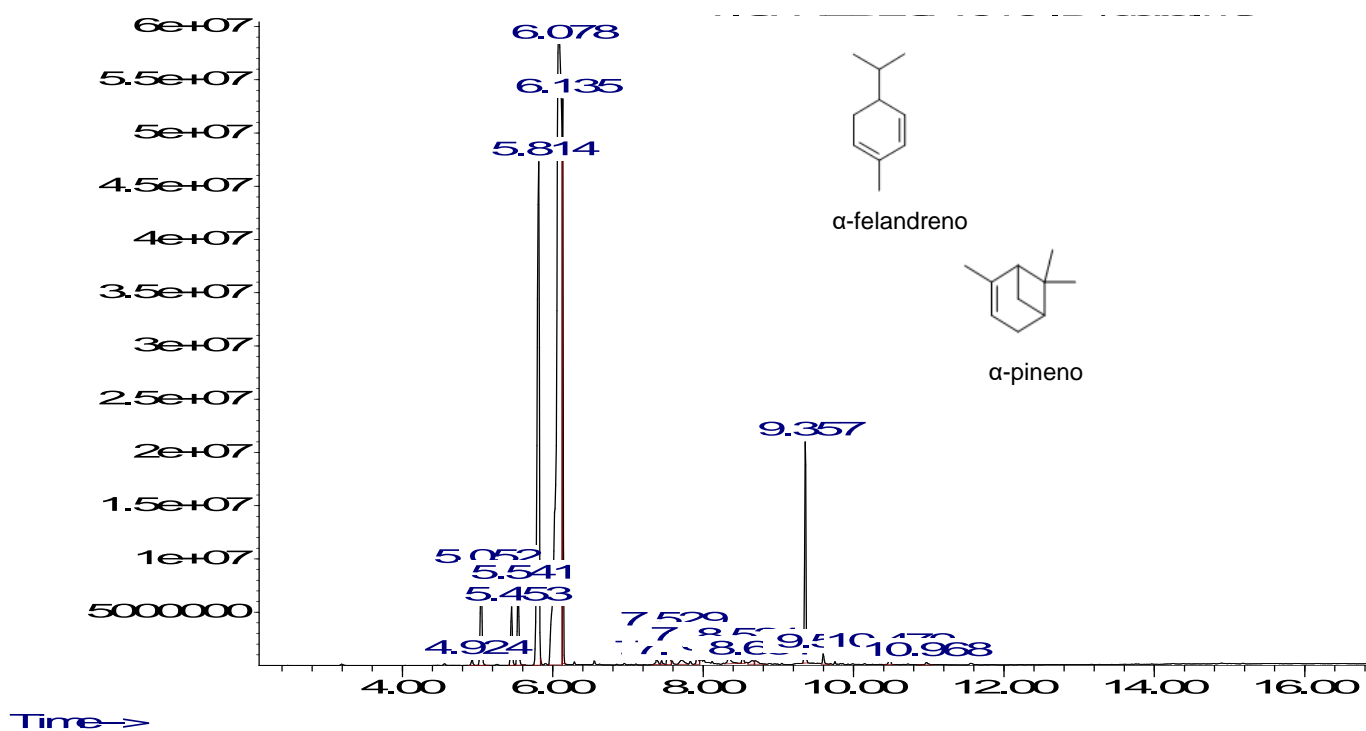
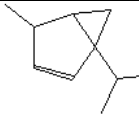
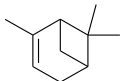
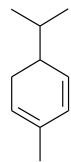
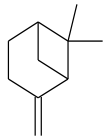
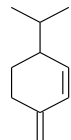
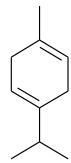
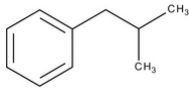
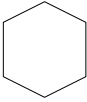
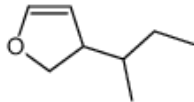
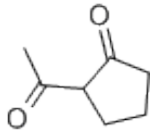
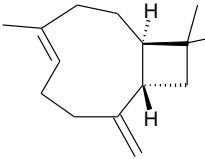
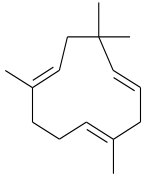


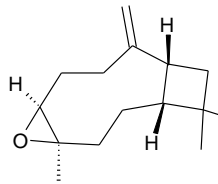
Figura 6. Cromatograma de gases del aceite esencial de *B. morelensis*

El compuesto con la mayor abundancia fue el γ -terpineno, con un porcentaje del 65.46 %, seguido del β -felandreno con un total del 18.27%, en tercer lugar se encuentra el α -cariofileno (5.13%) y por último el α -pineno (2.85%).

Cuadro 5. Compuestos que integran el aceite esencial de *B. morelensis*.

Nombre	Tiempo de retención (min)	% Total	Estructura Química
Tuyeno	4.924	0.15	
α -pineno	5.052	2.85	
α -felandreno	5.453	1.58	
β -pineno	5.541	2.30	
β -felandreno	5.814	18.27	

γ -terpineno	6.078	65.46	
Isobutilbenceno	7.714	0.32	
Ciclohexano	8.339	0.44	
4-butano-2-yl-2,3-dihidrofurano	8.531	0.39	
2-Acetilciclopentanona	8.651	0.46	
Cariofileno	9.357	5.13	
α -cariofileno	9.597	0.27	

Óxido de Cariofileno	10.479	0.34	
----------------------	--------	------	---

6.3 Evaluación Cualitativa

Dentro de este ensayo fueron utilizadas cuatro diferentes cepas de *C. albicans*, se evaluó la actividad del aceite de *B. morelensis* y dos de los compuestos presentes en el aceite esencial de *B. morelensis*, γ -terpineno y α -pineno, siendo el primero el compuesto con mayor abundancia dentro de la composición de este aceite y el segundo el compuesto con la mayor actividad antimicrobiana reportada. Como se puede observar en el cuadro 6, empleando el aceite de *B. morelensis*, la cepa 14065 exhibió los halos de inhibición más amplios (11.83 mm), por el contrario la cepa CDBB-L-1003 fue la que mostró halos de menor diámetro (11.16 mm). En lo que respecta a los compuestos puros, el que mostró la mayor actividad fue el α -pineno en todas las cepas utilizadas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Prueba cualitativa Anti-*Candida* del aceite esencial y los compuestos puros de *B. morelensis*.

Microorganismo	Aceite esencial de <i>B. morelensis</i>	α-pineno	γ-terpineno	Control Positivo (Nistatina)
<i>C. albicans</i>¹	10.0 \pm 1.00	9.7 \pm 0.58	7.0 \pm 0.00	18.0 \pm 1.00
<i>C. albicans</i> 14065	11.83 \pm 0.76	11.33 \pm 0.58	6.33 \pm 0.58	19.67 \pm 0.50
<i>C. albicans</i> 32354	11.33 \pm 0.58	11.33 \pm 1.15	7.0 \pm 0.00	22.0 \pm 2.00
<i>C. albicans</i> CDBB-L- 1003	11.16 \pm 0.29	8.33 \pm 0.58	6.0 \pm 0.00	22.0 \pm 1.00

Halos de inhibición medidos en milímetros. 1= Donada por la M. en C. María de Jesús Sánchez Onofre de la FES-Cuautitlán.

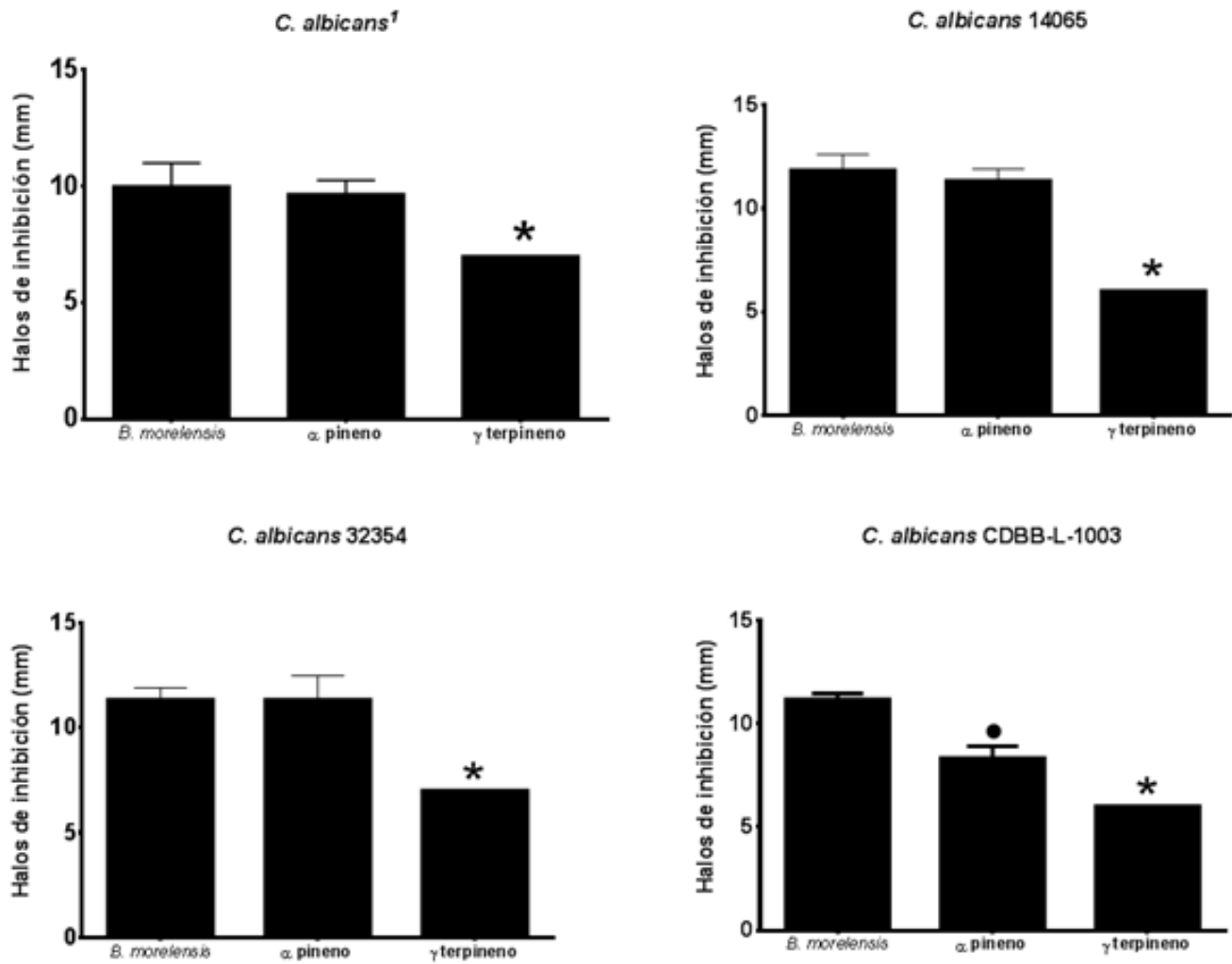


Figura 7. Evaluación cualitativa del aceite esencial de *B. morelensis* y dos compuestos puros presentes en el mismo

- * Diferencia significativa del γ -terpineno con respecto al α -pineno y el aceite esencial, $P > 0.05$.
- Diferencia significativa del α -pineno con respecto al aceite esencial, $P > 0.05$.

6.4 Evaluación Cuantitativa

Una vez que se constó la efectividad del aceite esencial fue necesario saber la concentración a la cual tiene efecto, es por esto que por medio de la técnica de Microdilución en caldo se determinó la Concentración Fungicida Mínima (CFM), así como la Concentración Fungicida Media (CF₅₀) y la Concentración Fungicida al 75 y 25% (CF₇₅ y CF₂₅). Como se observa en el cuadro 7 todas las cepas fueron sensibles al aceite esencial de *B. morelensis* obteniendo una CFM de 2 mg/mL, las CF₅₀ registradas fueron de 0.125 mg/mL para tres cepas (Caso clínico, 32354 y 1003). En cuanto a los compuestos puros el más activo fue el α pineno con CFM de 4 y 2 mg/mL y una CF₅₀ de 0.5 mg/mL en todas las cepas, sin embargo las concentraciones del γ -terpineno estuvieron por arriba en comparación con las registradas con el α -pineno ya que reportaron valores de 16 y 12 mg/mL para CFM y CF₅₀ de 6 a 10 mg/mL (Cuadro 7).

Cuadro 7. Determinación de la actividad del aceite esencial de *B. morelensis* y sus compuestos puros contra las diferentes cepas de *C. albicans*.

	Aceite esencial de <i>B. morelensis</i>				α -pineno				γ -terpineno			
	CFM	CF ₇₅	CF ₅₀	CF ₂₅	CFM	CF ₇₅	CF ₅₀	CF ₂₅	CFM	CF ₇₅	CF ₅₀	CF ₂₅
<i>C. albicans</i> ¹	2.0	0.25	0.125	0.062	4.0	1.0	0.5	0.125	16.0	12.0	6.0	4.0
<i>C. albicans</i> 14065	2.0	1.0	0.5	0.125	4.0	2.0	0.5	0.125	16.0	14.0	10.0	8.0
<i>C. albicans</i> 32354	2.0	0.5	0.125	0.062	4.0	1.0	0.5	0.065	16.0	10.0	6.0	2.0
<i>C. albicans</i> CDBB-L- 1003	2.0	0.25	0.125	0.062	2.0	1.0	0.5	0.25	12.0	1.00	8.0	6.0

Datos reportados en mg/mL, CFM= Concentración Fungicida Mínima CF₇₅= Concentración Fungicida al 75% CF₅₀= Concentración Fungicida al 50% CF₂₅= Concentración Fungicida al 25%

6.5 Inhibición del Crecimiento del tubo Germinativo

Una estructura clave dentro de los factores virulencia de *C. albicans* es el tubo germinativo, ya que este es el encargado de romper el epitelio circundante para así facilitar la colonización del mismo, es por esto que dentro de la investigación fue importante evaluar si el aceite esencial tiene la capacidad de inhibir el crecimiento del mismo.

Así bien se probó la actividad del aceite esencial de *B. morelensis* sobre *C. albicans* 14065, a las concentraciones de 8.0, 2.0, 1.0 y 0.5 mg/ mL. A la máxima concentración evaluada se obtuvo un 87.94 % de inhibición como se observa en la figura 8. Cabe destacar que se registró una $CL_{50} = 1.4$ mg/mL.

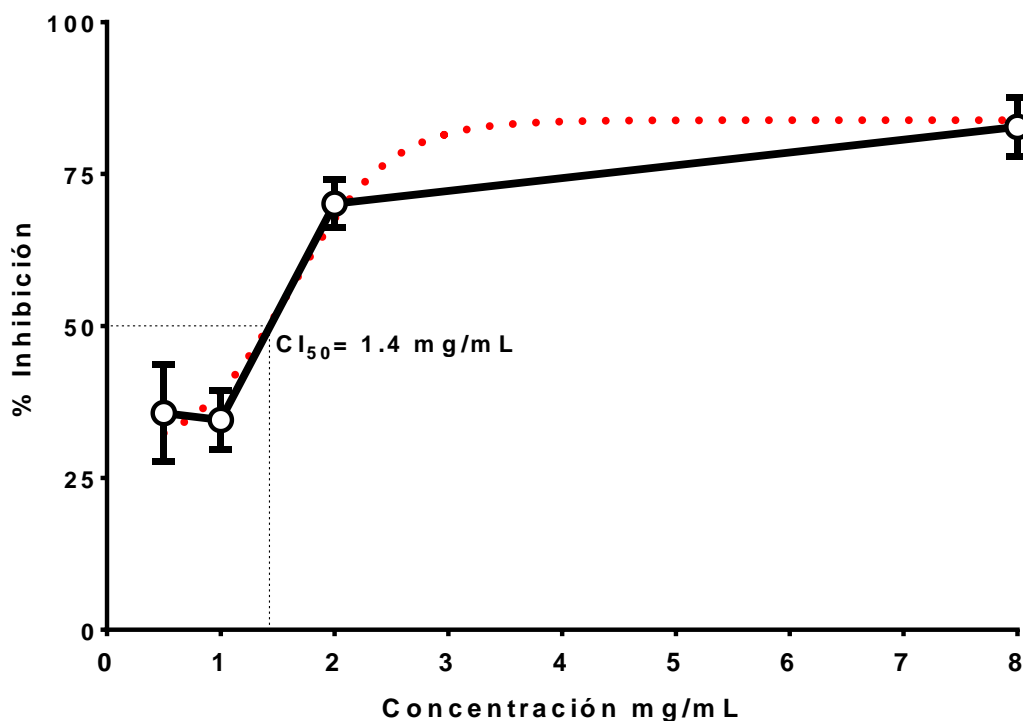


Figura 8. Efecto del aceite esencial de *B. morelensis* sobre el crecimiento del tubo germinativo de *C. albicans* 14065.

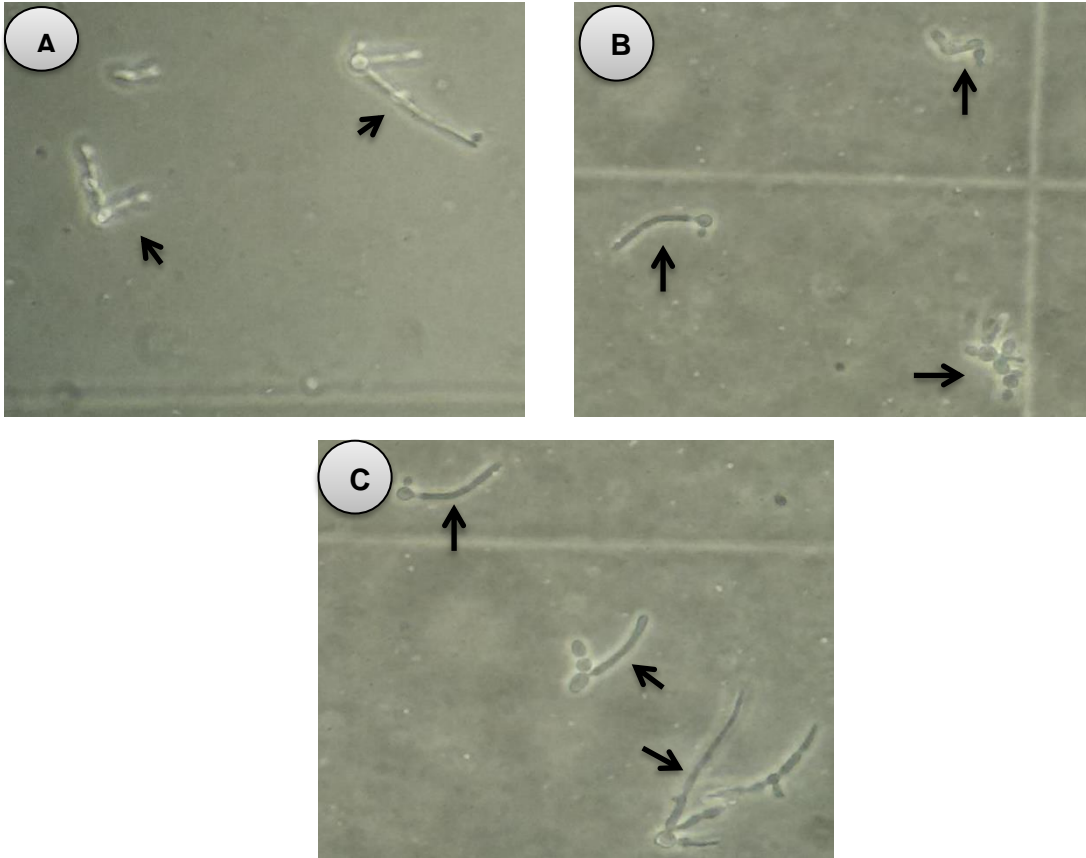


Figura 9. Efecto del Aceite Esencial de *B. morelensis* sobre el desarrollo del tubo germinativo de *C. albicans*.

A. Control, las flechas muestran el crecimiento óptimo del tubo germinativo después de dos horas de su activación con SFB. **B.** 8.0 mg/mL, a esta concentración se aprecia la disminuida capacidad de las levaduras para desarrollar tubo germinativo **C.** 0.5 mg/mL, en la muestra se observa una gran cantidad de levadura germinadas, así como algunas con deficiente crecimiento. Micrografía (40x) tomada con microscopio óptico.

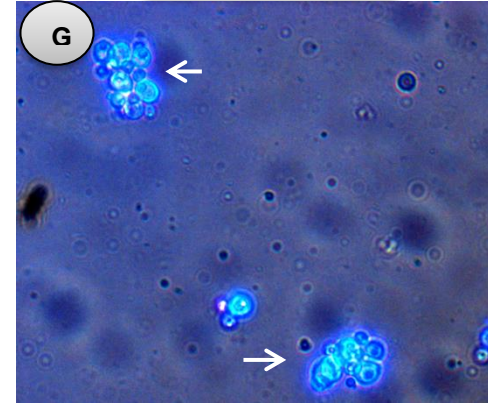
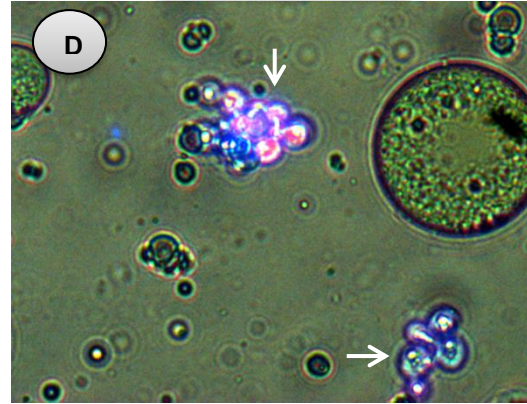
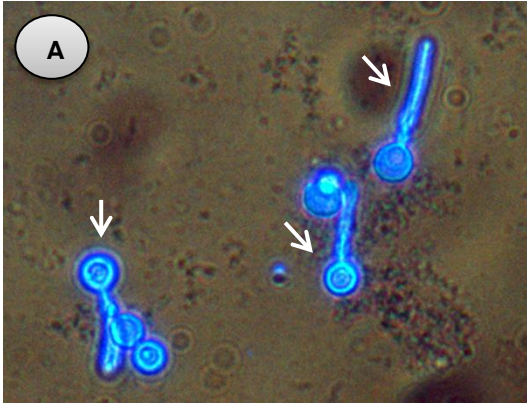
Para evaluar la forma en que el aceite esencial afecta la integridad de la membrana celular se utilizaron dos diferentes tinciones, la primera fue hecha con blanco de calcofluor, la cual evidencia el daño directo que podría presentar la pared celular de *C. albicans* y la segunda se realizó con yoduro de propidio el cual es un agente de intercalación en el ADN.

Para el ensayo se utilizó un tubo control y dos tubos más a las concentraciones de 10.0 y 2.0 mg/mL, los resultados de dichas tinciones se muestran en la figura 10, donde se puede observar que a la concentración de 10.0 mg/mL se pierde la integridad de la membrana celular y se observa la intercalación del yoduro de propidio en el ADN de la levadura, de igual manera a 2.0 mg/mL, aunque no tan evidente, se observa la pérdida de la integridad de la membrana celular así como una ligera intercalación de yoduro de propidio.

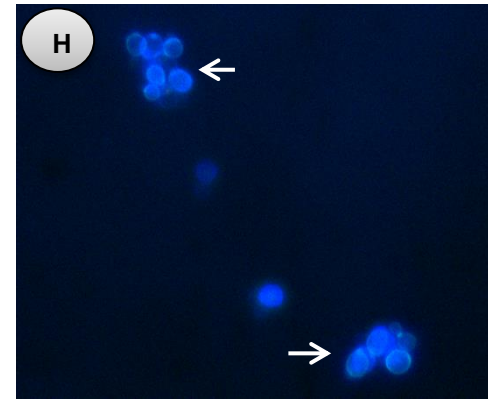
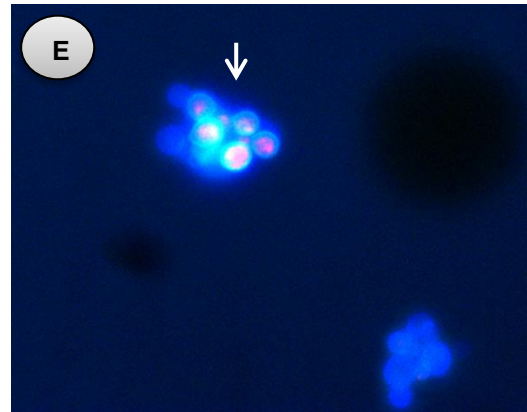
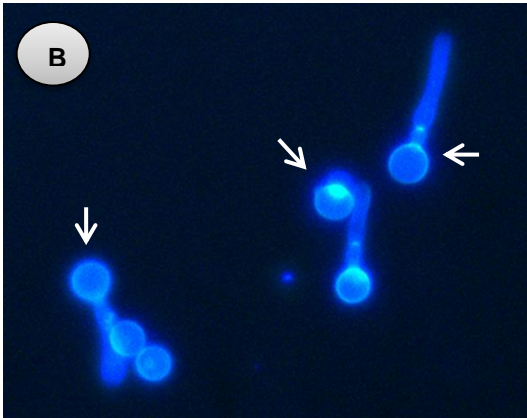
Testigo

10 mg/mL

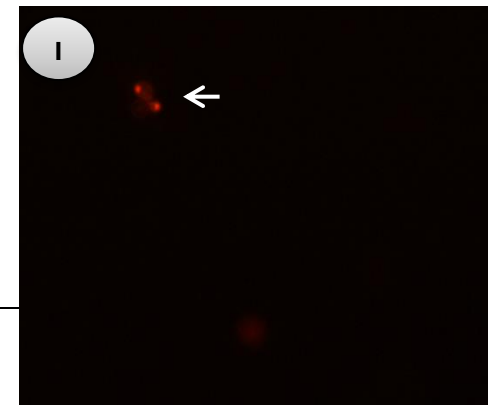
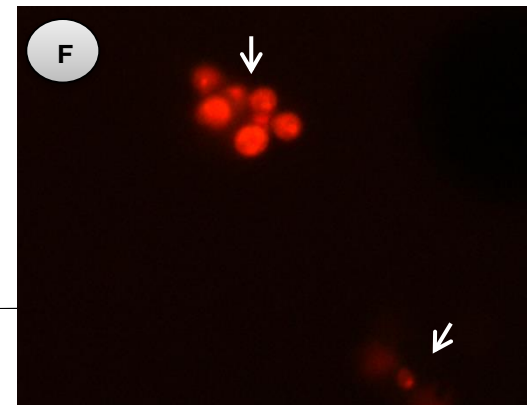
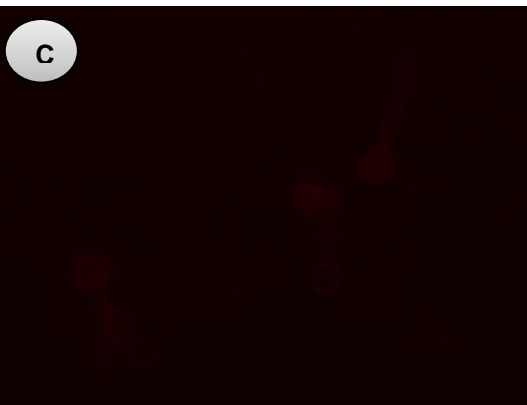
2mg/mL



Luz visible



Blanco de Carcofluor
(Luz ultravioleta)



Yoduro de Propidio
(Rodamina)

Figura 10. Efecto del aceite esencial de *B. morelensis* sobre la integridad de la membrana celular de *C. albicans* 14065.

A. Testigo. Levaduras germinadas observadas con luz visible. **B.** Testigo. Levaduras germinadas con tinción de blanco de calcoflúor, observadas con luz ultravioleta (365 nm). **C.** Testigo. Levaduras germinadas teñidas con yoduro de propidio, observadas a longitud de la Rodamina (535 nm). **D.** 10.0 mg/mL, Luz visible. A esta concentración la germinación es inhibida. **E.** 10.0 mg/mL, tinción de calcoflúor, luz ultravioleta, Se observa la pérdida de la integridad de la pared celular de las levaduras. **F.** 10.0 mg/mL, tinción con yoduro de propidio, longitud de la Rodamina, es posible observar la intercalación de este compuesto al ADN de *C. albicans* debido a la disrupción de la pared celular. **G.** 2.0 mg/mL, Luz visible, se observa la inhibición del tubo germinativo. **H.** 2.0 mg/mL, tinción de calcoflúor, luz ultravioleta, algunas secciones de la pared celular aún se conservan pero la disrupción de la pared ya es visible. **I.** 2.0 mg/mL. Tinción con yoduro de propidio, longitud de la Rodamina, se observa una leve intercalación del yoduro de propidio, lo cual indica el daño en la pared celular. Microfotografías (40x) tomadas en microscopio de fluorescencia.

6.6 *Evaluación de la actividad in vivo del aceite esencial de B. morelensis sobre la infección vaginal ocasionada por C. albicans.*

6.6.1 *Evolución de la infección en el modelo experimental murino de candidiasis vaginal.*

Este estudio se llevó a cabo para determinar el tiempo óptimo de infección; para ello la candidiasis fue inducida en los ratones bajo condiciones de pseudoestro, mediante la aplicación intraperitoneal de 0.2 mg de Valerato de estradiol 72 h antes de la inoculación vaginal con *C. albicans*. Esta fase fue verificada a través de un frotis vaginal, mostrando escasos leucocitos y numerosas células epiteliales nucleadas de borde irregulares, condición característica de este estadio. Posteriormente se procedió a la inoculación de *C. albicans* 14065 y 12 h después se realizó una segunda inoculación. Posteriormente se hicieron inoculaciones cada tercer día, esto con el fin de mantener latente la infección. Los resultados obtenidos del estudio histológico mostraron reducción del crecimiento del tubo germinativo y un disminuido desarrollo

del biofilm producido por la levadura (Figura 12). Estos resultados se compararon con el grupo control el cual mostró la integridad del tejido y sus estructuras (Figura 11).

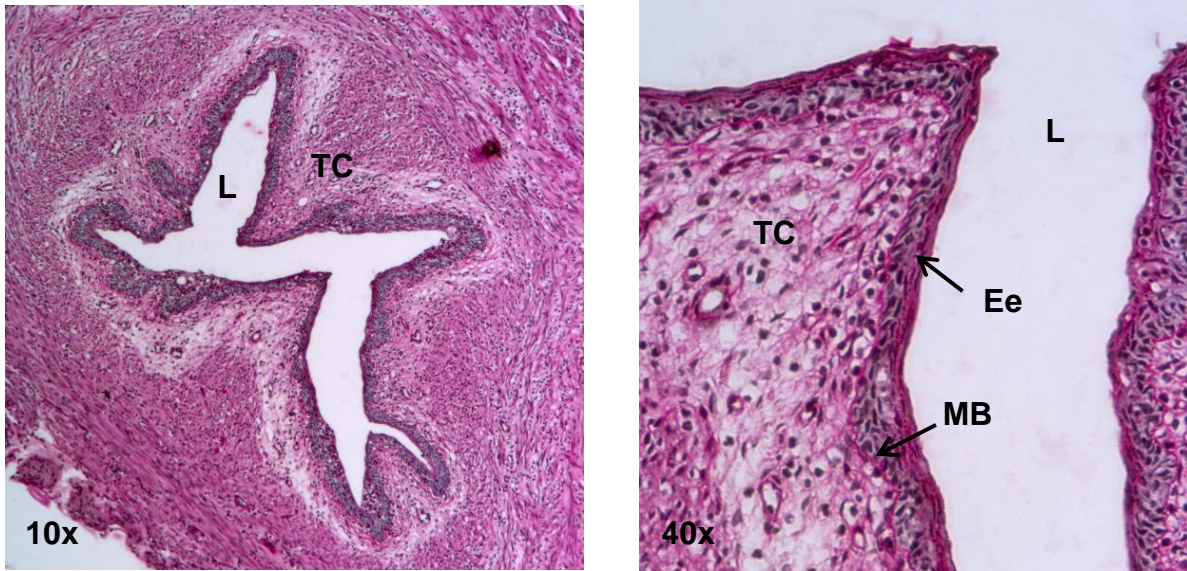
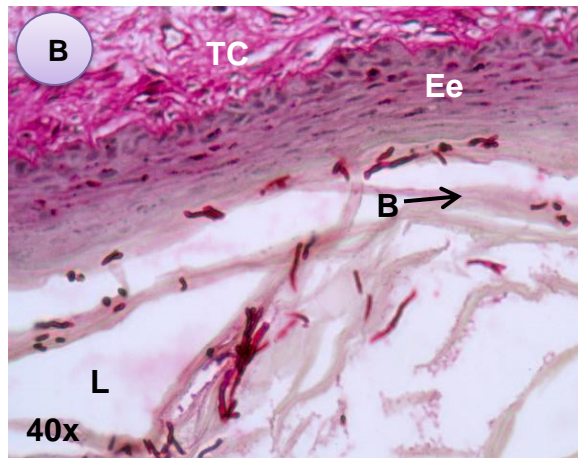
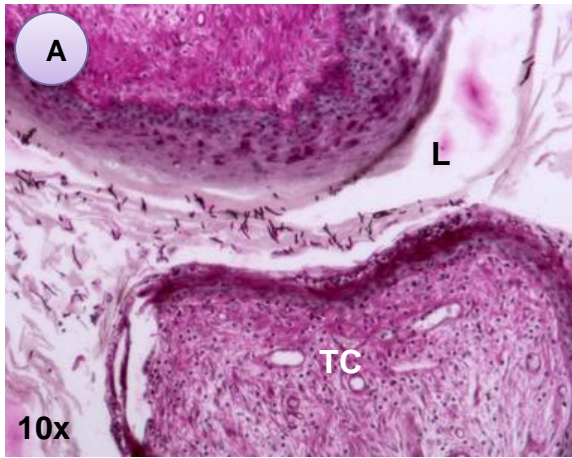
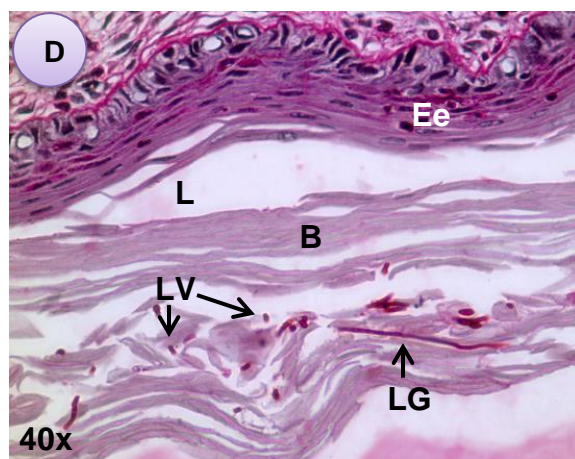
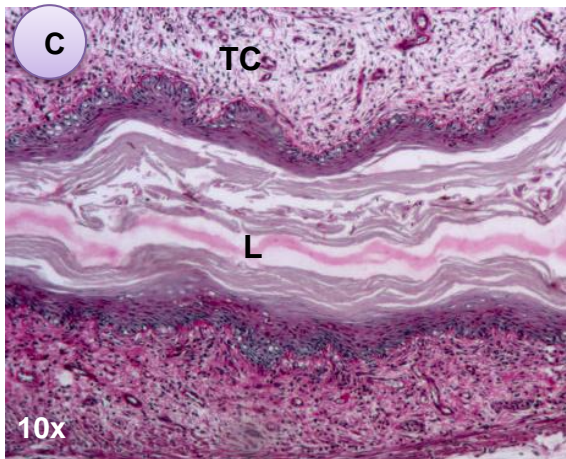


Figura 11. Cortes Histológicos Grupo Control

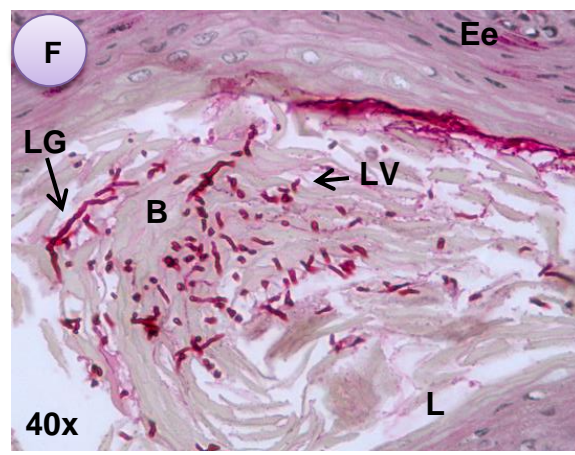
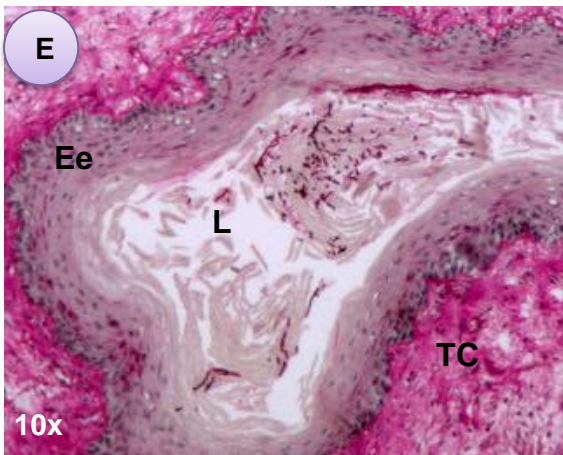
TC Tejido Conjuntivo, **Ee** Epitelio Estratificado, **L** Luz, **MB** Membrana Basal. Epitelio vaginal sano donde se muestra la ausencia de levaduras e hifas de *C. albicans*. Tinción de PAS.



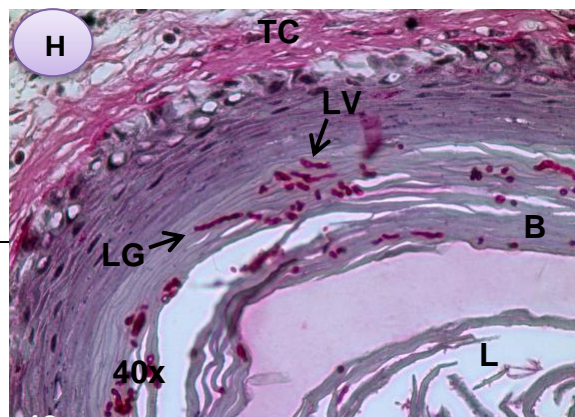
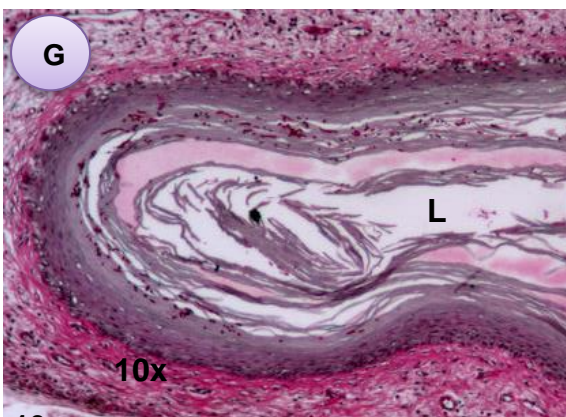
3 horas



24 horas



48 horas



72 horas

Figura 12. Cortes Histológicos del progreso de la infección de la vagina con *C. albicans* 14065 a las 3, 24, 48 y 72 h post-infección

TC Tejido Conjuntivo, **Ee** Epitelio Estratificado, **B** Biofilm, **L** Luz, **LV** Levaduras, **LG** Levaduras Germinadas. **A y B.** Cortes de tejido vaginal con 3 h de inoculación de *C. albicans*, donde se observa una delgada capa de biofilm por encima de las células epiteliales, así como levaduras e hifas en la luz de la misma. **C y D.** Cortes de 24 h donde es posible observar un ligero desprendimiento de las capas superficiales de biofilm, así como levaduras e hifas en la luz de la cavidad vaginal. **E y F.** Cortes de 48 h de inoculación, donde es posible observar una capa de biofilm más desarrollada, sin embargo el nivel de desprendimiento de la misma es mayor, destacando la gran cantidad de levaduras e hifas que invadieron la luz vaginal. **H – I.** Cortes de 72 h donde se observa una pérdida de la morfología de las células del epitelio vaginal, así como una considerable capa de biofilm la cual invade gran parte de la luz del corte. Tinción de PAS.

6.6.2 Evaluación de la actividad del aceite esencial de *B. morelensis* en el modelo experimental murino de candidiasis vaginal.

Una vez estandarizada la infección en el modelo murino se procedió a evaluar el efecto del aceite esencial de *B. morelensis*. El aceite de *B. morelensis* se administró a una concentración de 2 mg/mL a las 24 h después de la segunda inoculación, posteriormente se administró una segunda dosis de aceite a las 24 h después de la primera administración del aceite. Los cortes histológicos realizados a las 3 h corresponden a 3 h después de la primera dosis de aceite y 24 h después de la segunda dosis de aceite. Como control positivo se incluyeron ratones infectados y tratados con Nistatina (1 mL/Kg), se utilizó el mismo método de aplicación que el del aceite esencial. No se realizaron cortes histológicos a las 3 h ya que a menor tiempo se podría interferir con el establecimiento y adhesión de la levadura al epitelio.

En la figura 13 se observan los cortes del tejido vaginal de animales infectados y tratados con Nistatina (control positivo). A las 24 h después del tratamiento (A, B) se observa la presencia de levaduras, sin embargo el crecimiento del biofilm está claramente disminuido y en algunas zonas aparentemente ausente, a comparación del

grupo control de infección al mismo tiempo en el cual, tanto la cantidad de levaduras y crecimiento del biofilm se observan más desarrollados. Caso similar se observa en los cortes a 48 h (C, D).

En lo que respecta al tratamiento con el aceite esencial de *B. morelensis* en la figura 14 se puede observar que a las 24 h después de la primera administración (A, B) no se ha desarrollado biofilm y tan solo se aprecian levaduras en proceso de adhesión, de igual manera a las 48 h de tratamiento se observa una ligera colonización del tejido pero no el desarrollo como tal del biofilm.

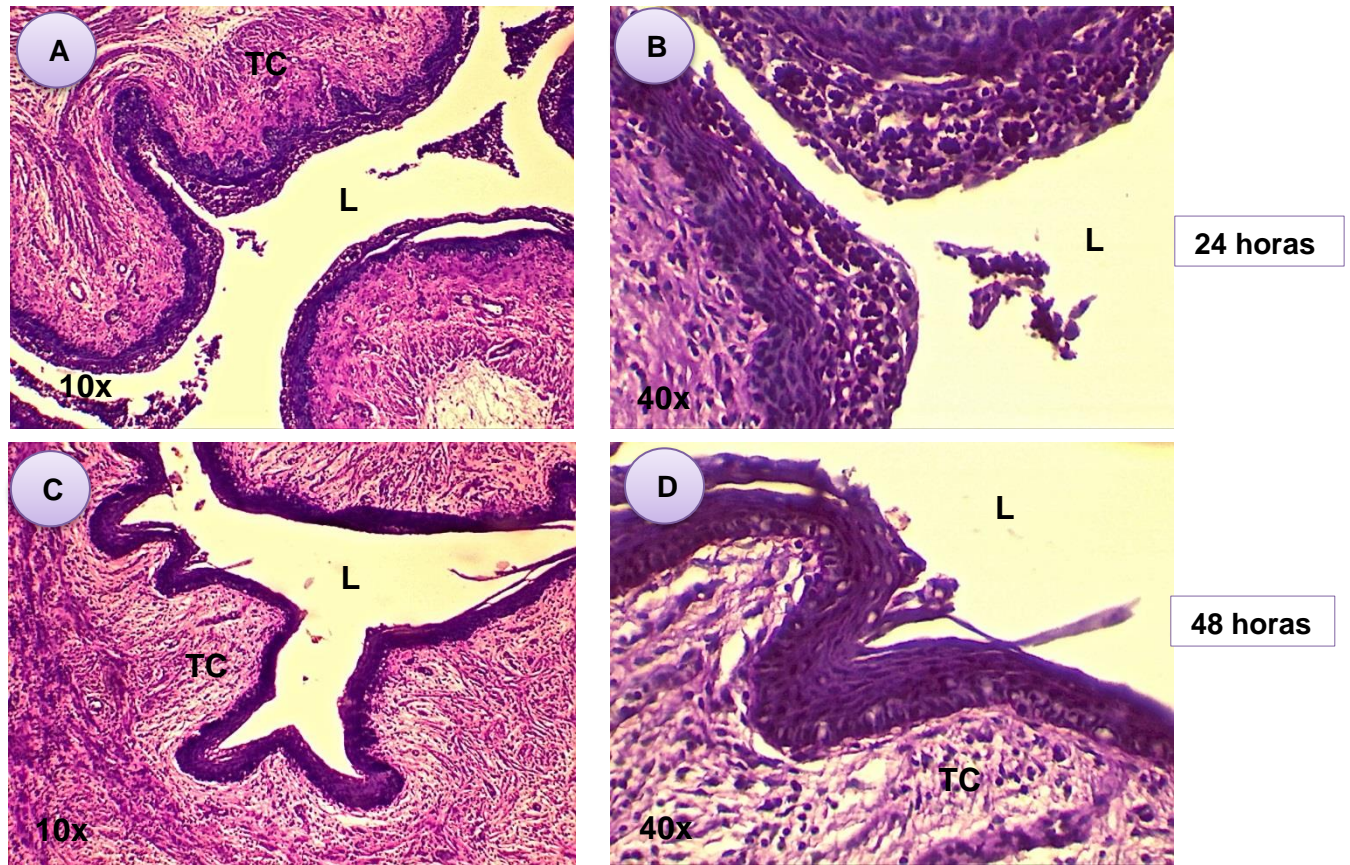


Figura 13. Cortes Histológicos del tejido vaginal de ratones infectados con *C. albicans* 14065 y tratados con Nistatina (control) a las 24 y 48 h

A y B. Cortes de tejido vaginal con 24 horas de inoculación de *C. albicans* y tratamiento con Nistatina, donde se observa el establecimiento de la infección pero no un óptimo desarrollo del biofilm. **C y D.** Cortes de 48 horas de inoculación de *C. albicans* y tratamiento con Nistatina donde es posible observar un ligero desprendimiento de las capas superficiales de biofilm. **TC** Tejido Conjuntivo, **Ee** Epitelio Estratificado, **B** Biofilm, **L** Luz, **LV** Levaduras. Tinción de PAS.

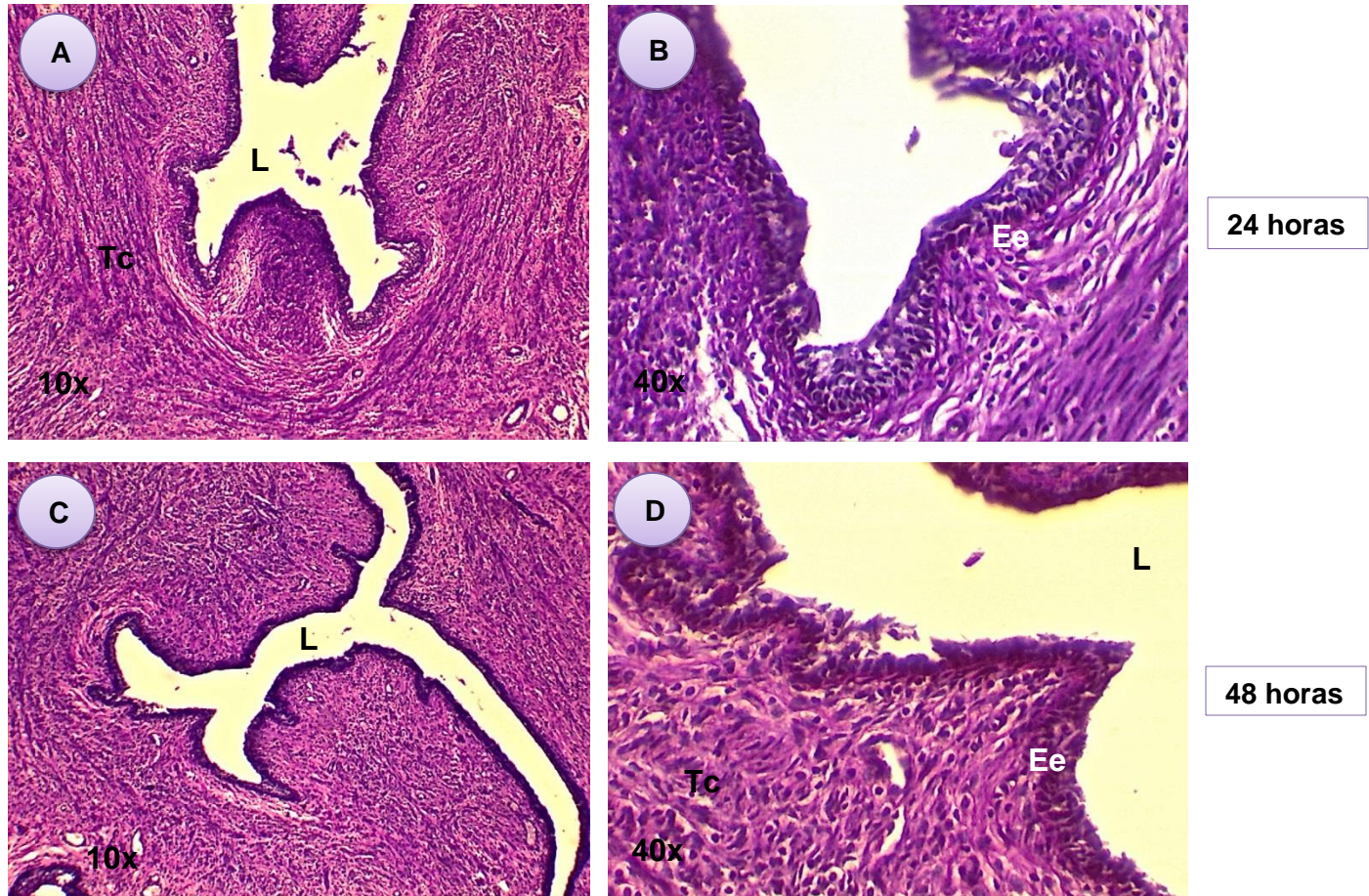


Figura 14. Cortes Histológicas del tejido vaginal de ratones infectados con *C. albicans* 14065 y tratados con aceite esencial de *B. morelensis* a las 24 y 48 h.

A y B. Cortes de tejido vaginal a las 24 h posteriores al tratamiento con el aceite de *B. morelensis*. Se observan levaduras en proceso de adhesión, pero no se identifica el desarrollo de biofilm. **C y D.** Cortes histológicos de 48 h de tratamiento con el aceite de *B. morelensis*. Se observa la capa del epitelio vaginal invadido por una sola capa de levaduras pero no la formación de biofilm. **TC** Tejido Conjuntivo, **Ee** Epitelio Estratificado, **L** Luz Tinción de PAS.

6.7 Expresión de la proteína INT1p

Uno de los factores de patogenicidad más importantes para *C. albicans* es la adhesión, por tanto es de suma importancia evaluar si el aceite esencial de *B. morelensis* interfiere en la capacidad de adhesión de la levadura. El efecto del aceite esencial de *B. morelensis* sobre la expresión de uno de los genes responsables de la adhesión (*int1*) fue analizado. El gen *int1* de *C. albicans* sin tratamiento inicialmente se amplificó por RT-PCR con los iniciadores primers descritos previamente por Khodavandi et al., en 2011 [123]. En la figura 15 se muestra un producto de 239 pb correspondiente al amplicón esperado para el gen *int1*. También se observan los genes de actina que se utilizaron como controles, con 199 y 516 pb.

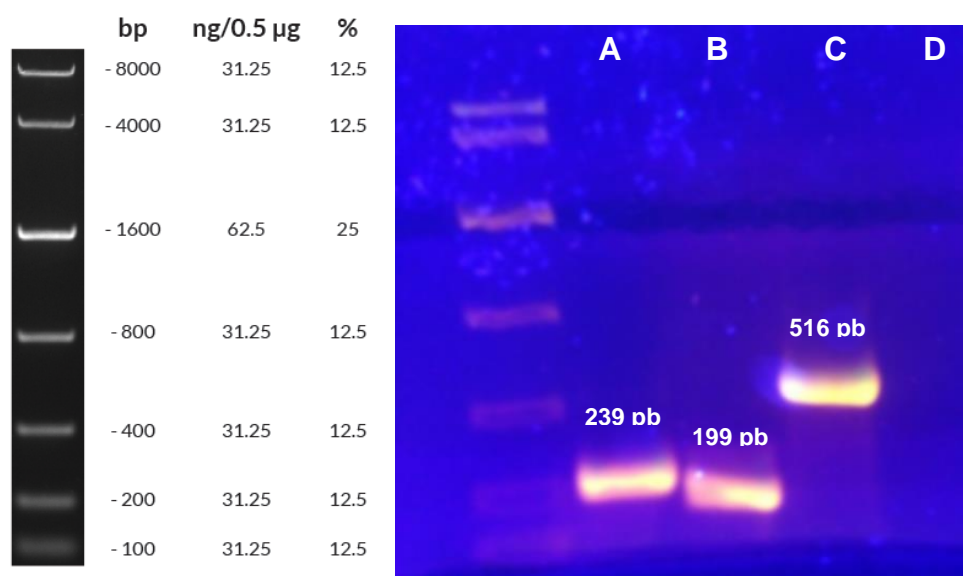


Figura 15. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos de *C. albicans*.

A. Expresión del gen *int1* situándose por encima de la banda de 200 pb. **B.** Expresión del gen de Actina^a, utilizado como control, observándose en la banda de 200 pb **C.** Banda que muestra

expresión el gen de la Actina ^b. D. Control negativo cargado con agua destilada. II

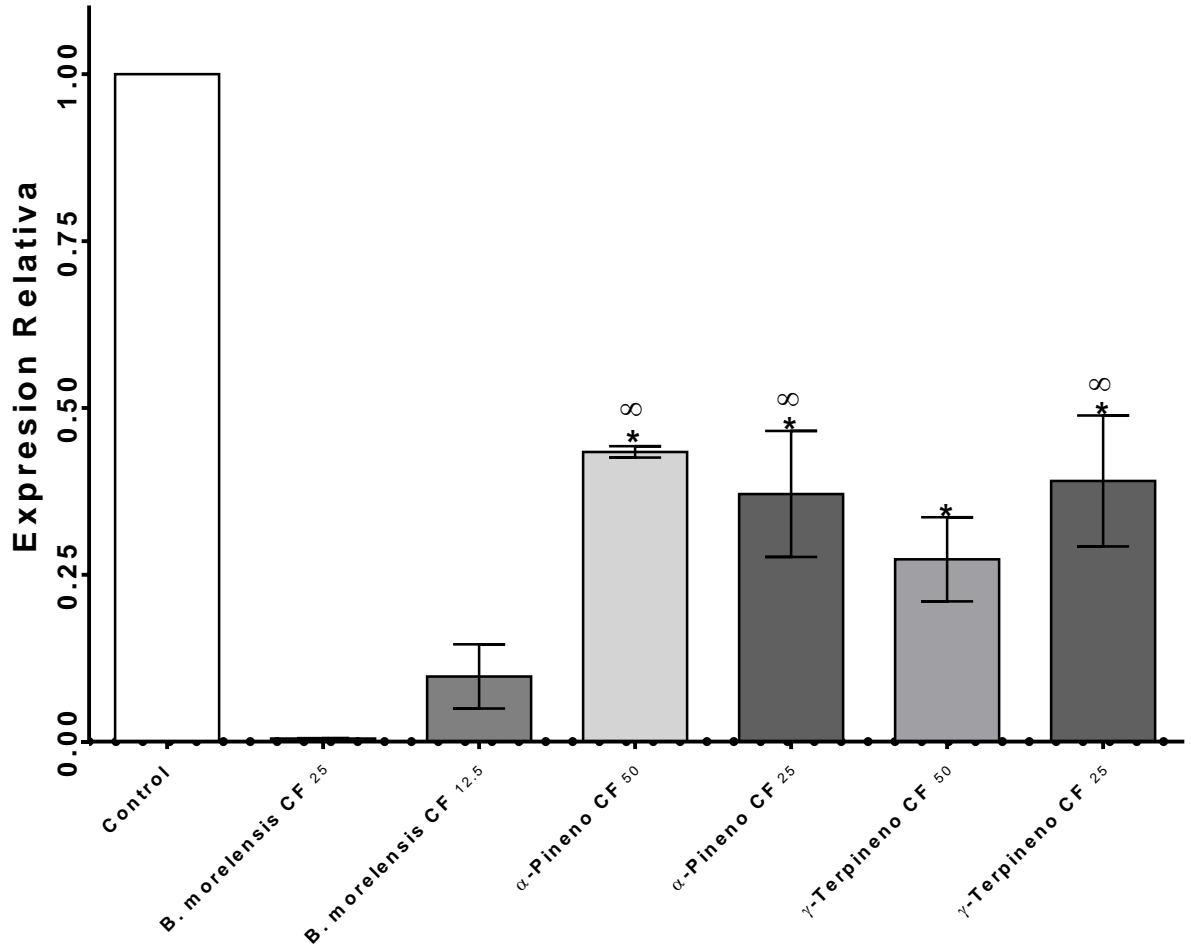


Figura 16. TR-PCR de la transcripción del gen *int1* de *C. albicans* expuesta a diferentes retos con el aceite esencial de *B. morelensis*, α -pineno y γ -terpineno

* Existen diferencias significativas con respecto al grupo *B. morelensis* CF₂₅ ($P < 0.05$). ∞ Existen diferencias significativas con respecto al grupo *B. morelensis* CF_{12.5} ($P < 0.05$)

C. albicans 14065 fue sometida a retos con el aceite esencial de *B. morelensis* a las concentraciones de CF₂₅ (0.125 mg/mL) y CF_{12.5} (0.065 mg/mL), también se utilizó una muestra testigo, después de 24 h de interacción se llevó a cabo la extracción de material genético y se corrió un RT-PCR utilizando los primer descritos en el cuadro 9 (Apéndice 6).

La figura 16 muestra la transcripción del gen *int1* después de la interacción con el aceite esencial de *B. morelensis* a las concentraciones de CF₂₅ (0.125 mg/mL) y CF_{12.5} (0.065 mg/mL), así como 2 compuestos de los compuestos presentes en el aceite esencial (γ -terpineno y α -pineno) ambos a las concentraciones de CF₅₀ y CF₂₅, observándose una clara disminución de la transcripción del gen *int1*, el cual codifica para la adhesina INT1p, misma que está estrechamente ligada en procesos de adhesión en epitelio vaginal. De acuerdo al análisis estadístico los retos mostraron diferencias significativas entre las concentraciones de *B. morelensis* y los compuestos puros ($P < 0.05$).

7. DISCUSIÓN

El contacto del hombre con hongos patógenos es tan antiguo como la evolución del mismo, sin embargo en las últimas décadas se ha observado un surgimiento de cepas con una elevada resistencia a los tratamientos fúngicos, así como un aumento en la población inmunodeficiente, agregando las limitaciones de los tratamientos alopáticos disponibles, lo cual ha desembocado en el uso de terapias alternativas o complementarias, lo cual incluye el uso de aceites esenciales [105]; teniendo en cuenta que México, posee una ubicación geográfica privilegiada, contando con alrededor de 30,000 especies vegetales, de las cuales existen cerca de 20,000 estudiadas y registradas, de ellas, 3,000 son medicinales y solamente el 10% de éstas se le ha estudiado desde el punto de vista farmacológico [124, 125]. En lo que respecta al género *Bursera*, este se le puede considerar como un miembro prominente y característico de la vegetación de México, ya que el país se considera un centro de diversificación del género, estimándose un total de 82 especies descritas [96]. Cabe destacar que a pesar de la importancia y uso del género, pocos son los estudios realizados a especies del mismo.

En cuanto a la composición química del aceite esencial, se sabe que la mayor parte de los componentes que constituyen los aceites esenciales son terpenos, en el caso de la familia Burseraceae Lucero en 2012 [126] menciona que los principales componentes de dichos aceites son Mono y Sesquiterpenos, siendo estos compuestos los que juegan un papel importante en la defensa contra insectos y patógenos [127], así como los responsables de la actividad antifúngica de los mismos [128]. En la muestra de aceite esencial de *B. morenensis* se encontraron 13 diferentes compuestos (Cuadro 8), siendo el γ -terpineno el de mayor abundancia (65.46%), seguido del β -felandreno (18.27%), en tercer lugar se encuentra el α -cariofileno (5.13%) y por último el α -pineno (2.85 %), estos resultados no concuerdan con lo reportado por Carrera y colaboradores en 2014 ya que de los 23 compuestos que ellos

reportan solo 6 son los mismos que los reportados en esta investigación, lo anterior podría deberse principalmente a la época de colecta de cada una de las muestras ya que en la investigación de Carrera y colaboradores en 2014 [100] se obtuvo en los meses de Agosto y Septiembre, por el contrario nuestra muestra fue obtenida en el mes de Abril del mismo año, teniendo en cuenta lo anterior es importante mencionar que la zona de colecta (Valle de Tehuacán-Cuicatlan) posee un clima seco o árido con lluvias en verano [94], razón por la cual los meses de colecta si podrían comprometer la cantidad y abundancia de los compuestos presentes en la especie. Como fue mencionado anteriormente, 6 son los compuestos que se mantienen constantes en ambas colectas pero son el α y β -pineno los compuestos a los cuales se les ha reportado actividad antifúngica; en el caso del α -pineno existen reportes de su actividad sobre *C. albicans* 10231 al usar dos diferentes enantiómeros del mismo compuesto, obteniéndose diferentes resultados en cada uno de ellos [129], así mismo, diversos estudios mencionan que el α -pineno actúa sobre la integridad celular, inhibiendo la respiración y el proceso de transporte de iones, influyendo en el aumento de la permeabilidad de la membrana de *C. albicans* [107, 130, 131], de igual manera Dorman y Deans en 2000 [132] mencionan la actividad antibacteriana y antifúngica no solo del α -pineno sino también del α -felandreno. Es de suma importancia destacar que la actividad de cada uno de estos compuestos puros es muy importante, pero no hay que perder de vista que los aceites esenciales son una mezcla de compuestos terpénicos que, de manera natural muestran una actividad antimicrobiana ideal, además, se ha demostrado que la reacción entre los diferentes compuestos de los aceites juega un papel importante en el potencial antimicrobiano de la planta [133]. Sin embargo el sinergismo que presentan estos compuestos puede ser aprovechado, haciendo interacciones con diversos antifúngicos, ya que recientes investigaciones demuestran que la mezcla de aceites esenciales con diferentes antibióticos en la mayoría de los casos ha potenciado el efecto del antibiótico en solitario [134], motivo por el cual esto ayudaría a ampliar las dianas de interacción entre antifúngico-aceite esencial contra las levaduras.

En lo que respecta a los resultados obtenidos en la evaluación cualitativa, el aceite esencial de *B. morelensis* tuvo actividad contra todas las cepas de levaduras, obteniendo halos de inhibición de hasta 11.83 mm para *C. albicans* 14065 (Cuadro 6), dicho resultado es interesante ya que la nistatina (control positivo) exhibió halos de 22 mm contra la misma cepa, destacando que este último es un compuesto puro y el aceite esencial es una mezcla de diversos compuestos los cuales podrían estar actuando de manera sinérgica entre ellos para de este modo conferir dichos resultados sobre las levaduras. Sin embargo no hay que dejar de lado la evaluación de los compuestos puros del aceite esencial, para lo cual se evaluó la efectividad del α -pineno y el γ -terpineno, obteniéndose halos de inhibición por debajo de los reportados por el aceite esencial (11.33 mm y 7.0 mm respectivamente). En una investigación previa realizada por Rivera en 2013 [92] el aceite esencial de *B. morelensis* mostró una actividad similar ya que tuvo actividad sobre cinco diferentes cepas de *C. albicans* destacando así la efectividad de este aceite sobre la levadura; es importante mencionar que actualmente pocas son las investigaciones realizadas sobre el aceite esencial de esta especie, y menos aún los registros de investigaciones donde se compare la actividad del aceite esencial de *Bursera* contra los compuestos puros que conforman el mismo, de tal suerte que es muy importante tomar en cuenta este tipo de investigaciones para así corroborar la acción sinérgica presente en los aceites esenciales.

Teniendo como resultado la efectividad del aceite esencial y los compuestos puros sobre las cuatro cepas de *C. albicans* utilizadas en esta investigación se procedió a la evaluación cuantitativa, donde se determinó la CFM, CF₇₅, CF₅₀ y CF₂₅ (Cuadro 7), mostrándose para el aceite esencial de *B. morelensis* valores de 2 mg/mL para CFM en todas las cepas, lo anterior contrasta con los resultados obtenidos para los compuestos puros, ya que en el caso del α -pineno los valores de CFM fueron de 4 mg/mL (en tres cepas) y el γ -terpineno mostró valores que oscilan de 16 a 12 mg/mL, datos que hasta el momento comprueban la mayor efectividad del aceite esencial en su conjunto, que al probar los compuestos puros por separado; de igual manera es

importante mencionar que la actividad de los principales componentes no dicta la naturaleza biológica del aceite, si no que esta puede ser regulada por minorías de otras moléculas [135, 136], tal y como sucedió en el caso del γ -terpineno ya que se esperaba que al ser el compuesto con la mayor abundancia fuera el que mostrara la actividad anti-*Candida* más marcada, sin embargo esto no fue así. También hay que considerar que los componentes de la pared celular como β -glucanos, quitina y mananos varían de acuerdo al estadio de crecimiento [56, 137], así bien la superficie de contacto del aceite sobre la levadura varía de cierta manera en las pruebas cualitativa y cuantitativa, de tal suerte que al realizarse en medio sólido y líquido respectivamente la interacción del mismo pudiera variar, pero no hay que dejar de lado que los aceites tienen la capacidad de cambiar la fluidez de las membranas citoplasmáticas y estas se vuelven anormalmente permeables dando lugar a fugas de los radicales, iones de calcio y proteínas. La permeabilización de las membranas mitocondriales externa e interna conduce a la muerte celular por apoptosis y necrosis [138, 139].

Uno de los procesos de patogenicidad más importantes es el desarrollo de tubo germinativo, destacando que la capacidad de *C. albicans* para cambiar de levadura a hifa es uno de los atributos de virulencia más investigados [27], por tal motivo se evaluó la actividad del aceite esencial de *B. morelensis* sobre el desarrollo del mismo, para este fin se utilizó la cepa 14065, mostrando interesantes resultados, ya que se obtuvo una CI_{50} = 1.69 mg/mL. Pocos son los reportes que se tienen sobre aceites y su efecto en el desarrollo del tubo germinativo, sin embargo el extracto de la especie *Argemone mexicana* obtuvo una CL_{50} = 0.61 mg/mL, pero hay que mencionar que dicha especie también tiene reportes de una alta toxicidad [92], de igual manera se han realizado pruebas con anfotericina B, esto contra la cepa de *C. albicans* 10231, obteniendo una CI_{50} = 3.9 μ g/mL [58], en este punto es importante destacar que en primera instancia, la anfotericina B es un compuesto puro utilizado durante casi cuatro décadas como único fármaco disponible para el tratamiento de la Infección Fúngica Invasora [79], su actividad fungicida está bien descrita y se sabe que interactúa directamente con el ergosterol de la membrana celular fúngica, no interfiere con la síntesis de la membrana

sino que la desestabiliza [76, 81, 140-142], de manera particular en *C. albicans* actúa inhibiendo una bomba de protones e induce la peroxidación de los lípidos de membranas [82]; por tal motivo es de esperarse que este fármaco maneje concentraciones tan bajas, sin embargo el rubro de los efectos adversos que el tratamiento con anfotericina B conlleva sigue siendo tema de debate, siendo la nefrotoxicidad el efecto adverso más relevante [143-147] ya que el uso del poliéno propicia el posterior uso de hemodiálisis, así como, la prolongación de las estadías hospitalarias y por supuesto mayores costos [148-150]. Hay que destacar que estudios realizados por Tangarife y colaboradores en 2011 [107] sugieren que los aceites esenciales actúan deteriorando la pared celular, motivo por el cual el desarrollo de tubo germinativo es directamente afectado, ya que la pared celular es pieza clave en los procesos de división celular [107]. También es muy importante destacar que el aceite esencial es una mezcla de diversos compuestos y que una CL₅₀ a esta concentración refiere la efectividad de dicho aceite, pruebas moleculares serían el siguiente paso, para poder llegar a describir de manera puntual el posible mecanismo de acción en cuanto al desarrollo del tubo germinativo se refiere.

Otro de los procesos de patogenicidad de gran importancia es la adherencia, el cual está mediado por biomoléculas conocidas como adhesinas [6], de estas se tiene conocimiento de al menos 4 grupos diferentes, uniéndose a varias proteínas de la matriz extracelular de las células de mamíferos [10, 39]. Desde 1994 Hostetter menciona la importancia de las integrinas en la adhesión de *C. albicans*, posteriormente estudios realizados por Gale y colaboradores en 1998 [49] demuestran que la proteína INT1p es una de las adhesinas involucradas en la adhesión de *C. albicans* al tejido epitelial, lo anterior se demuestra en el RT-PCR ya que después de una interacción de 24 horas con el aceite esencial de *B. morelensis*, α -pineno y γ -terpineno a diferentes concentraciones se observó que la transcripción del gen *int1* se ve drásticamente afectado en las muestras tratadas con el aceite de *B. morelensis* ($P < 0.05$). Lo anterior no solo demuestra que el aceite esencial actúa disruptiendo la

pared celular de *C. albicans*, sino que también actúa a nivel transcripcional afectando al gen *int1*.

La Candidiasis Vulvovaginal (CVV) es una enfermedad que afecta por lo menos al 75% de las mujeres en edad fértil [151], siendo *C. albicans* la responsable de más del 90% de los casos registrados [152], motivo por el cual se decidió llevar a cabo pruebas del efecto del aceite esencial de *B. morelensis* sobre la infección causada por *C. albicans* en un modelo murino. En las micrografías tomadas a los cortes histológicos de los tratamientos con Nistatina y el aceite esencial de *B. morelensis* se observó la ausencia de levaduras en ambos tratamientos, lo cual hace concluir que el aceite esencial actúa con una eficacia similar a la del control positivo (Nistatina). Si bien el mecanismo de acción de la Nistatina, ya está bien descrito, sin embargo es muy difícil determinar los mecanismos de acción de los productos naturales, ya que nos enfrentamos una gran cantidad de compuestos los cuales actúan en conjunto, pudiéndose en fenómeno conocido como sinergismo [105], donde uno o varios de los compuestos presentes en la composición química del aceite esencial de *B. morelensis* pueden potenciarse, exhibiendo así una actividad que en solitario no presentan o se ve disminuida. Investigaciones hechas por Khodavandi y colaboradores en 2011 [123] mencionan que la alicina (compuesto presente en el aceite esencial del Ajo) actúa desestabilizando la matriz extracelular y generando una disrupción en el biofilm de *C. albicans*; otra molécula descrita con actividad antifúngica presente en *B. morelensis* es el α -pineno, dicha molécula actúa sobre la integridad celular inhibiendo la respiración celular y el proceso de transporte de iones aumentando la permeabilidad de la membrana de *C. albicans*. Sin embargo otro problema con el que los modelos murinos se enfrentan a la alta concentración de estrógenos que se administran para mantener a los ratones en condiciones de pseudoestro ya que se llegaban a administrar de entre 100 a 500 μg de estrógenos a la semana por ratón, ocasionando no solo la buena evolución de la infección fúngica si no el desarrollo de infecciones bacterianas alternas que llegaban a causar la muerte de los ratones [153], motivo por el cual se buscó la menor alteración y se buscaron modelos con una carga hormonal muchísimo más baja

(2 µg por ratón), observándose la ausencia de infecciones secundarias tanto en los grupos control como en los diferentes tratamientos, comprobándose así la actividad del aceite esencial de *B. morelensis* sobre este tipo de Candidiasis.

Los factores de virulencia tales como el dimorfismo, desarrollo del tubo germinativo y adherencia son esenciales para garantizar el establecimiento y desarrollo de una infección causada por *C. albicans*, también es importante mencionar que esta levadura a evolucionado para mantenerse como un comensal natural en diferentes nichos del cuerpo humano, característica que en muchas ocasiones dificultan el tratamiento del mismo microorganismo, sin embargo y a pesar del gran avance de la medicina alopática, aun hoy es difícil que los antifúngicos (polienos) utilizados en el tratamiento de los diferentes tipos de candidiasis sean lo menos tóxicos posibles, de esta manera se abre una ventana para que los productos naturales utilizados en la medicina tradicional puedan perfilarse como una opción de tratamiento de bajo costo y una toxicidad mucho menor.

8. CONCLUSIONES

- El análisis de CG-MS mostró la presencia de monoterpenos en el aceite esencial de *B. morelensis*.
- El aceite esencial de *B. morelensis* y los compuestos puros inhiben el crecimiento de *C. albicans* 14065.
- El aceite esencial mostró capacidad para inhibir el desarrollo del tubo germinativo de *C. albicans* 14065.
- El aceite esencial de *B. morelensis* causa disrupción en la membrana celular y membranas internas de *C. albicans*.
- La expresión del gen INT1 es inhibida por el aceite esencial de *B. morelensis* y dos de sus compuestos puros.
- El aceite esencial de *B. morelensis* posee actividad anti-*Candida* en un modelo experimental de candidiasis vaginal.

9. ANEXO 1

APENDICES

10.1 APÉNDICE 1

Bursera morelensis Ramírez. *Burseraceae*

(Rzedowski, 1992 [119])

Botánica y ecología

Es un árbol dioico, hasta de 10 -13 m de alto, con abundante resina aceitosa con olor a aguarrás en la corteza y en las partes verdes, glabro, aunque algunas porciones muy tiernas cubiertas con papilas blanquecinas diminutas; tronco que va desde los 25 hasta los 40 cm de diámetro, su corteza externa rojiza, exfoliante en láminas delgadas; hojas de 5 a 11 cm de largo y 1.5 a 3.5 cm de ancho, peciolo acanalado, de 1 a 2 cm de largo, foliolos 33 a 45, raquis con alas inconspicuas, los foliolos sésiles o subsésiles, linear-oblongos a linear-lanceolados, de 7 a 17 mm de largo y 1.6 a 2.5 mm de ancho, disminuyendo de tamaño hacia los extremos de la hoja, ápice agudo, margen entero, la nervadura central conspicua, las laterales poco marcadas, peciolo acanalado, de 1 a 2 cm de largo; catafilos inconspicuos, pronto caedizos; las flores masculinas en inflorescencias racimosas o paniculadas hasta de 5 cm de largo, provistas de bracteolas filiformes a subuladas, caedizas, flores en su gran mayoría pentámeras, a veces algunas 3 ó 4 lóbulos del cáliz angostamente triangulares, de 0.7 a 1.3 mm de largo, agudos en el ápice, pétalos amarillentos a verdosos o blanquecinos, oblongos a lanceolados, de 3 a 6 mm de largo, circulares, estambres todos aproximadamente al mismo nivel, filamentos de ± 1 mm de largo, anteras oblongas, de 1.5 a 2 mm de largo; las flores femeninas por lo común solitarias, a veces por pares o en una panícula corta, por lo general trímeras, similares en forma y tamaño a las masculinas, anteras de los estaminodios de ± 1 mm de largo, ovario trilocular; pedúnculos en fruto notablemente engrosados y encorvados, "drupa" trivalvada, oblicuamente ovoide, de 5 a 10 mm de largo y 4 a 6 mm de ancho, más o menos pronunciadamente apiculada, el hueso recubierto totalmente por un pseudoarilo amarillo.

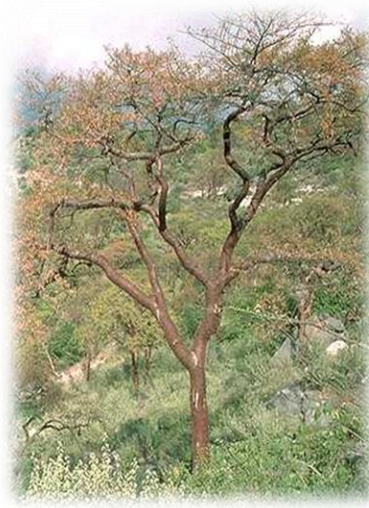


Figura 17. Árbol de *Bursera morelensis*

Etnobotánica y antropología

Este árbol es un componente ocasional del bosque tropical caducifolio, pero en la región de la Flora más frecuentemente forma bosquetes o se presenta en forma aislada en medio del matorral xerófilo, sobre todo en laderas de pendiente pronunciada de cañadas profundas, preferentemente de exposición sur. De una Altitud 600-1500 msnm. Florece de abril a junio. Permanece con follaje de mayo a noviembre (diciembre). La especie es muy común en la parte oriental de la depresión del Balsas, extendiéndose hacia los valles de los ríos Tehuantepec y Papaloapan; también reaparece en forma dispersa en los cañones de muchos de los afluentes del río Pánuco. San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, México, Morelos, Puebla, Guerrero, Oaxaca.

10.2 APÉNDICE 2

Método de Hidrodestilación

(Domínguez, 1973 [154]).

El aceite se obtuvo a partir del material fresco; este método utiliza una de las características de los aceites esenciales que es de presentar bajas presiones de vapor y por tanto pueden ser arrastradas por sustancias que poseen presiones de vapor más altas. Se puede destilar por arrastre de vapor continuo de 100 a 500g de la planta fresca.

Se depositaron en un matraz de fondo redondo de 500 mL. El matraz se colocó en una mantilla de calentamiento eléctrica. Se montó el sistema de refrigeración. Se esperó a que hirviera ligeramente y se recolectó el aceite esencial.

10.3 APÉNDICE 3

Método de difusión en agar (Modificado para levaduras)

(Rivera, 2013 [92])

Medio. Se utilizó como medio de cultivo estándar el agar PDA (Agar Papa Dextrosa), debido a que promueve el desarrollo de los aislados fúngicos clínicamente significativos.

Inóculo. Con un asa de siembra estéril se tocaron las superficies convexas de 4 ó 5 colonias de apariencia semejante. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Sabouraud, se enjuaga bien el líquido para descargar bien todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incubó el tubo a 37°C durante aproximadamente 48 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de McFarland, lo que equivale a una concentración de 1.5×10^8 levaduras/mL.

Finalmente, se siembra en estrías en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de por lo menos 60° luego de cada estría.

Control positivo. Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales en sensidiscos con un antimicótico sintético (Nistatina 33 µg/disco).

Incubación. Ya que las cajas con agar están preparadas para las pruebas de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 35°C, sin mayor tensión de CO₂.

Interpretación de resultados. Las zonas de inhibición se miden con una regla calibrada en mm. En todos los casos la prueba se realizará por triplicado y los valores promedio se reportaron en mm.

10.4 APÉNDICE 4

Microtécnica de Dilución en caldo para aceites esenciales

(Rivera, 2013[92])

La técnica de dilución en caldo sigue el mismo principio que el método de dilución en agar, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicóticos se determina en una serie de tubos con la concentración deseada del compuesto a probar.

Se preparó una suspensión de levaduras con un asa de siembra estéril tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de los microorganismos a ensayar. Se sumergió el asa en 10 mL de caldo Sabouraud, se enjuagó bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retiró el asa de siembra. El tubo de cultivo se incubó a 37°C durante 48 horas, o hasta que la turbidez del medio fue equivalente al estándar N° 0.5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 microorganismos/mL, de esta suspensión se tomaron 4µL de la levadura a estudiar y se le adicionaron en los microtubos de centrifuga previamente estériles, y alicuotados

con el caldo Sabouraud, que contiene Tween 80 y el aceite, obteniéndose así una concentración de 10^5 microorganismos/mL.

Las disoluciones a trabajar se prepararon diluyendo el aceite en caldo Sabouraud, con ayuda de Tween 80 a una concentración final de 15 μ L (esto en 200 μ L, respetando no exceder el 0.5% de volumen total de caldo) según las concentraciones deseadas (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.065 mg/mL) para el aceite esencial y el α -pineno, en el caso del γ -terpineno las concentraciones utilizadas fueron de 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25. Previamente se prepara y esteriliza el agar. Se coloca el Tween 80 y luego la cantidad necesaria del aceite para obtener la concentración requerida. Luego se pasan 400 μ L de caldo, a microtubos de centrifuga de 1.5 mL previamente estériles y etiquetados, colocando en este punto la concentración de levadura utilizada. Posteriormente se colocan 130 μ L en tres microtubos de centrifuga de 0.6 mL para obtener así tres repeticiones.

Para la siguiente fase del experimento es necesario preparar con anterioridad cajas de tres septos con agar PDA así como tubos con 5 mL de solución salina al 0.9 %, por cada concentración es necesario preparar una caja y dos tubos con solución salina.

Después de incubarse por 24 horas a 37°C, se tomaron 20 μ L de cada microtubo (en total 60 μ L) y se colocaron en el primer septo, de igual forma se toman de nuevo 20 μ L de cada microtubo para ser añadidos en un tubo con solución salina, de este tubo previamente agitado se toman 50 μ L y se colocan en el segundo septo de la caja, del mismo tubo se toman nuevamente 50 μ L y se colocan en un nuevo tubo con solución salina, este es agitado para tomarse 50 μ L que fueron colocados en el tercer septo de la caja. Las cajas se incuban por 24 h a 37°C.

Una vez transcurrido este periodo se cuentan las unidades formadoras de colonia (UFM) que crecieron en cada septo, es recomendable contar primero las de la dilución dos ya que en esta las colonias se diluyeron de tal forma que es más fácil contarlas. Teniendo el número total se hacen los cálculos correspondientes para saber cuántas eran las UFM del tubo original, con base a este dato es posible determinar la CFM, CF₂₅, CF₅₀, y CF₇₅.

10.5 APÉNDICE 5

Método de inhibición del Crecimiento del tubo germinativo

(Ishida et al., 2006 [122])

Inóculo. Con un asa de siembra estéril se tocaron las superficies convexas de 4 ó 5 colonias de *C. albicans*.

Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Sabouraud, se enjuaga bien el líquido para descargar bien todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incuba el tubo a 37° C durante aproximadamente 24 horas. Trascorrido este tiempo se hace un conteo con cámara de Neubauer.

El medio utilizado para que las levaduras puedan germinar es el Suero Fetal Bovino (SFB) el cual es preparado y descomplementado. En tubos de microcentrífuga de 1.5 mL se agregan 500 µL del suero, así como las concentraciones determinadas para CFM, CF₅₀ y CF₂₅, así como un testigo y un control negativo.

Se incubaron de dos a tres horas a 37 °C, transcurrido este tiempo se toma una muestra del tubo testigo de 10 µL y se coloca en la cámara de Neubauer donde se buscará la presencia de crecimiento del tubo germinativo. Una vez crecido el tubo en el testigo se procede al conteo de las levaduras que no tuvieron crecimiento del mismo en los tubos con las diferentes concentraciones.

Se reportó el porcentaje de inhibición por concentración, así como la CI₅₀ (concentración inhibitoria al 50%).

10.6 APÉNDICE 6

*Actividad del aceite esencial sobre la transcripción del gen *int1**

(Khodavandi et al, 2011[123])

Obtención y Purificación de RNA. Se utilizan suspensiones que contengan diferentes concentraciones de aceite y un inóculo de *C. albicans* de 1×10^6 células/mL y se deja incubar por 90 min a 37 °C, posteriormente las muestras fueron lavadas con PBS. A continuación el RNA se obtiene utilizando RNeasy mini kit (Qiagen, Germany).

Reacción de transcriptasa reversa. De acuerdo con el protocolo del fabricante, el cDNA de una cadena sintetiza aproximadamente 0.5-1 µg de RNA usando la transcriptasa reversa obtenida del virus de leucemia murina Moloney (M-MuLV), así como oligonucleótidos hexaméricos al azar (Fermentas, USA) como sustrato. Las reacciones de transcriptasa reversa se realizaron por triplicado.

PCR Tiempo real. Esta se llevará a cabo utilizando primers descritos en el cuadro 9, programando por 30 dentro del aparato, los cuales constaran de:

- Desnaturalización a 96 °C
- Elongación a 62 °C
- Extensión a 72 °C
- En el ciclo final de incubación a 72 °C

Cuadro 8. Primers utilizados para PCR

Gen	Primer	Secuencia	Producto	Referencia
<i>Int1</i>	Forward	5´AAGCTCTGATACCTACACTAGCGA 3´	239	[155]
	Reverse	5´GTTAGGTCTAAAGTCGAAGTCATC 3´		
Actina ^a	Forward	5´ACCGAAGCTCCAATGAATCCAAAATCC 3´	516	[156]
	Reverse	5´GTTTGGTCAATACCAGCAGCTTCCAAA 3´		
Actina ^b	Forward	5´GAGTTGCTCCAGAAGAACATCCAG 3´	199	[155]
	Reverse	5´TGAGTAACACCATCACCCAGAATCC 3´		

^a Primer utilizado en RT-PCR semicuantitativo

Control positivo. Se usará el gen de β -Actina el cual es un gen constitutivo o house-keeping y que por ende siempre se expresa, este ayudará a corroborar que la técnica se montó de manera óptima.

Control negativo. Se utilizará agua esterilizada

10.7 APÉNDICE 7

Modelo murino de candidiasis vaginal para la evaluación del efecto anti-Candida de aceites esenciales.

(Pietrella et al, 2010 [75])

Se utilizan ratones hembra CD1 de siete semanas, las cuales se mantienen en condiciones de pseudoestro, esto mediante una inyección subcutánea de valerato de estradiol (Sigma-Aldrich). Los ratones se inoculan con un inóculo de *C. albicans*. Los ratones se dejan recuperar durante 24 – 48 h, tiempo durante el cual se establece la infección por *C. albicans*. Pasado este tiempo se hace un frotis vaginal para confirmar el establecimiento de la infección.

Grupos de estudio y tratamientos con aceite esencial. Para este estudio se utilizaron 6 grupos los cuales fueron:

- Grupo 1. Ratones con tratamiento hormonal.
- Grupo 2. Ratones solo con la infección y sin ningún tipo de tratamiento.
- Grupo 3. Ratones con infección e inoculaciones de aceite de ajonjolí a los mismos tiempos que los tratamientos con el aceite esencial.
- Grupo 4. Se aplicará el tratamiento con aceite esencial a la concentración de CFM suministrándose tres veces al día por un periodo de 3 días.
- Grupo 5. Se aplicará el tratamiento con aceite esencial a la concentración de CF₅₀ suministrándose tres veces al día por un periodo de 3 días.
- Grupo 6. Tratamiento con fármaco comercial (Nistatina), a los mismos tiempos que el tratamiento con el aceite esencial.

Tratamiento. Los ratones se tratarán con el aceite esencial de *B. morelensis* introduciendo por vía vaginal 10 μ L del aceite dos veces al día, esto se repetirá a lo largo de 5 días que es el tiempo que dura el tratamiento.

10.8 APÉNDICE 8

Técnica Histológica

Una vez que las muestras se fijaron durante 24 h en Fijador de Zinc, posteriormente se inició con la deshidratación, impregnación e infiltración del tejido. En el mismo frasco donde se encuentran las muestras individualmente, se va agregando (30 mL aprox.) y cambiando cada alcohol.

Formación de bloques de parafina

Se llena el molde con parafina de inclusión caliente, con una pinza calentada en el mechero se toma el tejido y se sumerge hasta la base del molde procurando extender la muestra lo más que se pueda, sin dañar el tejido, en toda la superficie del molde. Se deja enfriar la parafina del molde y después se retira el cubo que contiene inmerso el tejido.

Cortes en el micrótopo

Un día antes de cortar, el bloque se coloca en el congelador para evitar que se caliente rápido con la fricción de la navaja, ya que si está caliente el bloque no se puede cortar. Los cortes finales tendrán un grosor de 5 micras, una vez obtenidos los cortes se colocan en un portaobjetos y se agregan unas gotas de Ruyter, desde una orilla del portaobjetos, para extender el tejido. El portaobjetos con el corte se coloca en una parrilla que está a 53° C (No rebasar esta temperatura porque se quema el tejido) y dejarlo aproximadamente 5 segundos, hasta ver que se extendió el tejido.

Tinción de P.A.S (Reacción del Ácido Peryódico de Schiff)

Las muestras ya montadas en el portaobjetos se colocan en canastillas y se desparafinan en la estufa durante 3 h aproximadamente, después se realiza la tinción de P.A.S. convencional.

Montaje



Concluido el proceso de tinción de los cortes, se procedió al montaje de los mismos. Este procedimiento consiste en colocar encima del corte una gota de resina sintética (sustancia adherente, marca HYCEL) y después, muy cuidadosamente colocar encima un cubreobjetos, procurando que no queden burbujas de aire. A continuación se deja secar la resina para que adquiera solidez suficiente y observar las muestras.

10. ANEXO 2

Artículo Publicado Indexado

Article

Anti-*Candida* Activity of *Bursera morelensis* Ramirez Essential Oil and Two Compounds, α -Pinene and γ -Terpinene—An In Vitro Study

C. Rebeca Rivera-Yañez ¹, L. Ignacio Terrazas ², Manuel Jimenez-Estrada ³, Jorge E. Campos ⁴ , Cesar M. Flores-Ortiz ⁵, Luis B. Hernandez ⁵, Tonatiuh Cruz-Sanchez ⁶, German I. Garrido-Fariña ⁷ , Marco A. Rodriguez-Monroy ⁸ and M. Margarita Canales-Martinez ^{1,*}

¹ Laboratorio de Farmacognosia, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México C.P. 54090, Mexico; rbkrivera14@gmail.com

² Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México C.P. 54090, Mexico; literrazas@campus.iztacala.unam.mx

³ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán CDMX 04510, Mexico; manuelj@unam.mx

⁴ Laboratorio de Bioquímica Molecular, Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México C.P. 54090, Mexico; jcampos@unam.mx

⁵ Laboratorio de Fisiología Vegetal, UBIPRO y Laboratorio Nacional en Salud, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala UNAM. Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México C.P. 54090, Mexico; cmflores@unam.mx (C.M.F.-O.); lbarbo@gmail.com (L.B.H.)

⁶ Laboratorio de Microbiología, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, Universidad Nacional Autónoma de México, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México C.P. 54700, Mexico; tonatiuh86@hotmail.com

⁷ Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, Universidad Nacional Autónoma de México. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México C.P. 54700, Mexico; isaurogafa@yahoo.com.mx

⁸ Laboratorio de Inmunobiología, Carrera de Medicina, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios Numero 1, Colonia Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México C.P. 54090, Mexico; dr.marcorodriguez@gmail.com

* Correspondence: magacm@yahoo.com.mx; Tel.: +52-5-623-11-27

Received: 2 November 2017; Accepted: 27 November 2017; Published: 5 December 2017

Abstract: The candidiasis caused by *C. albicans* is a public health problem. The abuse of antifungals has contributed to the development of resistance. *B. morelensis* has demonstrated antibacterial and antifungal activities. In this work the activity of the essential oil of *B. morelensis* was evaluated and for its two pure compounds with analysis of the different mechanisms of pathogenesis important for *C. albicans*. The essential oil was obtained by the hydro-distillation method and analyzed using GC–MS. The anti-*Candida* activity was compared between to essential oil, α -Pinene and γ -Terpinene. GC–MS of the essential oil demonstrated the presence of 13 compounds. The essential oil showed antifungal activity against four *C. albicans* strains. The most sensitive strain was *C. albicans* 14065 (MFC 2.0 mg/mL and MIC₅₀ 0.125 mg/mL) with α -Pinene and γ -Terpinene having MFCs of 4.0 and 16.0 mg/mL respectively. The essential oil inhibited the growth of the germ tube in 87.94% (8.0 mg/mL). Furthermore, it was observed that the essential oil diminishes the transcription of the

gene INT1. This work provides evidence that confirms the anti-*Candida* activity of the *B. morelensis* essential oil and its effect on the growth of the germ tube and transcription of the gene INT1.

Keywords: *Bursera morelensis*; burseraceae; *Candida albicans*; α -pinene; γ -terpinene

1. Introduction

Fungal infections have become increasingly common and represent a growing health problem in patients with weakened immune systems [1,2]. *Candida albicans* is a polymorphic organism which undergoes morphologic transitions between yeast, pseudohyphal and elongated hyphal forms [3]. This yeast is a commensal organism that normally colonizes the mucosal surfaces of healthy individuals and, under conditions of weak host immune system, these can become opportunistic pathogens [4,5]. Despite appropriate therapy, mortality resulting from systemic *C. albicans* infection in immunocompromised has reached 30% [6].

The establishment of *C. albicans* infection implies several mechanisms of pathogenicity, such as dimorphism, germ tube growth, expression of different adhesins like INT1p. It is important to emphasize that INT1 gene, has bifunctional properties, contributing to filamentous growth and also encodes an adhesin function [6,7].

In recent years, the incidence of fungal infections especially *Candida*-related disorders termed generally as “candidiasis” has increased dramatically in many countries [8]. On the other hand, it is known that disseminated infections with *C. albicans* cause significant morbidity and mortality among immunocompromised individuals, such as Human Immunodeficiency Virus (HIV) patients, transplant recipients, and cancer patients [8–11]. Furthermore, progression of the yeast with increasing the resistance of therapeutic conventional medicine increased the need for the most effective treatment [5].

For this reason, medicinal plants are an alternative, that involves discovery of new compounds that can inhibit the growth of this fungal species. The medicinal plants are the primary alternative in Mexican traditional medicine. The Cañada Region located in the Mexican State of Oaxaca, has a great variety of endemic plants which are commonly used in traditional medicine [12]. *Bursera morelensis* Ramírez belongs to the Burseraceae family, which has been used for preparing resin and bark infusions for the treatment of skin wounds [13,14], addition to alleviate diverse pains and bruises [15]. The aim of this study was to evaluate the anti-*Candida* activity of the essential oil extracted from *B. morelensis* and compare the activity of two present compounds in the essential oil.

2. Results

The physicochemical data of the essential oil included a density of 0.82 g/mL at 25° C, while 0.154% (*v/w*) of oil from the weight of the fresh product was obtained.

As shown in Table 1, thirteen compounds of the essential oil of *Bursera morelensis* were identified by GC–MS analysis which represented 100% of the total composition. The main compounds, which constituted a total of 75% of the peak area were the terpenes, namely γ -Terpinene (65.46%), β -Pellandrene (18.27%), α -Caryophyllene (5.13%) and α -Pinene (2.85%) (Table 1).

Table 1. Composition of essential oil of *Bursera morelensis* identified by GC–MS (Gas Chromatography–Mass Spectrometry) analysis.

Components	Retention Time	Abundance (%)
Thujane	4.924	0.15
α -Pinene	5.052	2.85
α -Phellandrene	5.453	1.58
β -Pinene	5.541	2.30
β -Phellandrene	5.814	18.27
γ -Terpinene	6.078	65.46
Isobutylbenzene	7.714	0.32
Cyclohexane	8.339	0.44
4-butan-2-yl-2,3-dihydrofuran	8.531	0.39
2-Acetylcyclopentanone	8.651	0.46
Caryophyllene	9.357	5.13
α -Caryophyllene	9.597	0.27
Caryophyllene oxide	10.479	0.34

Anti-Candida Assay

The results of the anti-*Candida* activity of the essential oil and pure compounds are shown in Table 2. All strains of *C. albicans* were sensitive when exposed to essential oil. Nevertheless, when comparing the areas of inhibition of the pure compounds it is possible to observe that γ -Terpinene was significantly different from α -Pinene and essential oil ($p < 0.05$) for all strains. Furthermore, there were significant differences between α -Pinene and essential oil in the strain CDBB-L-1003, ($p < 0.05$).

Table 2. Anti-*Candida* activity of essential oil from *B. morelensis*, α -Pinene and γ -Terpinene.

Strains	<i>B. morelensis</i>	α -Pinene	γ -Terpinene	Positive Control (Nystatin)
<i>C. albicans</i> ¹	10.0 \pm 1.00	9.7 \pm 0.58	7.0 \pm 0.00	18.0 \pm 1.00
<i>C. albicans</i> 14065	11.8 \pm 0.76	11.3 \pm 0.58	6.33 \pm 0.58	19.67 \pm 0.50
<i>C. albicans</i> 32354	11.3 \pm 0.58	11.3 \pm 1.15	7.0 \pm 0.00	22.0 \pm 2.00
<i>C. albicans</i> CDBB-L-1003	11.2 \pm 0.29	8.3 \pm 0.58	6.0 \pm 0.00	22.0 \pm 1.00

Inhibition halos measured in millimeters. ¹ Donated by the Clinical Laboratory of FES-Iztacala. Filter paper disks were impregnated either with 5 μ L of essential oil, α -Pinene (5 μ L) and γ -Terpinene (5 μ L).

The essential oil showed a Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of 2 mg/mL, which is a smaller concentration compared to that obtained by the α -Pinene and γ -Terpinene (4 and 16 mg/mL respectively) (Table 3).

Table 3. MIC (Minimal Inhibitory Concentration) and MFC (Minimum Fungicidal Concentration) of essential oil and pure compounds.

Strains	<i>B. morelensis</i>				α -Pinene			γ -Terpinene				
	MFC	MIC ₇₅	MIC ₅₀	MIC ₂₅	MFC	MIC ₇₅	MIC ₅₀	MIC ₂₅	MFC	MIC ₇₅	MIC ₅₀	MIC ₂₅
<i>C. albicans</i> ¹	2.0	0.25	0.125	0.062	4.0	1.0	0.5	0.125	16.0	12.0	6.0	4.0
<i>C. albicans</i> 14065	2.0	1.0	0.5	0.125	4.0	2.0	0.5	0.125	16.0	14.0	10.0	8.0
<i>C. albicans</i> 32354	2.0	0.5	0.125	0.062	4.0	1.0	0.5	0.065	16.0	10.0	6.0	2.0
<i>C. albicans</i> CDBB-L-1003	2.0	0.25	0.125	0.062	2.0	1.0	0.5	0.25	12.0	10.0	8.0	6.0

Concentrations in mg/mL. ¹ Donated by the Clinical Laboratory of FES-Iztacala.

Based on the results of the *B. morelensis* essential oil effect on *C. albicans* survival curve, it was observed that a slight population decline (MIC₅₀ and MFC) was observed at 12 h compared with the control (Figure 1).

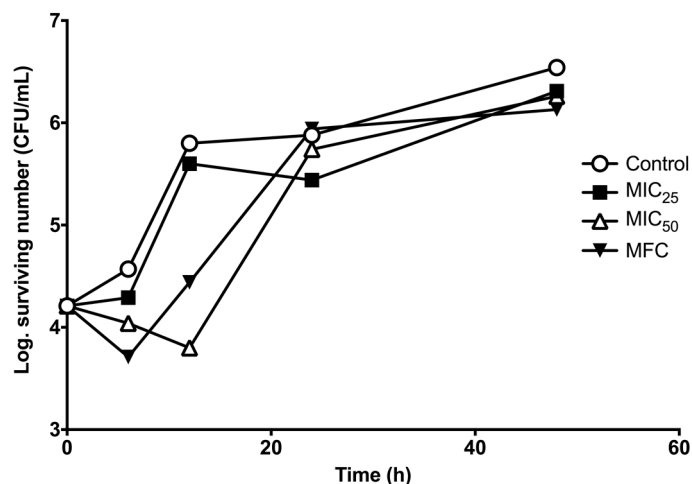


Figure 1. Survival curve of *C. albicans* 14065 after being exposed to essential oil of *B. morelensis*. The essential oil was added to each experimental culture at zero time. The essential oil concentrations used were: 0.0 mg/mL (Control), 0.25 mg/mL (MIC₂₅), 0.5 mg/mL (MIC₅₀) and 2.0 mg/mL (MFC).

In terms of the effect of the essential oil on the growth of *C. albicans* (14065) germ tube, 8.0 mg/mL of essential oil inhibited 87.94% of the growth of the germ tube after two hours of testing (Figure 2B), which indicates a CL₅₀ of 1.4 mg/mL (Figure 3).

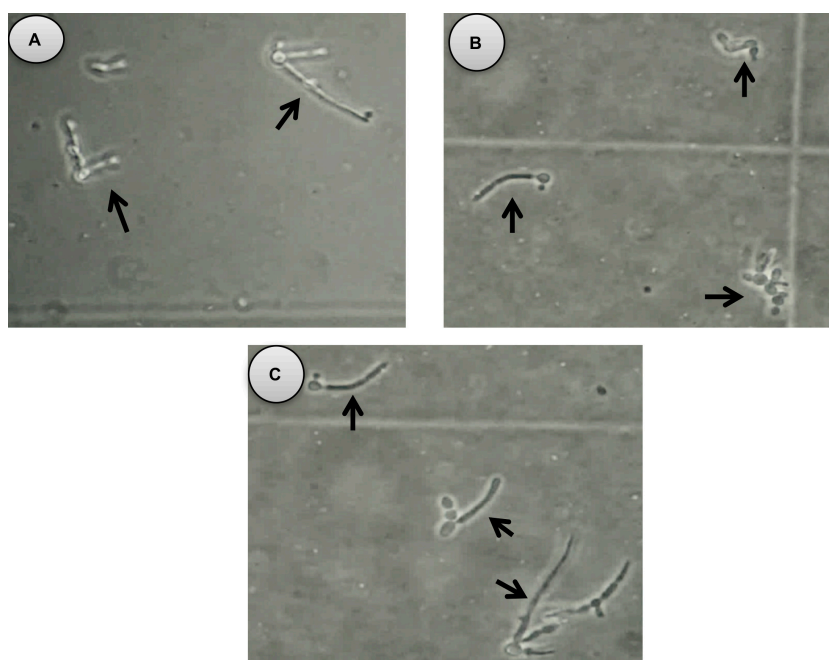


Figure 2. Germ tube growth after two hours of activation with fetal bovine serum with addition of (A) Control without essential oil; (B) Essential oil at a concentration of 8.0 mg/mL, which resulted in a decreased ability of the yeast to develop a germ tube; (C) Essential oil at a concentration of 0.5 mg/mL, with many yeast having normal germ tube growth, but some having poor growth. Arrows indicate the germ tube growth. Microphotographs were taken at 40 \times .

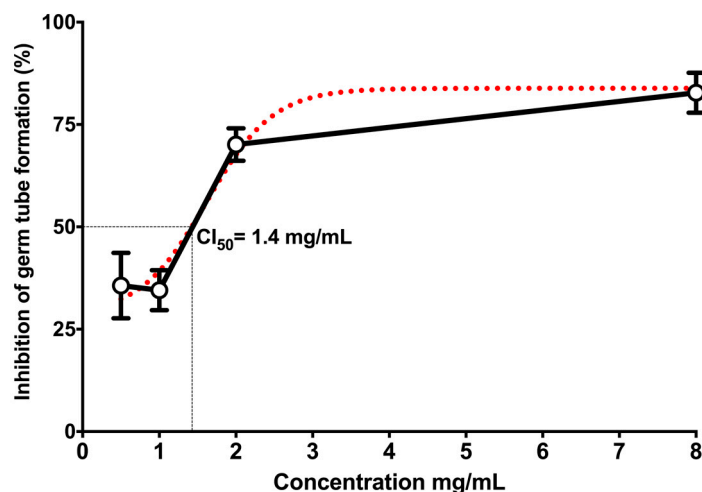


Figure 3. Effect of essential oil from *B. morelensis* concentration on germ tube growth of *C. albicans* 14065. Black line: experimental data; red dotted line: predicted values.

The cellular wall of the yeasts of the control tube show a strong blue showing the presence of chitin contained in the cell wall (Figure 4A,B); the cell membrane is intact and the propidium iodide is excluded from viable cells (Figure 4C), since the dye did not access DNA. Nevertheless, 10 mg/mL of the essential oil caused the loss of the integrity of the cell membrane, the propidium iodide easily penetrate the damaged permeable membranes of non-viable cells, and there was a binding of propidium iodide to DNA (Figure 4E,F), which shows the damage in the cellular membrane of *C. albicans* by the essential oil of *B. morelensis*.

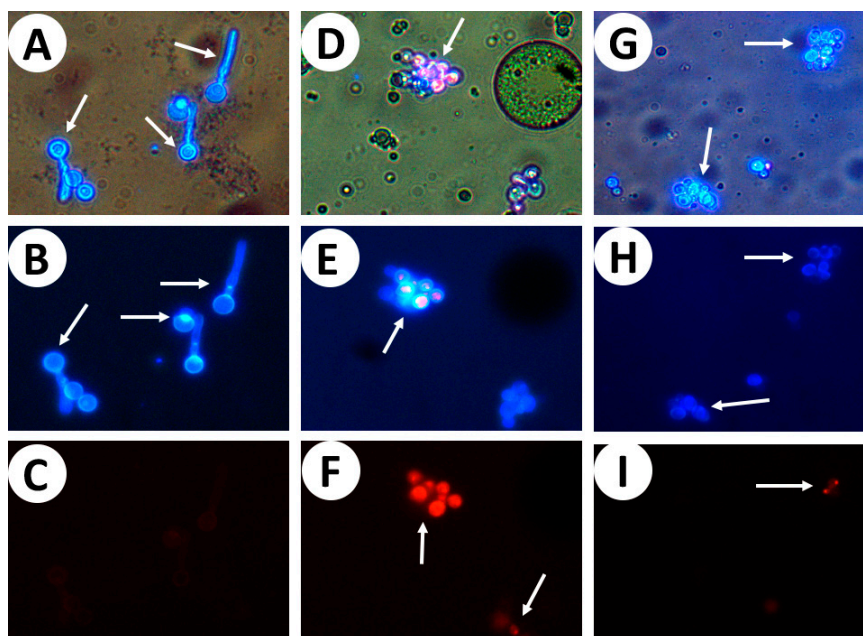


Figure 4. Microphotographs (40 \times) obtained in fluorescence microscopy and dyed with Calcofluor-white stain ((B,E,H), $\lambda = 360$ nm) and propidium iodide ((C,F,I), $\lambda = 536$ nm). Visible light (A,D,G). (A–C) shows the control, while (D–F) are the yeasts exposed to essential oil (10 mg/mL) for 2 h. (G–I) show the yeasts exposed to essential oil (2 mg/mL) for 2 h.

Adherence to host cells and tissues is considered as a key virulence factor of many human fungal pathogens [16]. For this reason, we evaluated the capacity of essential oil of *B. morelensis* to affect

the expression of the gene INT1 of *C. albicans*. Figure 5 shows the relative expression analysis of the gene INT1 by qRT-PCR. The essential oil of *B. morelensis* inhibits the expression of INT1, at the MIC_{12.5}, at which point there was 10% of the expression. With regards to both pure compounds used at different concentrations, 30–45% expression was observed, which means that the combination of these compounds in the essential oil, increases the independent effect on INT1 expression levels.

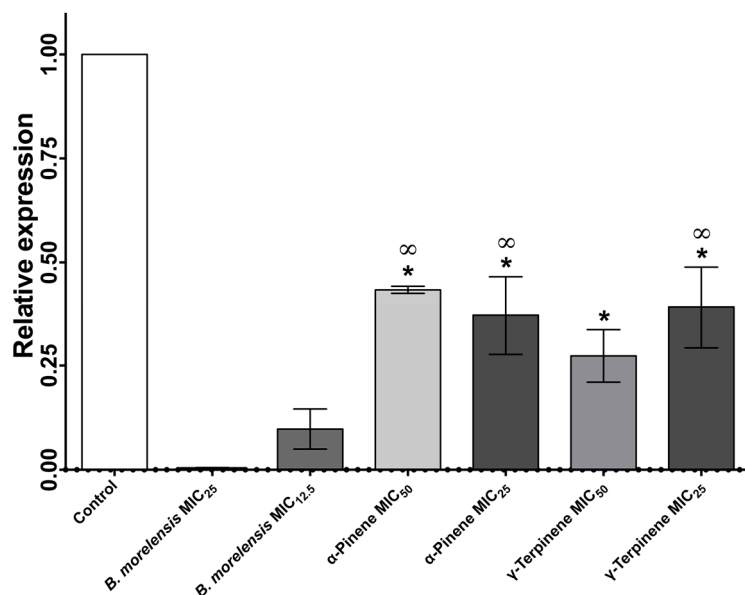


Figure 5. qRT-PCR of the expression of INT1 gene of *C. albicans* exposed to different concentrations of essential oil of *B. morelensis*, α -Pinene and γ -Terpinene. * Significant differences exist regarding the group of *B. morelensis* MIC₂₅ ($p < 0.05$). ∞ Significant differences exist regarding the group of *B. morelensis* MIC_{12.5} ($p < 0.05$).

3. Discussion

By GC–MS analysis, 13 compounds constituting the essential oil of *B. morelensis*, were obtained. The most abundant was γ -Terpinene (65.46%), followed by β -Phellandrene (18.27%). Carrera et al. [12] performed an analysis of the essential oil of *B. morelensis* collected in August and September 2012. They reported 23 compounds, of which 13 are present in the essential oil in this research. The compounds present can be directly related to the season in which samples were collected. Many factors can affect the chemical composition of the essential oils, such as, geographic location of the plants, surrounding climate, seasonal variations, stress during growth, plant ecotype or variety, plant nutrition and application of fertilizers [17].

Zengin and Basal [18], mentioned that the number of double bonds in a structure and the acyclic, monocyclic and/or bicyclic structure has no significant influence on the antimicrobial activity of monoterpenes, although a higher inhibitory activity is seen in aromatic compounds. As the lipophilic character of the membrane allows it to expand, this can result in increased membrane fluidity and permeability, disturbance of membrane-embedded proteins, inhibition of respiration, and alteration of ion transport processes [18]. The α -Pinene has been demonstrated to act on cell integrity, inhibiting respiration and ion transport processes, in addition to increasing membrane permeability in *C. albicans* [19–21]. On the other hand, the compounds making up a larger proportion of the essential oil are not necessarily responsible for the majority of the total activity. Therefore, this activity could be attributed to the presence of minor components, such as α -Pinene and β -Pinene (2.85% and 2.30%).

The essential oil of *B. morelensis* had effects on all *Candida* strains tested. The essential oil contains some compounds that induce altered cell permeability by insertion between the fatty acid chains of the phospholipids of the membrane, causing an increase in permeability and fluidity of the same [22,23].

Probably another mechanism of action of essential oils in fungi involves the inhibition of ergosterol synthesis. This is a triterpene present in the fungal membrane, and thus, inhibition would interrupt the formation of the membrane [24–27].

The essential oil has a fungistatic effect on the survival curve of *C. albicans*. It should be noted that in the case of azoles 20% yeast growth is allowed during the 48-h incubation [28]. It is important to observe that after 12 h of treatment the concentration of MIC₅₀ showed a decrease in the fungi population. Nevertheless, the increase of the fungi population with the FMC at 24 h was observed, this is probably due to trailing growth that is observed in the *Candida* species [29]. It is necessary to emphasize that the use of antifungals has been registered from the 1950s [30]. Since this time the development of antifungals against *C. albicans* always has been a priority for the scientific community. However, the prolonged management of candidiasis using antifungals might cause the development of drug-resistant candidiasis [12–14]. An alternative has involved the search for new treatments in medicinal plants.

The yeast-to-hyphal transition of *C. albicans* is linked to a number of properties, which is important for its interactions with the host. These properties include adhesion to epithelial and endothelial cells, primary and intercellular invasion via induced endocytosis, active penetration and escape of the phagocytes and immune evasion [31,32]. This transition plays a fundamental role in the virulence and pathogenicity [33,34]. According to the above information, it is important to assess whether the essential oil of *B. morelensis* has the ability to inhibit the growth of *C. albicans* [35]. For this reason, the inhibition of germ tube was evaluated which obtained an CL₅₀ of 1.4 mg/mL. It is noteworthy that this the first study about examining the effect of the *B. morelensis* essential oil on the inhibition of the germ tube of the *C. albicans*. This potential pharmacological target is important since the essential oil is acting on an important process in the morpho-transformation of *C. albicans* [21]. Furthermore, this essential oil also might act at the level of the synthesis occurring at the activation of glucan synthase, which is associated with the extensive synthesis of cell wall during the formation of hyphae [36]. This characteristic could suggest a new antifungal which is more selective towards the infecting yeast than towards the host cells [21] so we can't ignore this pathway inhibition of *C. albicans*.

It is important to indicate that the cell wall structure is dynamic and can adapt to different physiological states or environmental conditions [37]. It must provide the cell with sufficient mechanical strength to withstand changes in osmotic pressure by the environment [38]. Using the Calcofluor white stain, it can be seen the presence of chitin contained in the yeast cell wall. The integrity of cell membrane was lost using the concentration of 10 mg/mL of essential oil, propidium iodide is able to be inserted in the genetic material, which suggests that the essential oil also damages the cell membrane. Furthermore, it is known that the essential oils have the ability to damage the membrane mitochondrial [39], which might be one mechanism of action of the *B. morelensis* essential oil. This is very important because the damage generated in the cell membrane of *C. albicans* causes a profound effect on the growth and morphology of the fungal cell. This often renders it susceptible to lysis and death [38].

qRT-PCR allowed us to show the effect of the essential oil of *B. morelensis* on the expression of INT1, compared to different concentrations of pure compounds (α -Pinene and γ -Terpinene). After 24 h of interactions, we observed that the expression of the INT1 was drastically inhibited in the samples treated with the essential oil of *B. morelensis*. There were significant differences in the results of the essential oil of *B. morelensis* and the pure compounds. These results suggest a possible synergism between the compounds that constitute the essential oil of *B. morelensis*. Nevertheless, we must emphasize that the essential oil alters the expression of the gene that codifies the integrin INT1p. This is very important since the integrins are known to be important in the adhesion of *C. albicans* [40]. It has been mentioned that INT1p is an integrin involved in the adhesion of *C. albicans* to the host epithelial tissue [41]. Strains of *C. albicans* with knock-out INT1 genes are unable to adhere [7]. This is another possible mechanism of action of the essential oil of *B. morelensis*.

These factors of virulence include host recognition, which enables the pathogen to bind to the host cells and proteins, and adherence to host surfaces [5,42]. The growth of the germ tube [3,32] and the dimorphism between others are essential in the development of the infection caused by this yeast. Nevertheless, the use of the *B. morelensis* essential oil inhibited several of these factors, this ensure the success of the treatment. Therefore, the *B. morelensis* essential oil may be a new treatment for candidiasis.

4. Material and Methods

4.1. Collection and Identification of *B. morelensis*

The *B. morelensis* stems were collected in April 2011 in San Rafael, Coxcatlan, Puebla, while the botanical authentication of the specimen was done by M. C. Maria Edith Lopez Villafranco (curator at the IZTA Herbarium). Specimens were deposited in the herbarium IZTA at the Facultad de Estudios Superiores Iztacala (voucher No. 2412 IZTA).

The specimens were collected in the field with permission from the “Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales” (SGPA/DGVS/1266).

The collection site was San Rafael, which is a village in the municipality of Coxcatlan. This village is located southeast of the Tehuacan-Cuicatlan Valley at coordinates of 18°12'–18°14' N and 97°07'–97°09' W, which is 957 m above the sea level [43]. The climate is dry or arid with summer rains and a mean temperature of 22 °C [44].

4.2. Essential Oil Extraction

Essential oil from *B. morelensis* was obtained by the hydro-distillation method. The distillation equipment consisted of a round-bottomed flask of 1000 mL with a heating mantle (SEV-Prendo, MC301-9, Mexico City, Mexico) which was attached to a double pass condenser (designed by the Laboratory of Pharmacognosy at the FES Iztacala, UNAM, Tlalnepantla, Estado de Mexico, Mexico). This condenser was coupled to a cold-water circulator with controlled temperature. The essential oil was separated from the aqueous phase by density differences.

4.3. Essential Oil Chemical Composition

The analysis of the essential oil from *B. morelensis* was performed by GC–MS (Gas Chromatography–Mass Spectrometry) in a model 6850 chromatograph coupled to a mass spectrometer model 5975C, Agilent Technologies. The analysis was performed using a HP–5MS column Agilent Technologies, which had a length of 30 m, internal diameter of 0.25 mm and film of 0.25 microns. The type of injection was split, and the volume of sample used was 1 µL. The separation conditions were as follows: an initial temperature of 70 °C for two min followed by two increasing heating ramps. The first increasing heart ramp was at 20 °C per min up to 230 °C, while the second was in ramp at 8 °C per min up to 280 °C and held for five min, using a carrier gas of Helium. The total analysis time was 21.25 min. The detected mass range was 35–750 *m/z*, the sample was ionized by electron impact at 70 eV, and the temperature reached by the ionization source was 230 °C. The identification of the compounds was carried out by comparison with the database version 8.0 NIST library.

4.4. Fungal Strains

The extract was tested on four species of *C. albicans*: *C. albicans* ATCC 14065, *C. albicans* ATCC 32354, *C. albicans*¹ (donated by the Laboratory of Clinical Analysis of the FES-CUSI Iztacala), and *C. albicans* CDBB-L-1003.

4.5. Anti-Candida Assays

The anti-*Candida* activity was measured by the disk diffusion method [45]. The microorganisms were cultured at 36 °C for 48 h in 10 mL of Sabouraud broth (Difco, Tlalnepantla, Estado de Mexico, Mexico). Cultures were adjusted to turbidity comparable with that of McFarland no. 0.5 standard with sterile saline solution. Petri dishes containing PDA agar (Bioxon, Tlalnepantla, Estado de Mexico, Mexico) were impregnated with these microbial suspensions. Filter paper disks (Whatman No. 5) with a diameter of 5 mm were impregnated either with 5 µL of the essential oil, α -Pinene (5 µL) or γ -Terpinene (5 µL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Disks impregnated with Nystatin (25 µg) were used as positive controls. The plates were incubated overnight at 36 °C, and the diameter of growth inhibition zones (mm) was measured. Each experiment was repeated at least three times.

For quantitative assays, the broth dilution technique was used. An inoculum (4 µL) of 48 h growth was used. This inoculum was placed into microcentrifuge tubes (1.5 mL) with 396 µL of Sabouraud broth. A total of 4 µL of Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0.01% *v/v*) was then added, and finally the necessary amount of essential oil (4.0–0.065 mg/mL) or pure compounds (16.0–2.0 mg/mL) was added for each of the tested concentrations. A total of 130 µL of this solution, was then taken and placed in microcentrifuge tubes with a smaller capacity (0.6 mL). This was performed in triplicate. After the mixtures with the oil and pure compounds were incubated at 36 °C for 24 h, a sample was taken and grown in the petri dish for counting Colony Forming Units (CFU). Furthermore, 24 h after the concentration of Minimum Fungicidal Concentration (MFC), Fungicidal concentration at 75% (MIC₇₅), Fungicidal concentration at 50% (MIC₅₀) and Fungicidal concentration at 25% (MIC₂₅) were determined in mg/mL.

4.6. Survival Curve Assay

A tube for at least one of each concentration to test (preferably the correspondent concentrations to MFC, MIC₅₀ and MIC₂₅), were prepared with samples taken at 0, 6, 12, 24 and 48 h. A tube without extracts served as the development control. The inoculum with approximately 1×10^5 yeast/mL was prepared in a test tube with 10 mL of Sabouraud broth (this fungal concentration is achieved within 48 h of incubation).

4.7. Germ Tube Formation Assay

The germ tube formation assay was conducted in order to study the effect of essential oil on the yeast-to-hyphal transition of *C. albicans* 14065. Different concentrations (2, 0.5 and 0.25 mg/mL) of essential oil was diluted in fetal bovine serum (500 µL) and tween 80 (0.01% *v/v*). A total of 4 µL of an inoculum of 5×10^6 CFU/mL was added and the cells were incubated at 36 °C for 3 h. After this, the germinated cells were counted (control germ tube). We classified test tubes as germinated if they had a level of germ tubes three times higher than the original yeast. The negative control of tween 80 (0.01% *v/v*) was used. The assay was done by triplicate and were reported as percentage inhibition.

4.8. Cell Wall Integrity

Calcofluor-white (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and propidium iodide (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) dyes were used to evaluate the activity of the essential oil on the cell wall integrity of the *C. albicans*. Concentrations of 2 and 10 mg/mL of the essential oil was used, while a tube without treatment with the essential oil was used as a control.

4.9. RNA Extraction and cDNA Synthesis

Total RNA was isolated from suspensions with 1×10^5 yeast/mL containing different concentrations of *B. morelensis* essential oil. This was prepared as explained above using the AllPrep kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's operating instructions for yeast cells. Genomic DNA (gDNA) was removed from purified RNA by using TURBO DNase (Ambion,

Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions. RNA quality was checked by agarose gel electrophoresis at 80 V for 40 min and concentration was measured for purity estimation using the fluorometer (Thermo, Waltham, MA, USA). Single-stranded cDNA was synthesized using SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit (Thermo, Waltham, MA, USA) with oligo-dT.

4.10. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Synthesized cDNA was used to amplify *Candida albicans* INT1 gene with the primers and conditions established by Lim and Li [44]. B-actin was used as a housekeeping gene to normalize the expression [46]. The level expression of INT1 gene was calculated according to $E = Peff(-\Delta Ct)$, where $Peff$ is the primer efficiency calculated using LinRegPCR [47]. Fold changes were calculated between the ratio expressions of all conditions analyzed for two biological replicates.

4.11. Statistical Analysis

All experiments were performed in triplicate. The mean and standard deviation of three experiments were determined. Analysis of the data was done using the one-way analysis of variance (ANOVA) with a Tukey-Kramer Multiple Comparison post hoc test ($p < 0.05$) using GraphPad Prism 7 software. Inhibitory concentration 50 (IC_{50}), in the germ tube growth assay, by interpolation in the graph from the inhibition of germ tube formation (%) versus the concentration in mg/mL of the essential oil and through a logarithmic regression analysis with GraphPad Prism 7 software.

5. Conclusions

The essential oil of *B. morelensis* has more activity than the two pure compounds. This oil shows capacity for the inhibition of the growth of the germ tube. This also caused disruption of the cell membrane. The essential oil reduces the transcription of INT1, showing significant differences between the oil and the pure compounds. The results of this investigation show the anti-*Candida* activity of the essential oil.

Acknowledgments: Claudia Rebeca Rivera Yáñez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 254616 from CONACYT. The authors are grateful to Francisco Rodolfo González Díaz for his technical assistance. This research was funded by the UNAM PAPIIT IN212317 project.

Author Contributions: C. Rebeca Rivera-Yáñez designed the study and performed the research. L. Ignacio Terrazas and Jorge E. Campos designed and performed RNA extraction, cDNA synthesis and qRT-PCR. Manuel Jimenez-Estrada, Cesar M. Flores and Luis B. Hernandez designed and performed the chemical analysis. Tonatiuh Cruz-Sanchez and German I. Garrido-Fariña designed and performed germ tube formation assay and cell wall integrity, Marco A. Rodriguez-Monroy and M. Margarita Canales-Martinez were involved in the study design, organization, and resourcing and wrote the paper together with all other author. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Ascioğlu, S.; Rex, J.H.; de Pauw, B.; Bennett, J.E.; Bille, J.; Crokaert, F.; Denning, D.W.; Donnelly, J.P.; Edwards, J.E.; Erjavec, Z.; et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: An international consensus. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *34*, 7–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kibbler, C. Defining invasive fungal infections in neutropenic or stem cell transplant patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56* (Suppl. 1), i12–i16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Haghdoost, N.; Salehi, T.; Khosravi, A.; Sharifzadeh, A. Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. *J. Mycol. Méd.* **2016**, *26*, 298–305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Da Rosa, J.L.; Kaufman, P.D. Chromatin-mediated *Candida albicans* virulence. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1819*, 349–355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Zorić, N.; Kopjar, N.; Bobnjarić, I.; Horvat, I.; Tomić, S.; Kosalec, I. Antifungal Activity of Oleuropein against *Candida albicans*—The In Vitro Study. *Molecules* **2016**, *21*, 1631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Gale, C.A.; Bendel, C.M.; McClellan, M.; Hauser, M.; Becker, J.M.; Berman, J.; Hostetter, M.K. Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1. *Science* **1998**, *279*, 1355–1358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Kinneberg, K.M.; Bendel, C.M.; Jechorek, R.P.; Cebelinski, E.A.; Gale, C.A.; Berman, J.G.; Erlandsen, S.L.; Hostetter, M.K.; Wells, C.L. Effect of INT1 gene on *Candida albicans* murine intestinal colonization. *J. Surg. Res.* **1999**, *87*, 245–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Rahimi-Verki, N.; Shapoorzadeh, A.; Razzaghi-Abyaneh, M.; Atyabi, S.-M.; Shams-Ghahfarokhi, M.; Jahanshiri, Z.; Gholami-Shabani, M. Cold atmospheric plasma inhibits the growth of *Candida albicans* by affecting ergosterol biosynthesis and suppresses the fungal virulence factors in vitro. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2016**, *13*, 66–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Fekrazad, R.; Mir, A.P.B.; Barghi, V.G.; Shams-Ghahfarokhi, M. Eradication of *C. albicans* and *T. rubrum* with photoactivated indocyanine green, *Citrus aurantifolia* essential oil and fluconazole. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2015**, *12*, 289–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Kourkoumpetis, T.; Manolakaki, D.; Velmahos, G.; Chang, Y.; Alam, H.B.; De Moya, M.M.; Sailhamer, E.A.; Mylonakis, E. *Candida* infection and colonization among non-trauma emergency surgery patients. *Virulence* **2010**, *1*, 359–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Sudbery, P.E. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 737–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Alina, C.-M.C.; Rocío, R.-L.; Aurelio, R.-M.M.; Margarita, C.-M.M.; Angélica, R.-G.; Rubén, J.-A. Chemical Composition and In vivo Anti-inflammatory Activity of *Bursera morelensis* Ramírez Essential Oil. *J. Essent. Oil Bear. Plants* **2014**, *17*, 758–768. [[CrossRef](#)]
13. Canales-Martínez, M.; Rivera-Yañez, C.; Salas-Oropeza, J.; Lopez, H.; Jimenez-Estrada, M.; Rosas-Lopez, R.; Duran, D.; Flores, C.; Hernandez, L.; Rodriguez-Monroy, M. Antimicrobial activity of *Bursera morelensis* ramírez essential oil. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2017**, *14*, 74–82.
14. Khanna, A.; Rizvi, F.; Chander, R. Lipid lowering activity of *Phyllanthus niruri* in hyperlipemic rats. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *82*, 19–22. [[CrossRef](#)]
15. López-Hernández, L.R. Propiedades Medicinales y Determinación de los Compuestos del aceite Esencial de *Bursera morelensis* Ramirez. Bachelor's Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, 2011. Available online: <http://132.248.9.195/ptd2013/Presenciales/0704321/Index.html> (accessed on 20 November 2017).
16. Tscherner, M.; Schwarzmüller, T.; Kuchler, K. Pathogenesis and antifungal drug resistance of the human fungal pathogen *Candida glabrata*. *Pharmaceuticals* **2011**, *4*, 169–186. [[CrossRef](#)]
17. Raut, J.S.; Karuppayil, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Ind. Crop Prod.* **2014**, *62*, 250–264. [[CrossRef](#)]
18. Zengin, H.; Baysal, A.H. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. *Molecules* **2014**, *19*, 17773–17798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Cox, S.; Mann, C.; Markham, J.; Bell, H.; Gustafson, J.; Warmington, J.; Wyllie, S. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* **2000**, *88*, 170–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Lima, I.O.; de Araújo G. Oliveira, R.; de O. Lima, E.; de Souza, E.L.; Farias, N.P.; de Fátima Navarro, D. Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas* **2005**, *41*, 199–203. [[CrossRef](#)]
21. Tangarife-Castaño, V.; Correa-Royero, J.; Zapata-Londoño, B.; Durán, C.; Stanshenko, E.; Mesa-Arango, A.C. Anti-*Candida albicans* activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants. *Infectio* **2011**, *15*, 160–167. [[CrossRef](#)]
22. Carson, C.; Hammer, K.; Riley, T. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 50–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hammer, K.A.; Carson, C.; Riley, T. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* **1999**, *86*, 985–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Inouye, S.; Takizawa, T.; Yamaguchi, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, *47*, 565–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Inouye, S.; Tsuruoka, T.; Watanabe, M.; Takeo, K.; Akao, M.; Nishiyama, Y.; Yamaguchi, H. Inhibitory effect of essential oils on apical growth of *Aspergillus fumigatus* by vapour contact Hemmung des apikalen Wachstums von *Aspergillus fumigatus* durch Dämpfe ätherischer Ole. *Mycoses* **2000**, *43*, 17–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Parveen, M.; Hasan, M.; Takahashi, J.; Murata, Y.; Kitagawa, E.; Kodama, O.; Iwahashi, H. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to a monoterpene: Evaluation of antifungal potential by DNA microarray analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *54*, 46–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ricci, D.; Fraternali, D.; Giamperi, L.; Bucchini, A.; Epifano, F.; Burini, G.; Curini, M. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *98*, 195–200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Cantón, E.; Pemán, J. Curvas de letalidad en antifúngicos. *Rev. Iberoam. Micol.* **1999**, *16*, 82–85. [[PubMed](#)]
29. Mai, A.; Rotili, D.; Massa, S.; Brosch, G.; Simonetti, G.; Passariello, C.; Palamara, A.T. Discovery of uracil-based histone deacetylase inhibitors able to reduce acquired antifungal resistance and trailing growth in *Candida albicans*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1221–1225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Escobar, C.M.; Zuluaga, A. Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología. *Med. Cutan. Iber. Lat. Am.* **2004**, *32*, 231–242.
31. Cambi, A.; Netea, M.G.; Mora-Montes, H.M.; Gow, N.A.; Hato, S.V.; Lowman, D.W.; Kullberg, B.-J.; Torensma, R.; Williams, D.L.; Figdor, C.G. Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 20590–20599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lu, Y.; Su, C.; Liu, H. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. *Trends Microbiol.* **2014**, *22*, 707–714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Cheng, S.-C.; Joosten, L.A.; Kullberg, B.-J.; Netea, M.G. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect. Immun.* **2012**, *80*, 1304–1313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ishida, K.; de Mello, J.C.P.; Cortez, D.A.G.; Dias Filho, B.P.; Ueda-Nakamura, T.; Nakamura, C.V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *58*, 942–949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Rivera-Yañez, C. Actividad Anti-*Candida* de Cuatro Plantas Medicinales. Master's thesis, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico, 2013.
36. Kumar, R.; Shukla, P. Amphotericin B resistance leads to enhanced proteinase and phospholipase activity and reduced germ tube formation in *Candida albicans*. *Fungal Biol.* **2010**, *114*, 189–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Liesche, J.; Marek, M.; Günther-Pomorski, T. Cell wall staining with Trypan blue enables quantitative analysis of morphological changes in yeast cells. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Bowman, S.M.; Free, S.J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* **2006**, *28*, 799–808. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils—A review. *Food Chem. Toxicol.* **2008**, *46*, 446–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Hostetter, M.K. Integrin-like proteins in *Candida* spp. and other microorganisms. *Fungal Genet. Biol.* **1999**, *28*, 135–145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Gale, C.; Gerami-Nejad, M.; McClellan, M.; Vandoninck, S.; Longtine, M.S.; Berman, J. *Candida albicans* Int1p interacts with the septin ring in yeast and hyphal cells. *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 3538–3549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Silva, S.; Negri, M.; Henriques, M.; Oliveira, R.; Williams, D.W.; Azeredo, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol.* **2011**, *19*, 241–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Canales, M.; Hernandez, T.; Caballero, J.; Romo de Vivar, A.; Avila, G.; Duran, A.; Lira, R. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, Mexico. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 429–439. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Fernández, B.M.N. *Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje, en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla*; UNAM: DF Mexico, Mexico, 1999; Available online: <http://132.248.9.195/pd1999/274775/Index.html> (accessed on 20 November 2017).
45. Vanden, B.; Vlietinck, A. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In *Methods in Plant Biochemistry*; Dey, P.M., Harborne, J.B., Eds.; London Academic Press: London, UK, 1991.

46. Lim, C.S.Y.; Wong, W.F.; Rosli, R.; Ng, K.P.; Seow, H.F.; Chong, P.P. 2-dodecanol (decyl methyl carbinol) inhibits hyphal formation and SIR2 expression in *C. albicans*. *J. Basic Microbiol.* **2009**, *49*, 579–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Ramakers, C.; Ruijter, J.M.; Deprez, R.H.L.; Moorman, A.F. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **2003**, *339*, 62–66. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Samples of the essential oil and compounds are available from the authors.



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

11. REFERENCIAS

1. Londoño-Orozco A: **Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo mexicano y de tres plantas que *Apis mellifera* usa para su producción.** Instituto Tecnológico de Costa Rica; 2010.
2. Castanon Olivares Laura Rocio, Hernandez Hernandez Francisca, López Martínez Rubén, Javier MTL: **Micología médica: procedimientos para el diagnóstico de laboratorio**, 1 edn: Trillas; 1995.
3. Vecchiarelli A, Retini C, Monari C, Casadevall A: **Specific antibody to *Cryptococcus neoformans* alters human leukocyte cytokine synthesis and promotes T-cell proliferation.** *Infection and Immunity* 1998, **66**(3):1244-1247.
4. Arenas Guzmán R: **Micología: médica ilustrada:** Mc Graw Hill; 2008.
5. López-Martínez R: **I. Introducción Importancia actual de la micología médica en México.** *Gaceta Médica de México* 2008, **144**(2):121-122.
6. Rivera LEC, Ramos AP, Desgarenes CP: **Factores de virulencia en *Candida* sp.** *Dermatología Revista Mexicana* 2005, **49**(1):12-27.
7. Mendoza YM, Barrón DM, Escalante SA, del Carmen Sánchez M, Gayosso PM, Arenas R: **Candidemias en un hospital general de la Ciudad de México: estudio de sensibilidad a antifúngicos con el método de microplaca colorimétrica y microdilución en caldo.** *Dermatología Revista Mexicana* 2013, **57**(3):155-158.
8. Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T, Hof H, Morschhäuser J: **Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000, **97**(11):6102-6107.
9. Haghdoost N, Salehi T, Khosravi A, Sharifzadeh A: **Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*.** *Journal de mycologie medicale* 2016, **26**(4):298-305.
10. Sturtevant J, Calderone R: ***Candida albicans* adhesins: biochemical aspects and virulence.** *Revista iberoamericana de micología* 1997, **14**:90-97.
11. Marcilla A, Valentín E, Sentandreu R: **The cell wall structure: developments in diagnosis and treatment of candidiasis.** *International Microbiology* 1998, **1**(2):107-116.
12. Black CA, Eysers FM, Russell A, Dunkley ML, Clancy RL, Beagley KW: **Acute neutropenia decreases inflammation associated with murine vaginal candidiasis but has no effect on the course of infection.** *Infection and immunity* 1998, **66**(3):1273-1275.
13. Fidel PL: **History and update on host defense against vaginal candidiasis.** *American journal of reproductive immunology* 2007, **57**(1):2-12.
14. Panizzo MM, Pérez C, Maniscalchi MT: **Susceptibilidad *in vitro* a los antifúngicos de *Candida* sp. y serotipos de *Candida albicans* aisladas de pacientes con vaginitis primaria y resurgente.** *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2000, **20**(1).
15. Forsyth CB, Mathews HL: **Lymphocyte adhesion to *Candida albicans*.** *Infection and immunity* 2002, **70**(2):517-527.

16. Nomanbhoy F, Steele C, Yano J, Fidel Jr PL: **Vaginal and oral epithelial cell anti-*Candida* activity.** *Infection and immunity* 2002, **70**(12):7081-7088.
17. Pardi G, Cardozo EI: **Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal.** *Acta Odontológica Venezolana* 2002, **40**(1):9-17.
18. Steele C, Fidel PL: **Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*.** *Infection and immunity* 2002, **70**(2):577-583.
19. Wozniak KL, Wormley FL, Fidel PL: ***Candida*-specific antibodies during experimental vaginal candidiasis in mice.** *Infection and immunity* 2002, **70**(10):5790-5799.
20. de La Calle-Rodríguez N, Santa-Vélez C, Cardona-Castro N: **Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos.** *CES Medicina* 2012, **26**(1).
21. Cheng S-C, Joosten LA, Kullberg B-J, Netea MG: **Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense.** *Infection and immunity* 2012, **80**(4):1304-1313.
22. Saporito-Irwin SM, Birse CE, Sypherd PS, Fonzi WA: **PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis.** *Molecular and Cellular Biology* 1995, **15**(2):601-613.
23. Pérez-Parra A, Muñoz P, Guinea J, Martín-Rabadán P, Guembe M, Bouza E: **Is *Candida* colonization of central vascular catheters in non-candidemic, non-neutropenic patients an indication for antifungals?** *Intensive Care Medicine* 2009, **35**(4):707-712.
24. Lim C-Y, Rosli R, Seow H, Chong P: ***Candida* and invasive candidiasis: back to basics.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2012, **31**(1):21-31.
25. de Vasconcellos AA, Gonçalves LM, Cury AADB, da Silva WJ: **Environmental pH influences *Candida albicans* biofilms regarding its structure, virulence and susceptibility to fluconazole.** *Microbial pathogenesis* 2014, **69**:39-44.
26. Pedrós B: **Clonación y caracterización de una hidrofobina de clase II (CaHPB) de *Candida albicans*.** Tesis doctoral. Universitat de València/Estudi General; 2003.
27. Lu Y, Su C, Liu H: ***Candida albicans* hyphal initiation and elongation.** *Trends in microbiology* 2014, **22**(12):707-714.
28. Romani L, Bistoni F, Puccetti P: **Adaptation of *Candida albicans* to the host environment: the role of morphogenesis in virulence and survival in mammalian hosts.** *Current Opinion in Microbiology* 2003, **6**(4):338-343.
29. Klein BS, Tebbets B: **Dimorphism and virulence in fungi.** *Current Opinion in Microbiology* 2007, **10**(4):314-319.
30. Cuenca M, Gadea I, Martín E, Pemán J, Pontón J, Rodríguez J: **Diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2006.
31. Buffo J, Herman MA, Soll DR: **A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*.** *Mycopathologia* 1984, **85**(1-2):21-30.
32. Casanova M, Cervera AM, Gozalbo D, Martínez JP: **Hemin induces germ tube formation in *Candida albicans*.** *Infection and immunity* 1997, **65**(10):4360-4364.

33. Simonetti N, Strippoli V, Cassone A: **Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in *Candida albicans***. *Nature* 1974, **250**(5464):344.
34. Hube B, Naglik J: ***Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family**. *Microbiology* 2001, **147**(8):1997-2005.
35. Reyes JV, Arenas R: **Candidiasis mucocutánea. Una revisión**. *Scientia Fungorum* 2007, **3**(25):91-103.
36. Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD: ***Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans***. *Clinical Microbiology Reviews* 1999, **12**(1):80-96.
37. Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP: **Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998, **62**(1):130-180.
38. Fukazawa Y, Kagaya K: **Molecular bases of adhesion of *Candida albicans***. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 1997, **35**(2):87-99.
39. Hostetter MK: **Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces**. *Clinical microbiology reviews* 1994, **7**(1):29-42.
40. Panizo M, Reviákina V: ***Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas**. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2001, **21**(2):38-45.
41. Kulak Y, Arikan A, Kazazoglu E: **Existence of *Candida albicans* and microorganisms in denture stomatitis patients**. *Journal of oral rehabilitation* 1997, **24**(10):788-790.
42. Kim J, Sudbery P: ***Candida albicans*, a major human fungal pathogen**. *The Journal of Microbiology* 2011, **49**(2):171.
43. Serrano C: **Estudio *in vitro* de la adherencia de *Candida albicans* a las resinas acrílicas**. *Trabajo de investigación para optar al grado de Odontólogo* 2002, **121**.
44. Gordon R, Stephen S: **Biofilm of *Candida albicans*. A update**. *Eukaryotic Cell* 2005, **4**(4):633-638.
45. Calderone RA, Fonzi WA: **Virulence factors of *Candida albicans***. *Trends in Microbiology* 2001, **9**(7):327-335.
46. Klis F, Groot PD, Hellingwerf K: **Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans***. *Medical Mycology* 2001, **39**(1):1-8.
47. Sundstrom P: **Adhesins in *Candida albicans***. *Current Opinion in Microbiology* 1999, **2**(4):353-357.
48. Rooney PJ, Klein BS: **Linking fungal morphogenesis with virulence**. *Cellular Microbiology* 2002, **4**(3):127-137.
49. Gale CA, Bendel CM, McClellan M, Hauser M, Becker JM, Berman J, Hostetter MK: **Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *Candida albicans* to a single gene, INT1**. *Science* 1998, **279**(5355):1355-1358.
50. Munro CA, Bates S, Buurman ET, Hughes HB, MacCallum DM, Bertram G, Atrih A, Ferguson MA, Bain JM, Brand A: **Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant α -1, 2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence**. *Journal of Biological Chemistry* 2005, **280**(2):1051-1060.
51. Blanco MT, Sacristán B, Lucio L, Blanco J, Pérez-Giraldo C, Gomez-Garcia A: **Cell surface hydrophobicity as an indicator of other virulence factors in *Candida albicans***. *Revista Iberoamericana de Micología* 2010, **27**(4):195-199.

52. Gulati M, Nobile CJ: **Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms.** *Microbes and Infection* 2016, **18**(5):310-321.
53. Douglas LJ: **Candida biofilms and their role in infection.** *Trends in Microbiology* 2003, **11**(1):30-36.
54. Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL: **Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem.** *FEMS Yeast Research* 2006, **6**(7):979-986.
55. Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A: **Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of Candida albicans, Cryptococcus neoformans and Aspergillus fumigatus.** *Acta Biochimica Polonica* 2009, **56**(2):211.
56. Calderone RA, Braun PC: **Adherence and receptor relationships of Candida albicans.** *Microbiological Reviews* 1991, **55**(1):1-20.
57. Merino Guzmán G, Cedillo Ramírez L, Silva Andrade F, Muñoz García AA, Roldán C, Iracena E: **Análisis morfológico de biopelículas de Candida albicans producidas en diferentes condiciones de pH y temperatura analizadas por microscopía óptica y de fuerza atómica.** *Revista Mexicana de Micología* 2011, **33**:1-8.
58. Kumar R, Shukla P: **Amphotericin B resistance leads to enhanced proteinase and phospholipase activity and reduced germ tube formation in Candida albicans.** *Fungal Biology* 2010, **114**(2-3):189-197.
59. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B: **Hydrolytic enzymes as virulence factors of Candida albicans.** *Mycoses* 2005, **48**(6):365-377.
60. Abad-Zapatero C, Goldman R, Muchmore SW, Hutchins C, Stewart K, Navaza J, Payne CD, Ray TL: **Structure of a secreted aspartic protease from C. albicans complexed with a potent inhibitor: implications for the design of antifungal agents.** *Protein Science* 1996, **5**(4):640-652.
61. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B: **Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003, **67**(3):400-428.
62. Haynes K: **Virulence in Candida species.** *Trends in Microbiology* 2001, **9**(12):591-596.
63. Pontón J, Quindós G: **Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica.** *Medicina Clínica* 2006, **126**:56-60.
64. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R: **Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients.** *Annals of Surgery* 1994, **220**(6):751.
65. Quentin N, Russel M: **Bacteriología y micología médicas.** *Interamericana Mc Graw Hill* 1991:22.
66. Wilfert C: **Zinsser Microbiology, 18th edn. ed. Joklik, WK, Willet, JP & Amoss, DB Norwalk, Connecticut: Appleton-Century-Crofts** 1983:493-498.
67. Perea E: **Infecciones del aparato genital femenino: vaginitis, vaginosis y cervicitis.** *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 2010, **10**(57):3910-3914.
68. Ziarrusta GB: **Vulvovaginitis candidiásica.** *Revista Iberoamericana de Micología* 2002, **19**(1):22-24.
69. Kwong-Chung K, Bennett J: **Mucormycosis.** *Medical mycology Philadelphia: Lea & Febiger* 1992:524-559.

70. Rippon J: **Therapy in the immunosuppressed host in: Antifungal Drug Therapy;** 1990.
71. del Palacio A, Villar J, Alhambra A: **Epidemiología de las candidiasis invasoras en población pediátrica y adulta.** *Revista Iberoamericana de Micología* 2009, **26**(1):2-7.
72. Geiger A, Foxman B, Sobel J: **Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with *Candida albicans*, *C. glabrata* and no candida.** *Sexually Transmitted Infections* 1995, **71**(5):304-307.
73. Geiger AM, Foxman B: **Risk factors for vulvovaginal candidiasis: a case-control study among university students.** *Epidemiology* 1996:182-187.
74. Sobel JD: **Vulvovaginal candidosis.** *The Lancet* 2007, **369**(9577):1961-1971.
75. Pietrella D, Rachini A, Torosantucci A, Chiani P, Brown AJ, Bistoni F, Costantino P, Mosci P, d'Enfert C, Rappuoli R: **A β -glucan-conjugate vaccine and anti- β -glucan antibodies are effective against murine vaginal candidiasis as assessed by a novel in vivo imaging technique.** *Vaccine* 2010, **28**(7):1717-1725.
76. Vargas B, Parcha C, Reyes Arenas E: **Antifúngicos de uso clínico, análisis de un laboratorio de micología.** *Cienc Trab* 2005, **7**(15):9-16.
77. Gavalda J, Ruiz I, MICOMED, GESITRA, SEIMC: **Guidelines for the treatment of infection due to *Aspergillus* spp.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2003, **21**(10):571.
78. Rüping MJ, Vehreschild JJ, Cornely OA: **Patients at high risk of invasive fungal infections.** *Drugs* 2008, **68**(14):1941-1962.
79. Lumbreras C, Lizasoain M, Aguado JM: **Antifúngicos de uso sistémico.** *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2003, **21**(7):366-380.
80. Carrillo-Muñoz AJ, Brió S, Quindós G: **Una nueva generación de fármacos antifúngicos.** *Rev Iberoam Micol* 2001, **18**(1):2-5.
81. Fica A: **Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol.** *Revista Chilena de Infectología* 2004, **21**(1):26-38.
82. Tiphine M, Letscher-Bru V, Herbrecht R: **Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability.** *Transplant Infectious Disease* 1999, **1**(4):273-283.
83. Cuenca-Estrella M: **Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias.** *Revista Española de Quimioterapia* 2010, **23**(4):169-176.
84. Tkacz JS, DiDomenico B: **Antifungals: what's in the pipeline.** *Current Opinion in Microbiology* 2001, **4**(5):540-545.
85. Escobar C, Zuluaga Á: **Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología.** *Medicina Cutánea Ibero Latino Americana* 2004, **32**(6):231-242.
86. Denning DW: **Echinocandins: a new class of antifungal.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002, **49**(6):889-891.
87. Odds FC, Brown AJ, Gow NA: **Antifungal agents: mechanisms of action.** *Trends in Microbiology* 2003, **11**(6):272-279.
88. Fernández CAM, Uría JC, Arenas RdC, Perurera JM, Iribar WT: **Tratamiento de las micosis profundas. Estado actual.** *Acta Medica* 1998, **8**(1):80-85.
89. Arango AM, Sánchez JB, Galvis LB: **Productos naturales con actividad antimicótica.** *Revista Española de Quimioterapia* 2004, **17**(4):325-331.

90. Abiodun Falodun VI, Osayewenre Erharuyi, Ahomafor Joy, Peter Langer, Melissa Jacob, Shabanna Khan, Mohammed Abaldry, Mark Hamann: **Insolation of antileishmanial, antimalarial and antimicrobial metabolites from *Jatropha multifida***. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2014, **4**(5):374-378.
91. Organization WH: **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023**. Ginebra: World Health Organization 2013.
92. Rivera-Yañez CR: **Actividad anti-Candida de cuatro plantas medicinales**. *Maestria*. Instituto Politécnico Nacional; 2013.
93. Ocegueda S, Moreno E, Koleff P: **Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica**. CONABIO. *Biodiversitas* 2005, **62**:12-15.
94. Canales M, Hernández T, Caballero J, De Vivar AR, Avila G, Duran A, Lira R: **Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México**. *Journal of Ethnopharmacology* 2005, **97**(3):429-439.
95. Rosas-López R: **Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán**. Universidad Nacional Autónoma de México; 2003.
96. López-Hernández LR: **Propiedades medicinales y determinación de los compuestos del aceite esencial de *Bursera morelensis* Ramiez**. Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.
97. Purata S: **Uso y manejo de los copales aromáticos: resinas y aceites**. México: CONABIO/RAISES 2008.
98. Rzedowski J: **Vegetación de México. 1a. Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad**. México. 504pp. In.; 2006.
99. Canales-Martínez M, Rivera-Yañez C, Salas-Oropeza J, Lopez H, Jimenez-Estrada M, Rosas-Lopez R, Duran D, Flores C, Hernandez L, Rodriguez-Monroy M: **Antimicrobial activity of *Bursera morelensis* ramírez essential oil**. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines* 2017, **14**(3):74.
100. Carrera-Martínez CA, Rosas-López R, Rodríguez-Monroy MA, Canales-Martínez MM, Román-Guerrero A, Jiménez-Alvarado R: **Chemical composition and *in vivo* anti-inflammatory activity of *Bursera morelensis* Ramírez Essential Oil**. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 2014, **17**(5):758-768.
101. Martínez J, Sulbarán de Ferrer B, Ojeda de Rodríguez G, Ferrer A, Nava R: **Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina**. *Revista de la Facultad de Agronomía* 2003, **20**(4):502-512.
102. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M: **Biological effects of essential oils—a review**. *Food and chemical toxicology* 2008, **46**(2):446-475.
103. Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore GC, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, Tundis R, Sharifi-Rad M, Loizzo MR, Ademiluyi AO: **Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems**. *Molecules* 2017, **22**(1):70.
104. Boatto G, Pintore G, Palomba M, De Simone F, Ramundo E, Iodice C: **Composition and antibacterial activity of *Inula helenium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils**. *Fitoterapia* 1994, **65**:279-280.
105. Raut JS, Karuppayil SM: **A status review on the medicinal properties of essential oils**. *Industrial Crops and Products* 2014, **62**:250-264.
106. Hammer KA, Carson CF, Riley T: **Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and**

- Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004, **53**(6):1081-1085.
107. Tangarife-Castaño V, Correa-Royero J, Zapata-Londoño B, Durán C, Stanshenko E, Mesa-Arango AC: **Anti-*Candida albicans* activity, cytotoxicity and interaction with antifungal drugs of essential oils and extracts from aromatic and medicinal plants.** *Infectio* 2011, **15**(3):160-167.
 108. Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA, Sattelle DB: **Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*.** *British Journal of Pharmacology* 2003, **140**(8):1363-1372.
 109. Duschatzky CB, Possetto ML, Talarico LB, García CC, Michis F, Almeida NV, de Lampasona MP, Schuff C, Damonte EB: **Evaluation of chemical and antiviral properties of essential oils from South American plants.** *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 2005, **16**(4):247-251.
 110. Liu C, Mishra A, Tan R, Tang C, Yang H, Shen Y: **Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean.** *Bioresource Technology* 2006, **97**(15):1969-1973.
 111. Burfield T, Reekie S-L: **Mosquitoes, malaria and essential oils.** *International Journal of Aromatherapy* 2005, **15**(1):30-41.
 112. Kouninki H, Haubruge E, Noudjou F, Lognay G, Malaisse F, Ngassoum M, Goudoum A, Mpongmetsem P, Ngamo L, Hance T: **Potential use of essential oils from Cameroon applied as fumigant or contact insecticides against *Sitophilus zeamais* Motsch.(Coleoptera: Curculionidae).** *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 2005, **70**(4):787-792.
 113. Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG: **Natural products (secondary metabolites).** *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* 2000, **24**:1250-1319.
 114. Betts TJ: **Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases.** *Journal of Chromatography a* 2001, **936**(1-2):33-46.
 115. Pichersky E, Noel JP, Dudareva N: **Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity.** *Science* 2006, **311**(5762):808-811.
 116. Martínez A: **Aceites esenciales.** *Jornal of Natural Products* 1996, **59**(1):77-79.
 117. Sharifi-Rad J, Sureda A, Tenore G, Daglia M, Sharifi-Rad M, Valussi M, Tundis R, Sharifi-Rad M, Loizzo M, Ademiluyi A: **Biological activities of essential oils: From plant chemoeology to traditional healing systems.** *Molecules* 2017, **22**(1):70.
 118. Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud J-M, Imbert C: **In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 2008, **31**(6):572-576.
 119. Rzedowski J, Guevara-Féfer F: **Familia Burseraceae:** Instituto de Ecología; 1992.
 120. Van den Berge A, Vlietinck A: **Methods in plants biochemistry. Vol. 6. Assays for bioactivity.** Hostettmann K. Ed. In.: Academic press, London; 1991.
 121. Koneman A, Dowell J, Sommers W: **Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en Diagnóstico Microbiológico.** *Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en Diagnóstico Microbiológico* 1996.

122. Ishida K, de Mello JCP, Cortez DAG, Filho BPD, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV: **Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006, **58**(5):942-949.
123. Khodavandi A, Harmal NS, Alizadeh F, Scully OJ, Sidik SM, Othman F, Sekawi Z, Ng KP, Chong PP: **Comparison between allicin and fluconazole in *Candida albicans* biofilm inhibition and in suppression of HWP1 gene expression.** *Phytomedicine* 2011, **19**(1):56-63.
124. Estrada L: **La importancia de las ciencias químicobiológicas en la medicina tradicional.** *Summaries of the Primer Coloquio de "Medicina Tradicional; Un saber en Extinción.*
125. Robles L, Sandoval L: **Importancia de las buenas prácticas de fabricación en la manufactura de remedios herbolarios.** In: *Summaries of the Primer Congreso Nacional de Medicina Tradicional en el Huizachtepetl (Cerro de la Estrella), Iztapalapa México: FES-Zaragoza, UNAM, Delegación Iztapalapa.* 21-24.
126. Lucero P: **Chemical analysis of resinous materials employed in artistic pre-hispanic Mexico: application to aztec and maya archaeological samples.** Université d'Avignon; 2012.
127. Langenheim JH: **Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany:** Timber Press; 2003.
128. Agarwal V, Lal P, Pruthi V: **Effect of plant oils on *Candida albicans*.** *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 2010, **43**(5):447-451.
129. Silva ACRd, Lopes PM, Azevedo MMBd, Costa DCM, Alviano CS, Alviano DS: **Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers.** *Molecules* 2012, **17**(6):6305-6316.
130. Lima IO, Oliveira RdAG, Lima EdO, Souza ELd, Farias NP, Navarro DdF: **Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2005, **41**(2):199-203.
131. Cox S, Mann C, Markham J, Bell H, Gustafson J, Warmington J, Wyllie S: **The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil).** *Journal of Applied Microbiology* 2000, **88**(1):170-175.
132. Dorman H, Deans SG: **Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils.** *Journal of Applied Microbiology* 2000, **88**(2):308-316.
133. Gavanji S, Sayedipour SS, Larki B, Bakhtari A: **Antiviral activity of some plant oils against herpes simplex virus type 1 in Vero cell culture.** *Journal of Acute Medicine* 2015, **5**(3):62-68.
134. Moussaoui F, Alaoui T: **Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants.** *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2016, **6**(1):32-37.
135. Santana-Rios G, Orner GA, Amantana A, Provost C, Wu S-Y, Dashwood RH: **Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the Salmonella assay.** *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2001, **495**(1):61-74.
136. Salah-Fatnassi KBH, Hassayoun F, Cheraif I, Khan S, Jannet HB, Hammami M, Aouni M, Harzallah-Skhiri F: **Chemical composition, antibacterial and antifungal activities**

- of flowerhead and root essential oils of *Santolina chamaecyparissus* L., growing wild in Tunisia.** *Saudi Journal of Biological Sciences* 2017, **24**(4):875-882.
137. Sentandreu R, Martinez J, Elorza M, Mormeneo S: **Relationships between dimorphism, cell wall structure, and surface activities in *Candida albicans*.** In: *Candida Albicans*. Springer; 1991: 72-88.
 138. Yoo C-B, Han K-T, Cho K-S, Ha J, Park H-J, Nam J-H, Kil U-H, Lee K-T: **Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells.** *Cancer Letters* 2005, **225**(1):41-52.
 139. Armstrong JS: **Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death.** *Bioessays* 2006, **28**(3):253-260.
 140. Greene CE, Martínez H, Ana F, Valenzuela R, María T: **Enfermedades infecciosas: perros y gatos:** Interamericana; 1993.
 141. Sumano H, Ocampo L: **Farmacología veterinaria.** *MCGraw-Hill Interamericana Segunda edición México* 1997.
 142. Dentone S, Morales Cauti S: **Determinación *in vitro* de la Actividad Antimicótica del Aceite de Romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Microsporium canis*.** *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 2017, **28**(1):56-61.
 143. Turkova A, Roilides E, Sharland M: **Amphotericin B in neonates: deoxycholate or lipid formulation as first-line therapy—is there a ‘right’ choice?** *Current Opinion in Infectious Diseases* 2011, **24**(2):163-171.
 144. Dupont B: **Overview of the lipid formulations of amphotericin B.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002, **49**(1):31-36.
 145. Sabra R, Branch RA: **Amphotericin B nephrotoxicity.** *Drug Safety* 1990, **5**(2):94-108.
 146. Moen MD, Lyseng-Williamson KA, Scott LJ: **Liposomal amphotericin B.** *Drugs* 2009, **69**(3):361-392.
 147. Goldman RD, Ong M, Wolpin J, Parshuram C, Koren G, Doyle J: **Pharmacological risk factors for amphotericin B nephrotoxicity in children.** *The Journal of Clinical Pharmacology* 2007, **47**(8):1049-1054.
 148. Wingard JR, Kubilis P, Lee L, Yee G, White M, Louise W, Bowden R, Anaissie E, Hiemenz J, Lister J: **Clinical significance of nephrotoxicity in patients treated with amphotericin B for suspected or proven aspergillosis.** *Clinical Infectious Diseases* 1999, **29**(6):1402-1407.
 149. Cagnoni PJ, Walsh TJ, Prendergast MM, Bodensteiner D, Hiemenz S, Greenberg RN, Arndt CA, Schuster M, Seibel N, Yeldandi V: **Pharmacoeconomic analysis of liposomal amphotericin B versus conventional amphotericin B in the empirical treatment of persistently febrile neutropenic patients.** *Journal of Clinical Oncology* 2000, **18**(12):2476-2483.
 150. Safdar A, Ma J, Saliba F, Dupont B, Wingard JR, Hachem RY, Mattiuzzi GN, Chandrasekar PH, Kontoyiannis DP, Rolston KV: **Drug-induced nephrotoxicity caused by amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B: a review and meta-analysis.** *Medicine* 2010, **89**(4):236-244.
 151. Machado-de-Sena R, Correa L, Kato I, Prates R, Senna A, Santos C, Picanço D, Ribeiro M: **Photodynamic therapy has antifungal effect and reduces inflammatory signals in *Candida albicans*-induced murine vaginitis.** *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2014, **11**(3):275-282.

152. Donders GG, Bellen G, Mendling W: **Management of recurrent vulvo-vaginal candidosis as a chronic illness.** *Gynecologic and Obstetric Investigation* 2010, **70**(4):306-321.
153. Rahman D, Mistry M, Thavaraj S, Challacombe SJ, Naglik JR: **Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonization to study epithelial host-pathogen interactions.** *Microbes and Infection* 2007, **9**(5):615-622.
154. Domínguez XA: **Métodos de investigación fitoquímica.** In.; 1973.
155. Lim Y-H, Lee D-H: **Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*.** *The Journal of Microbiology* 2002, **40**(2):146-150.
156. Low C, Chong P, Yong P, Lim C, Ahmad Z, Othman F: **Inhibition of hyphae formation and SIR2 expression in *Candida albicans* treated with fresh *Allium sativum* (garlic) extract.** *Journal of Applied Microbiology* 2008, **105**(6):2169-2177.