



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
AREA DE QUIMICA
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA PARA EL DESARROLLO
DE ANTINEOPLÁSICOS Y ANTIFÚNGICOS|**

**“EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*ORIGANUM VULGARE*) EN
CÉLULAS DE CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS Y DE
QUERATINOCITOS ORALES DISPLÁSICOS IN VITRO”**

FRANCISCO ESTEBAN PÉREZ GONZÁLEZ

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario Rodrigo Diaz Dosque

TUTORES ASOCIADOS

Dr. José Antonio Jara Sandoval

**Adscrito a Proyecto FIOUCH S19-16
Santiago - Chile
2022**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS
AREA DE QUIMICA
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA PARA EL DESARROLLO
DE ANTINEOPLÁSICOS Y ANTIFÚNGICOS**

**“EFECTO DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*ORIGANUM VULGARE*) EN
CÉLULAS DE CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS Y DE
QUERATINOCITOS ORALES DISPLÁSICOS IN VITRO”**

FRANCISCO ESTEBAN PÉREZ GONZÁLEZ

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario Rodrigo Diaz Dosque

TUTORES ASOCIADOS

Dr. José Antonio Jara Sandoval

**Adscrito a Proyecto FIOUCH S19-16
Santiago - Chile
2022**

DEDICATORIAS

Quiero dedicar esta tesis a mi hija Camila, para que vea que, con constancia y sacrificio, se pueden alcanzar logros que a veces parecen imposibles o muy lejanos. Sé que con el pasar de los años, uno mira la vida desde distintos ángulos, y valora las cosas que realmente importan y que quedan para siempre grabadas en nuestro espíritu y corazón. Quiero que mi hija vea, que este ciclo que cierro es el comienzo de un nuevo camino lleno luces y sombras y que solo los más fuertes logran trascender. Hija mía, nunca olvides, “el trabajo todo lo vence”.

AGRADECIMIENTOS

En el desarrollo de este trabajo agradezco a mi tutor el Dr. Mario Díaz Dosque, por la oportunidad de conocer, trabajar y desarrollar una investigación innovadora y desafiante en el área de la exploración científica y que me permitió ampliar el horizonte del conocimiento, más allá de la odontología clásica. Siempre en el Dr. Diaz encontré el apoyo, confianza y guía para realizar esta tarea. Al Dr. José Jara, agradezco por su conocimiento, experiencia y manejo frente a un tema nuevo para mí y que lo hizo mucho más comprensible y motivante. La calidad humana y cercanía de ambos docentes es una cualidad muy importante para destacar y que me hizo tener una experiencia muy agradable cada vez que compartía con ellos.

Agradezco a los distintos funcionarios de la facultad de odontología, con los cuales muchas veces conversé y establecí una relación de cordialidad y cercanía. También muy agradecido de muchos compañeros del ramo de Integral II, que me acogieron y ayudaron al reintegrarme a la carrera.

Finalmente agradezco a toda mi familia siempre apoyándome en todo este proceso. A mi esposa, Rosa Villalobos que constantemente me alentaba y me decía “que no bajara los brazos, cada vez falta menos y que no me rindiera”. A mi hermano Cristian que siempre estuvo ayudándome, de manera incondicional. A mis papas que con cariño y amor siempre estaban presentes cuando los necesitaba. Todo este soporte emocional me ayudo a que pudiese terminar con estos largos años de estudio y que cuando veía todo el camino oscuro y sin salida, apareciera una luz de esperanza.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Cáncer oral y su relevancia	2
Plantas medicinales	7
Extracción de aceites esenciales	10
Plantas con potencial de medicinal	11
<i>Origanum vulgare</i>	11
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Recolección de muestras	15
Obtención de aceites esenciales	15
Caracterización química de los aceites esenciales	15
Evaluación del efecto citotóxico en células de carcinoma espinoso celular	17
RESULTADOS	19
Caracterización del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>	19
Citotoxicidad celular en líneas celulares CAL-27 del aceite de <i>Origanum vulgare</i>	21
Citotoxicidad celular en líneas celulares DOK del aceite de <i>Origanum vulgare</i>	22
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIÓN	30
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	31

RESUMEN

El cáncer se caracteriza por la multiplicación acelerada y descontrolada de células anormales, según la OMS es una de las causas principales de muerte a nivel mundial. En la cavidad oral el 90% de los tumores malignos son carcinomas orales de células escamosas, que producen gran daño, con graves consecuencias funcionales y estéticas, situación que se agrava aún más, por su diagnóstico, donde la mayoría de las veces es tardío. El tratamiento de neoplasias malignas orales puede causar graves secuelas en los pacientes y tener alta mortalidad en etapas avanzadas, lo que hace necesario buscar nuevas alternativas para su tratamiento.

Los aceites esenciales (AEs) podrían ser una buena opción para nuevas terapias antitumorales coadyuvantes, ya que los AEs provenientes de diversas plantas han mostrado tener efecto citotóxico en líneas celulares tumorales con distintos grados de efectividad, entre ellos el AE de ***Origanum vulgare*** (orégano).

En este estudio, fue extraído, mediante arrastre por vapor de agua, AE de ***Origanum vulgare*** proveniente de plantas de la Región Metropolitana de Chile, fue caracterizado por GC-MS y puesto a prueba su efecto citotóxico en líneas de carcinoma oral de células escamosas CAL-27 y de queratinocitos orales displásicos DOK en tiempos de 48 horas mediante ensayo de viabilidad celular MTT.

Los componentes de *Origanum vulgare* fueron principalmente monoterpenos destacando el hidrato de cis-sabineno (16,72 %) como compuesto principal, seguido de timol (14,20 %), 4-terpineol (13,57 %) y γ -terpineno (11,66 %). El AEO presentó efectividad citotóxica en las líneas CAL-27 y DOK con un IC₅₀ de 1,001 μ g/mL y 1,237 μ g/mL respectivamente a las 48 hrs.

Esta capacidad citotóxica demostrada en las líneas celulares CAL-27 y DOK, indica que el AE de ***Origanum vulgare*** podría ser buen candidato para futuros tratamientos contra carcinoma oral y/o otras neoplasias orales.

INTRODUCCIÓN

i. Cáncer oral y su relevancia

La palabra cáncer se emplea para referirse a un grupo de más de 100 enfermedades distintas con más de 1,000 variedades histopatológicas. El cáncer corresponde a una enfermedad multifactorial y que supone a nivel mundial una de las causas más importantes de mortalidad. Implica una compleja sucesión de eventos que generalmente ocurren durante muchas décadas (Hahn y Weinberg, 2002). Las células cancerosas proliferan sin medida, ajenas al control de los organismos pluricelulares, por medio de mitosis repetidas, extendiéndose más allá de los límites normales e invadiendo regiones adyacentes del cuerpo, propagándose a otros órganos (Mateo-Sidrón y Somacarrera., 2015; Hahn y Weinberg, 2002). También el crecimiento de estas células tumorales puede estar condicionado por la tasa de muerte celular (inhibición de la apoptosis) a través de la activación de un grupo de proteínas que llevan a cabo la degradación celular. (Elmore S, 2007).

El cáncer oral es un tipo de cáncer de cabeza y cuello (Harrison y cols, 2009) y corresponde a la sexta neoplasia más frecuente a nivel mundial (Kumar y cols, 2016). Se presenta de manera más común en pacientes de 50 años en adelante, afectando mayoritariamente a hombres más que a mujeres, con una incidencia en el año 2012, de 4,0 casos nuevos por 100.000 habitantes: 5,5 casos nuevos por 100.000 hombres y de 2,5 casos por cada 100.000 mujeres, con una mortalidad en hombres de 2,7 por cada 100.000 hombres y en mujeres de 1,2 por cada 100.000 mujeres (Mateo-Sidrón y Somacarrera, 2015; Santelices y cols, 2016).

Esta patología tiene una distribución mundial desigual, siendo en los continentes de mayor incidencia, Asia del Sur y Sudeste junto con Europa del oeste y el este, específicamente los países con mayor incidencia son Francia y Hungría (Warnakulasuriya, 2009). En Latinoamérica, la situación no es muy diferente, las incidencias más altas se reportan en Argentina, sur de Brasil y Uruguay. A modo de ejemplo, en Brasil se estimó que para el año 2014 habría 576.580 casos nuevos de

cáncer y, de estos, unos 15.000 afectando sólo a la cavidad oral: 11.280 en hombres y 4.010 mujeres. (Wunsch-Fiho y de Camargo, 2001).

De acuerdo con la clasificación del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (2021), el cáncer oral considera las siguientes estructuras anatómicas: labio, dos tercios de la parte anterior de la lengua, mucosa bucal, piso de la boca, encía inferior, trígono retromolar, encía superior y paladar duro (Santelices y cols, 2016). El 90% del cáncer oral corresponde a carcinoma escamoso (CE) o espinocelular (Riera y Martínez, 2005; García-García y Bascones, 2009)

En nuestro país no existen estudios actualizados sobre las características epidemiológicas de la enfermedad. De acuerdo con los “Registros poblacionales de Cáncer en Chile” para el periodo 2003-2007 (Ministerio de Salud 2012), la incidencia estimada de cáncer de la cavidad oral y faringe fue de 3,4 casos nuevos por 100.000 hombres y de 1,3 casos nuevos por 100.000 mujeres; la mortalidad de 3,2 cada 100.000 en hombres y 1,2 cada 100.000 en mujeres. Este es el único registro nacional publicado por el Ministerio de Salud, que recopila información de solo 3 de las 15 regiones del país (Antofagasta, Los Ríos y Bío-Bío) y no ha existido una nueva actualización de los datos nacionales. Otros registros de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer que al 2018 muestran, para nuestro país, una incidencia de 1,3 cada 100.000 habitantes en hombres y 0,7 cada 100.000 en mujeres; con una mortalidad de 0,69 cada 100.000 en hombres y 0,26 cada 100.000 en mujeres.

En el estudio de Riera y Martínez (2005) se analizaron registros anteriores, publicando que “la tasa bruta de mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile aumentó desde 1955 hasta 1980, sin embargo, para el periodo 1981 a 2002, la tasa se estabilizó manteniéndose relativamente constante, existiendo incluso una leve disminución”. Ramirez y cols., (2015) recopilaron datos desde los registros de defunciones del Departamento de Estadística e Información de Salud del MINSAL, estudiaron la mortalidad en el periodo 2002-2010 y plantean: “Las tasas de mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile entre los años 2002 y 2010 fluctuaron entre 1,11 a 1,25 por 100.000 habitantes, manteniéndose estables a lo largo del

periodo y sin presentar mayores cambios respecto a lo reportado por Riera y cols (2005).”

Dentro de los factores de riesgo, el consumo de tabaco sigue predominando como uno de los factores más importante en la génesis del cáncer, con millones de muertes al año (Kumar y cols, 2016). Los estudios epidemiológicos muestran que el riesgo de desarrollar cáncer oral es de cinco a nueve veces mayor para los fumadores que para los no fumadores, y este riesgo puede aumentar hasta 17 veces más para los fumadores extremadamente pesados (80 o más cigarrillos por día). (Neville y Day, 2002). El porcentaje de pacientes con cáncer oral que fuman (aproximadamente el 80%) es de dos a tres veces mayor que el de la población general, los pacientes tratados con cáncer oral que continúan fumando tienen un riesgo de dos a seis veces mayor de desarrollar una segunda neoplasia maligna del tracto aero-digestivo superior que aquellos que dejan de fumar (Samet, 2002; Muthukrishnan y Warnakulasuriya, 2018). Adicional a lo anterior masticar tabaco también se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer oral (Kumar y cols, 2016; Neville y Day, 2002). Sin embargo, el uso de tabaco sin fumar parece estar asociado con un riesgo de cáncer mucho menor que el asociado con el tabaco fumado (Neville y Day., 2002). El consumo de alcohol se ha identificado como otro factor de riesgo para los cánceres del tracto aero-digestivo superior. Un estudio de Francia mostró que los bebedores extremadamente empedernidos (más de 100 gramos de alcohol por día) tenían un riesgo 30 veces mayor de desarrollar cáncer oral y orofaríngeo (Brouha y cols, 2005). De mayor importancia aún es el efecto sinérgico del alcohol y el tabaquismo; algunos subgrupos de pacientes que son fumadores y bebedores empedernidos tienen cien veces más riesgo de desarrollar una neoplasia maligna que personas que no fuman ni beben alcohol. (Blot y cols, 1988; Brouha y cols, 2005).

El cáncer oral casi nunca aparece en un epitelio normal y saludable, usualmente, hay un cambio patológico perceptible que precede al crecimiento neoplásico y que está restringido al epitelio denominado displasia epitelial (DE). Evidencias señalan que mientras más severa es la DE, mayor probabilidad de transformación maligna, por lo que se destaca la importancia de una adecuada caracterización de los rasgos histopatológicos de cada subtipo de DE. No obstante, presentar DE no es sinónimo

de malignización segura de la lesión (Aguirre y Aguirre, 2008; Martínez y cols, 2016). En base a los antecedentes anteriores adquiere mucha importancia la detección temprana de lesiones precancerosas como son leucoplasia y eritroplasia. La leucoplasia se define como una lesión blanca de la mucosa. Histológicamente es una lesión que tiene células displásicas, con potencial de malignización. (Mateo-Sidrón y Somacarrera, 2015). Las lesiones eritroplásicas son, como su nombre lo indica, rojas, pequeñas, con o sin acompañamiento de lesiones leucoplásicas. Cuando las lesiones eritroplásicas están ulceradas tienen un alto riesgo de ser algún tipo de neoplasia maligna (García-García y Bascones, 2009).

Los signos clínicos del cáncer oral son a menudo sutiles y muchas veces asintomáticos por eso cualquier lesión de la cavidad oral, que no se resuelva en 2-3 semanas, debe levantar la sospecha del odontólogo tratante (Wong y Wiesenfeld, 2018). Estas lesiones pueden incluir (www.cancer.gov):

- Ulceración-erosión en labios o cavidad oral: La destrucción de la integridad epitelial es un signo que indica una alteración en la maduración del epitelio, así como la pérdida de las conexiones intercelulares y la alteración de la membrana basal.
- Masa o aumento del grosor de los labios.
- Sangrado, dolor o adormecimiento en labios o cavidad oral.
- Movilidad dentaria sin causa aparente.
- Problemas para masticar, mover la lengua o la mandíbula.
- Inflamación de la mandíbula.
- Disfagia u odinofagia.
- Otolgia, La presencia de otalgia refleja es un síntoma poco frecuente pero muy característico de los tumores avanzados de Cabeza y Cuello. Ante la presencia de una otalgia, no basta con una exploración otoscópica normal, es preciso realizar una adecuada exploración de la cavidad oral y la faringe, sobre todo si el paciente tiene criterio de riesgo, (varón, mayor de 45 años, fumador y/o bebedor).

- Linfadenopatía cervical.

El diagnóstico inicial de cáncer oral depende de la experiencia del Odontólogo o incluso del propio paciente cuando es capaz de identificar una lesión sospechosa, que se encuentra en un estadio temprano (Mateo-Sidrón y Somacarrera, 2015). Incluye una completa anamnesis para determinar posibles factores de riesgo, por ejemplo; si el paciente es fumador, bebedor o ambos (efecto sinérgico aumentando el riesgo cien veces más de lo normal), acompañada de una exhaustiva y buena exploración clínica, tanto extra como intraoral. (Pelucchi y cols, 2007; Neville y Day, 2002).

Como las lesiones suelen ser asintomáticas en sus primeras etapas, en el momento que el paciente decide consultar al profesional, frecuentemente, se encuentra ya con un cuadro grave. Por lo que aún nos encontramos con que el mayor número de casos son diagnosticados en estadios III o IV que, a pesar de los avances técnicos y los descubrimientos de nuevos tratamientos, tienen un muy mal pronóstico (Yao y cols, 2007).

El tratamiento del cáncer oral es un esfuerzo multidisciplinario, ya que cada paciente presenta a los médicos tratantes un conjunto único de desafíos cuyo manejo impacta tanto en la supervivencia como en la calidad de vida (Wong y Wiesenfeld, 2018). El enfoque principal para tratar las neoplasias malignas sigue siendo quirúrgico, cuyo objetivo es extirpar completamente el tumor con márgenes quirúrgicos compuestos de tejido sano. Pero con la introducción de la radioterapia y quimioterapia la cirugía sola, ya no es la opción ideal especialmente en casos avanzados de la enfermedad (Deng y cols, 2011).

La cirugía combinada con el uso de radioterapia postoperatoria es una modalidad de tratamiento común para los cánceres orales. La radioterapia utiliza rayos de alta energía o partículas para destruir las células cancerosas, generalmente se aplica después de la cirugía debido a la dificultad de extirpar quirúrgicamente el tejido irradiado a medida que los tejidos se fibrosan y tienden a sanar más lentamente (Spencer y cols, 2002)

La quimioterapia se ha convertido en otra modalidad complementaria destacada para el cáncer oral. Es una terapia sistémica cuyo objetivo es destruir las células malignas que se dividen rápidamente para controlar la propagación del tumor y la metástasis. Aunque generalmente no es una modalidad curativa por si sola, se puede utilizar antes de la cirugía, al mismo tiempo que la irradiación, después de la cirugía o ambas (Specenier y cols, 2009).

Sin embargo, estas terapias (cirugía, radioterapia y quimioterapia) producen efectos adversos que ocurren con frecuencia durante y después del tratamiento del cáncer oral (Logan y cols, 2009), observándose defectos quirúrgicos y consecuencias fisiológicas (Mateo-Sidrón y Somacarrera, 2015) en los individuos, muchos de ellos califican el dolor como el peor síntoma experimentado. Además de afectar significativamente la calidad de vida del paciente y la capacidad de tolerar un tratamiento continuo que lleve a su mejoría; deteriorando en gran medida la función y la apariencia oral causando cambios en el estado de ánimo, lo que puede resultar en ansiedad y depresión. (Epstein y cols, 2012; Deng y cols, 2011).

ii. **Plantas medicinales**

El uso de las plantas medicinales (Fitoterapia) ha perdurado exitosamente a lo largo de la historia humana, transmitiéndose por generaciones con diversas formas de preparación y administración (Dias y cols, 2012). Por este motivo es que gran parte de la medicina convencional ha utilizado y sigue utilizando productos derivados de plantas (Chinsebu, 2016).

Algunos de los componentes de las plantas que han ganado interés en los últimos años son los llamados aceites esenciales (AE) que corresponde a un fluido hidrófobo que contiene moléculas complejas de bajo peso molecular (usualmente <500 Da), volátiles, que son sintetizadas por plantas aromáticas. Los componentes que forman los AE son resultados de metabolitos secundarios, estos permiten que la planta interactúe con microorganismos, insectos y otros seres vivos, entre sus funciones, participan en procesos de protección frente a factores ambientales como temperatura, humedad, tipo de suelo, radiación UV, entre otros. Anatómicamente se

encuentran en glándulas que pueden estar ubicadas en varias partes de la planta como hojas, flores, frutos, semillas, cortezas y raíces (Bayala y cols, 2014). Por lo tanto, los AE pueden tener una alta variabilidad, incluso dentro de una misma especie, ya que su composición puede ser afectada por características propias de cada planta, las condiciones a las que se enfrenta y el momento en que son recolectadas las muestras. Aquí radica la importancia de la caracterización de las muestras cuando se estudie sus efectos farmacológicos.

Los numerosos componentes de los AE, se pueden clasificar de manera simple en los siguientes grupos funcionales. (Tabla 1)

Grupo Funcional	Naturaleza Química	Ejemplo
Hidrocarburos	Terpénicos	Limoneno, α -terpineno
	Aromaticos	Cumeno, p -cimeno
	Sesquiterpénicos	Trans- β -Cariofileno
Aldehídos	Monoterpénicos	Citral
	Alifáticos	Nonanal, Octadenal
	Aromáticos	Cinamaldehido
Alcoholes	Monoterpénicos	Geraniol, citronelol
	Alifáticos	3-Decanol
	Sesquiterpénicos	Espatulenol, cedrol
	Aromáticos	Alcohol bencílico
Fenoles	Aromáticos	Timol, carvacrol

Tabla 1. Clasificación de los componentes de los aceites esenciales (Schoonhoven y cols., 2005).

Los AE tienen efectos sobre varias patologías pues presentan una potente actividad antioxidante, antimutagénica, antibacteriana, antiinflamatoria y antiviral, (Hickl y cols, 2018; Gursoy y cols, 2009) debido a un número de compuestos

fenólicos y terpenos presentes, (de Groot y Schmidt, 2016), además presentan posibles agentes antitumorales, siendo una fuente prometedora en el campo farmacológico para el manejo y la prevención de patologías orales (Dagli y cols, 2015). Estos se caracterizan por ser reconocidos como productos seguros (GRAS - Generalmente reconocidas como seguras) (Cossu y cols, 2015) por la FDA (Administración de alimentos y medicamentos en los Estados Unidos de América) y la EPA (agencia de protección del medio ambiente) (Pavoni y cols, 2020), por lo tanto, son capaces de reducir los riesgos para la salud humana, los animales y el medio ambiente.

Los AE con potencial anticancerígeno pueden actuar de dos maneras: como quimiopreventivos y supresores de cáncer mediante diversos mecanismos (Gautam y cols, 2014). Los AE al ser de carácter lipofílico, pasan a través de la pared celular y la membrana citoplásmica, alteran la estructura de sus diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y los permeabilizan actuando en diferentes vías de señalización (Páez-Hernández y cols, 2019). Se han identificado diversos mecanismos como la apoptosis, detención del ciclo celular, inhibición de la angiogénesis y la reparación del ADN, los cuales, son responsables del efecto anticancerígeno que presentan los AE; reduciendo, la proliferación de células cancerígenas, la metástasis y la resistencia a medicamentos, lo que los convierte en candidatos potenciales para terapias antineoplásicas (Gautam y cols, 2014). Otra de las principales propiedades de los AE es que suelen ser citotóxicos para las células cancerígenas, mientras que inducen la proliferación de las células normales, lo que representa una gran ventaja en el uso de AE (Gautam y cols, 2014; Bakkali y cols, 2008).

Sin embargo, aún existe un gran terreno inexplorado del potencial terapéutico de las plantas, por lo que en los últimos años ha existido un auge en los estudios de las medicinas complementarias y particularmente de los aceites esenciales demostrando con bases científicas sus efectos farmacológicos (Bayala y cols, 2014). Algunos de los beneficios que han demostrado los AE como tratamiento o complemento a fármacos tradicionales son su eficacia de acción, bajo costo y pocos efectos secundarios (Edris, 2007).

III. Extracción de aceites esenciales

Para lograr la extracción de los AE pueden utilizarse diversas técnicas, las que se basan en romper la pared de las células vegetales para liberar las gotas de aceite que se encuentran en el citoplasma y luego colectarlas. La técnica que se usó en esta tesis es:

- *Destilación por arrastre de vapor:* Es la técnica más usada y permite extraer el 93% del aceite esencial (Aziz y cols, 2018). Es un método de destilación en donde se coloca la planta recomendablemente fresca en el extractor. Al calentar la caldera se evapora el agua y pasa al extractor en donde se evapora el aceite volátil, que se condensa posteriormente en el condensador, recogiendo la mezcla agua floral-aceite esencial en un vaso de precipitado en el que ocurrirá la separación al cabo de cierto tiempo por diferencia de densidades. El aceite se retirará del vaso y se depositará en una pera de decantación para una mejor separación (Baser, 2008) (Figura 1).

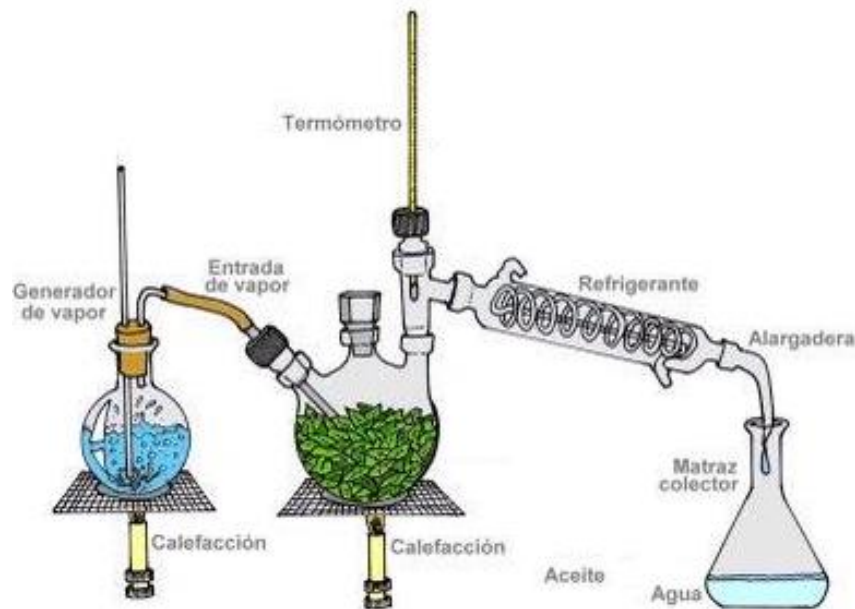


Figura 1, diseño de destilación por arrastre de vapor

IV. Plantas con potencial de medicinal:

Nuestro país posee una amplia variedad climática a lo largo de todo su territorio, lo que brinda una gran biodiversidad. Esto hace que se pueda cultivar en él numerosas y diversas especies vegetales (Moreira-Muñoz y cols, 2017). Sin embargo, la composición y cantidad de sus metabolitos es muy variable dependiendo de su georreferenciación, factores climáticos, altitud, época de cosecha, y estado de crecimiento.

Varios estudios han mostrado que una gran diversidad de plantas afectan el desarrollo de distintos cánceres in vitro en humanos (Cha y cols, 2010; Zu y cols, 2010; Bayala y cols, 2014)., como la *Salvia officinalis* en el melanoma, *Melissa officinalis* en el cáncer de mama, *Curcuma wenyujin* en líneas celulares hepáticas, *Limón cítrico* en células de adenocarcinoma de cuello uterino, *Citrus aurantifolia* en cáncer de colon, *Hierba de San Juan* en el adenocarcinoma prostático o el glioblastoma (Gautam y cols, 2014; Bayala y cols, 2014)

Para esta investigación, nos hemos centrado en una planta de la zona central; *Origanum vulgare*, planta herbácea, rústica, perenne, que crece como una mata, su altura varía entre 35 y 45 cm. Tiene su origen en la región mediterránea de Europa, aunque se encuentra distribuida en los cinco continentes. Los principales países productores en América Latina son: México, Brasil, Chile y Costa Rica. En Chile comúnmente está en la zona norte y centro, tiene gran distribución tanto en zonas urbanas como rurales y con bajas exigencias de cultivo, por lo que es de fácil acceso para su estudio y futuras aplicaciones (Ruiz y cols, 2009).

V. Origanum vulgare:

El nombre "orégano" se usa para referirse a una gran variedad de plantas que comparten un sabor y olor particulares. Al menos 61 especies y 17 géneros pertenecientes a seis especies botánicas diferentes se conocen. *Verbenaceae* y *Lamiaceae* son las familias que más sobresalen debido a su importancia económica. La hoja del orégano se usa no solo como condimento de alimentos sino también en

la elaboración de cosméticos, fármacos, licores, perfumes y jabones (Skoula y Harborne, 2002). El aceite esencial de orégano (AEO) es una mezcla compleja de compuestos, los constituyentes mayoritarios son los terpenos, generalmente mono y sesquiterpenos. Los principales terpenos identificados en las diferentes especies de orégano son carvacrol, timol, γ -terpineno y p-cimeno; mientras que el terpinen-4-ol, el linalol, el β -mirceno, el hidrato de trans-sabineno y el β -cariofileno están presentes en menor proporción (Figura 2).

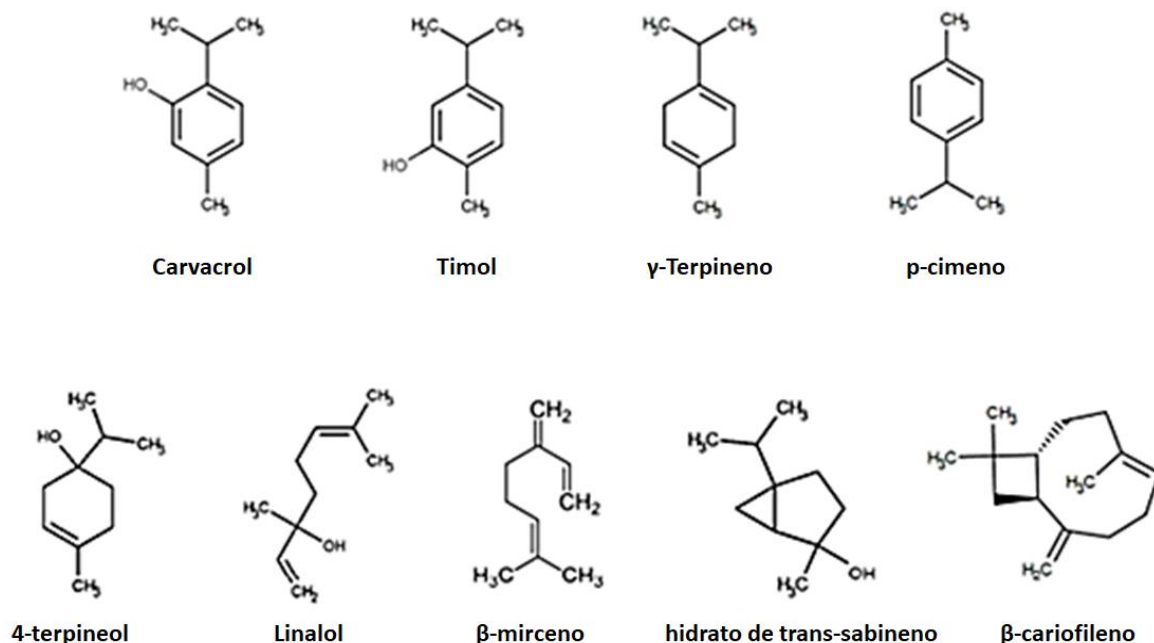


Figura 2, componentes más importantes del aceite esencial de orégano.

Como hierba medicinal se destacan sus propiedades antiespasmódicas, estimulantes, expectorantes, diuréticas, antisépticas y cicatrizantes (Varela y cols, 2007; Arias Toledo, 2009). Estudios farmacológicos demostraron la actividad colerética, espasmolítica y antihipertensiva (Baser, 2008).

Por otra parte, se ha reportado también la actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral y antioxidante del AEO. Algunos investigadores han encontrado actividad antimicrobiana en aceites esenciales de *O. vulgare* contra bacterias gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y gram-negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, (Baydar y cols, 2004). También se destaca el efecto inhibitor sobre distintas especies pertenecientes del

género *Cándida* (Cleff y cols, 2010; Sahin y cols, 2004), como sobre otros hongos pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* (Sahin y cols, 2004).

Entre las diferentes variedades de oregano (*O. vulgare*, *O. compactum*, *O. majorana*) se han encontrado elevados niveles de antioxidantes (>140 mmol/100 g), asociados a la presencia de grupos hidroxilos en los compuestos fenólicos. El potencial antioxidante del AEO ha sido determinado por su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, protegiendo al ADN del daño por radicales hidroxilos. En el caso del AE de *O. vulgare*, esta propiedad se le atribuye a los monofenoles carvacrol y timol.

Respecto a su acción antitumoral es menor la evidencia disponible. Estudios han revelado el papel protector del orégano sobre la peroxidación lipídica y el estado antioxidante en el cáncer de colon de rata inducido por 1,2- dimetilhidrazina (DMH). AEO a una dosis de 40 mg/kg fue capaz de ejercer un efecto más pronunciado, ya que mostró una reducción significativa en la extensión y severidad de la carcinogénesis en colon (Srihari y cols, 2008; Begnini y cols 2014) demostró en células humanas que los AE de *O. vulgare* inhiben la proliferación celular de adenocarcinoma de mama (MCF-7) y adenocarcinoma de colon (HT-29) a 50 mg/ml (60,8 % y 48,9%, respectivamente).

Sin embargo, a nivel oral no hay información suficiente del efecto del AEO en células de carcinoma, por lo que resulta relevante conocer su rango de acción.

HIPÓTESIS.

*El Aceite Esencial de Orégano disminuye el crecimiento de células de **Carcinoma oral de Células Escamosas y de Queratinocitos Orales Displásicos in vitro.***

OBJETIVOS

Objetivo general

*Analizar el efecto citotóxico del Aceite Esencial de Orégano en líneas celulares de **Carcinoma oral de Células Escamosas (CAL-27)** y líneas celulares de **Queratinocitos Orales Displásicos in vitro. (DOK)***

Objetivos específicos.

- *Identificar químicamente los componentes de Aceite Esencial de Orégano.*
- *Cuantificar el efecto citotóxico del Aceite Esencial de Orégano en líneas celulares de **Carcinoma oral de Células Escamosas***
- *Cuantificar el efecto citotóxico del Aceite Esencial de Orégano en líneas celulares de **y de Queratinocitos Orales Displásicos in vitro.***

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Estudio experimental *in vitro*.

Metodología:

1. Recolección de muestras:

El material vegetal fue adquirido como hojas y ramas de *Origanum vulgare* en la Vega Central, correspondiendo a productores de Lampa (Región Metropolitana), recolectadas en la época de verano del año 2020, entre los meses de febrero y marzo.

2. Obtención de aceites esenciales

Se extrajo aceite esencial de hojas y ramas de *Origanum vulgare*, utilizando el método de extracción por arrastre de vapor ilustrado en el Esquema 1. Se empleó un matraz esférico de dos bocas donde se dispusieron 500 g aproximados de muestra (máxima capacidad del matraz). Para la producción de vapor se utilizó un segundo matraz esférico con agua destilada, que fue llevada a ebullición mediante manta de calentamiento durante 3 horas. Utilizando un tubo refrigerante, el vapor fue condensado, recolectado y el resultado fue decantado para separar el aceite esencial del agua mediante un embudo Gibson y posteriormente almacenado a -20°C.

3. Caracterización química de los aceites esenciales

Se realizó análisis y caracterización de los aceites obtenidos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS/MS) en equipo Thermos® Scientific TRACE 1300 con columna capilar de

60mx0,25mmx0,25um acoplado a espectrómetro de masas Thermos® TSQ 8000 Evo con analizador de triple cuádruplo (Tabla 2) (Figura 3).

GC		MS	
Gas	Helio	T° de transferencia de línea	250°C
Modo	Splitless	T° de fuente de iones	200°C
Temperatura del inyector	250°C	Modo de ionización	IE
Tiempo de splitless	5 min	Tiempo de inicio	11 min
Split Flow	50mL/min	Polaridad del ion	Positiva
Flujo de columna	1,2 mL/min	Rango de masa	40-400 m/z
Modo de flujo	Constante	Tiempo de escaneo	0,2 s
Columna	Rtx-5MS 60 m x 0,25mm x 0,25 µm		

Tabla 2, parámetros utilizados en el análisis del aceite esencial de orégano

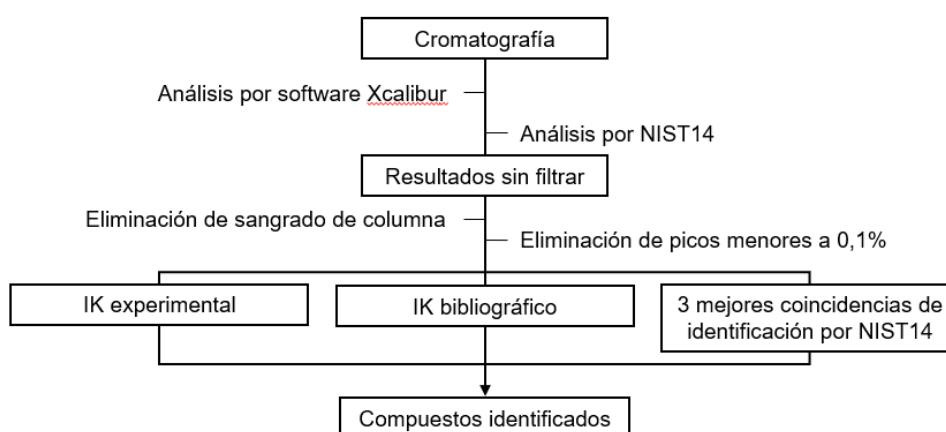


Figura 3, Procedimiento seguido para el análisis de los resultados obtenidos del aceite esencial de orégano.

4. Evaluación del efecto citotóxico en células de carcinoma espino celular y Queratinocitos Orales Displásicos

A. Cultivo celular: Los ensayos se realizaron utilizando células de carcinoma escamoso de lengua humano CAL-27 resistentes a cisplatino (ATCC® CRL-2095™), adquiridas en American Type Culture Collection (ATCC). También se trabajó con queratinocitos orales displásicos DOK (ECACC 94122104), adquiridos en European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC).

Las células de la línea celular CAL-27 se cultivaron en placas de 90mm, en medio DMEM alto en glucosa (2,5 g/L) (Biological Industries SKU11-055-1N), con piruvato (Gibco SKU11360-070), solución antibiótica penicilina-estreptomicina (Biological Industries SKU03-031-1B) y antimicótico anfotericina B (Biological Industries SKU 03-028-1B) suplementado con 10% suero fetal bovino (Biological Industries SKU04-127-1A), filtrado.

Las células de la línea celular DOK se cultivaron en placas de 100mm, en medio DMEM + 2mM Glutamina + 5µg/ml Hidrocortisona + 10% suero fetal bovino (FBS) y 100 U mL⁻¹ de penicilina y 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37°C.

Ambas líneas celulares, CAL-27 y DOK, se incubaron a 37°C, el medio fue cambiado cada 2-3 días hasta alcanzar la confluencia de las células. Las células fueron soltadas de las placas con Tripsina-EDTA 0.05% (Biological Industries SKU03-050-1^a) por 5 min, contadas en cámara de Neubauer por exclusión de azul de tripán, y sembradas en placas de 96 pocillos (3x10⁵ células/mL) con 100 µL de medio DMEM alto en glucosa.

B. Tratamiento: 24 horas después de la siembra, las células fueron tratadas con volúmenes crecientes de AEO diluido en DMSO (Sigma-Aldrich SKU D4540-1L). Se utilizaron distintas diluciones de AEO 1:10000, 1:4000, 1:2000, 1:1000, 1:800, 1:400, 1:200, 1:100 incubadas por 48 h. Dichas diluciones fueron determinadas por

experimentaciones previas para encontrar el rango de dosificación que son efectivas para nuestras condiciones experimentales.

C. Evaluación de citotoxicidad mediante ensayo MTT: Posterior al tiempo de incubación, se removió el medio de las placas y se agregó 100 µL de MTT (Molecular Probes™ M6494) 0,5 mg/mL y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Después, se removió el MTT y se agregaron 40 µL/pocillo de solución de disolución (DMSO), se mantuvieron las placas en agitación por 15 min a 1500rpm y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Tecan Infinite® F50.

Esta técnica proporciona una estimación cuantitativa del número de células vivas en un cultivo, basándose en la capacidad que poseen las células viables de reducir el compuesto MTT amarillo (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) en formazán violeta. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Dentro de cada placa de 96 pocillos se realizó una columna de pocillos de control negativo, adicionando a estas células 1 µL DMSO por pocillo y sometidos al mismo ensayo de MTT descrito. El efecto citotóxico fue expresado como el porcentaje de viabilidad de las células tratadas en comparación con las células tratadas con el vehículo (control) según la siguiente formula:

Viabilidad celular (%) = Absorbancia de células tratadas / absorbancia de células control x100

Se realizaron 4 experimentos independientes y en triplicado

D. Análisis de datos: El análisis estadístico fue realizado en el software Graphpad Prism 8 mediante regresión no lineal ajustada a ensayo de dosis respuesta (pendiente variable con 4 parámetros) y de aquí se obtuvo el valor de IC50 (concentración del fármaco necesaria para lograr un 50% de la viabilidad celular).

RESULTADOS

Caracterización del aceite esencial de *Origanum vulgare*:

La composición del aceite esencial obtenido de hojas y ramas frescas de *Origanum vulgare* se presenta en (Figura 4). Los componentes principales fueron: hidrato de cis-sabineno (16,72%), timol (14,20%), 4-terpineol (13,57%), γ -terpineno (11,66%), α -terpinoleno (5,02%), acetato de linalilo (3,99%), cariofileno (3,56%), metil carvacrol (3,17%), α -terpineol (3,13%), 4-tujanol (3,01%), sabineno (2,84%), carvacrol (2,64%), p-cimeno (2,20%) (Tabla 3).

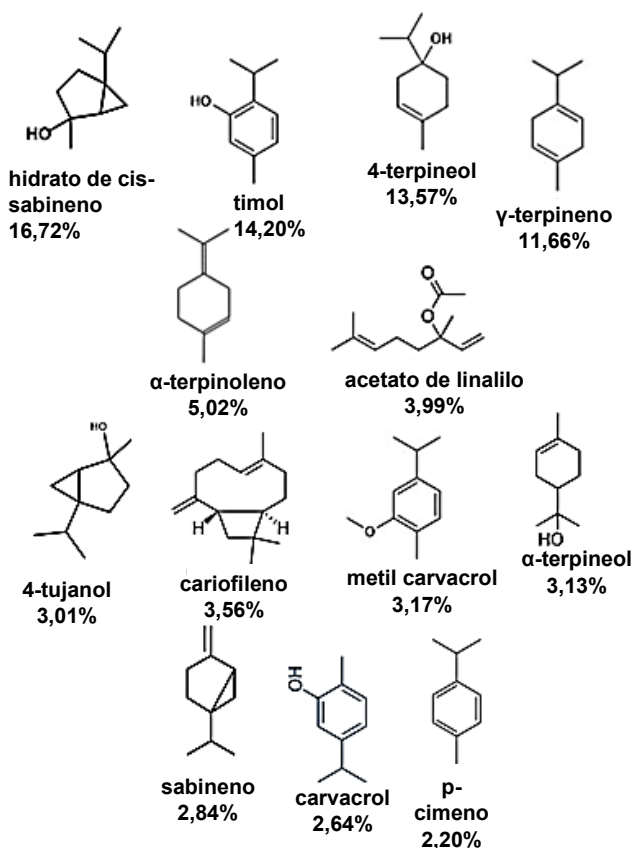


Figura 4, Principales monoterpenos del aceite esencial de hojas y ramas de *Origanum vulgare* (Leyva-López y cols, 2017).

	Compound	RI^a	% area	Identification
1	α -tujeno	944.2	0.65	MS, RI ^b
2	α -pineno	953.9	0.16	MS, RI ^b
3	Sabineno	991.2	2.84	MS, RI ^b
4	β -mirceno	1005.9	1.07	MS, RI ^b , Co-I
5	α -felandreno	1024.6	0.48	MS, RI ^b
6	α -terpinoleno	1037.5	5.02	MS, RI ^c
7	p-cimeno	1045.8	2.20	MS, RI ^b
8	ciclohexano, 1-metilen-4-(1-metiletenil)-	1051.9	1.74	MS, RI ^b
9	3-careno	1055.8	0.41	MS, RI ^b
10	n.id.	1067.2	0.22	MS, RI ^b
11	γ -terpineno	1080.3	11.66	MS, RI ^b
12	4-tujanol	1089.2	3.01	MS, RI ^b ,
13	α -terpinoleno	1110.4	1.87	MS, RI ^b , Co-I
14	Linalol	1119.6	0.55	MS, RI ^b
15	<i>hidrato de cis-sabineno</i>	1124.0	16.72	MS, RI ^b
16	<i>cis</i> - β -terpineol	1128.7	0.02	MS, RI ^b , Co-I
17	<i>cis</i> -2-mentenol	1147.6	1.21	MS, RI ^b
18	<i>trans</i> -alo-ocimeno	1150.5	0.23	MS, RI ^b
19	<i>trans</i> -2-mentenol	1165.7	0.78	MS, RI ^b
20	Pinocarvona	1192.0	0.02	MS, RI ^b
21	<i>endo</i> -borneol	1194.8	0.28	MS, RI ^b
22	4-terpineol	1205.5	13.57	MS, RI ^b , Co-I
23	α -terpineol	1218.3	3.13	MS, RI ^b , Co-I
24	<i>trans</i> -piperitol	1224.1	0.30	MS, RI ^b
25	<i>cis</i> -piperitol	1236.0	0.38	MS, RI ^b
26	benceno, 2-metoxi-4-metil-1-(1-metiletil)-	1259.9	0.81	MS, RI ^b
27	metyl carvacrol	1269.9	3.17	MS, RI ^b
28	linalyl acetato	1277.1	3.99	MS, RI ^b
29	Timol	1314.5	14.20	MS, RI ^b
30	Carvacrol	1324.0	2.64	MS, RI ^b

31	n.id.	1341.4	0.08	MS, RI ^b
32	n.id.	1357.1	0.03	MS, RI ^b
33	n.id.	1362.6	0.06	MS, RI ^b
34	n.id.	1372.6	0.64	MS, RI ^b
35	acetato de nerilo	1387.5	0.08	MS, RI ^b
36	acetato de geranilo	1406.2	0.16	MS, RI ^b
37	cariofileno	1465.2	3.56	MS, RI ^b
38	n. id.	1484.6	0.06	MS, RI ^b
39	α-humuleno	1499.2	0.32	MS, RI ^b
40	biciclogermacreno	1544.6	1.24	MS, RI ^b
41	n. id.	1565.9	0.04	MS, RI ^b
42	espatulanol	1631.7	0.27	MS, RI ^b
43	óxido de cariofileno	1640.5	0.12	MS, RI ^b

n.id: sin identificar. IR= índice de retención, MS= Espectro de masa, Co-I= Co-inyección de estándar.

Tabla 3. composición del aceite esencial de hojas y ramas de *Origanum Vulgare*

Citotoxicidad celular en líneas celulares CAL-27 del aceite de *Origanum vulgare*

La citotoxicidad del aceite esencial de *Origanum vulgare* en líneas celulares de cáncer espino celular oral CAL-27, que fue determinada mediante ensayo MTT, es mostrada en el gráfico 1. El experimento se realizó en cuatro pasajes distintos de líneas CAL-27, en triplicado cada vez. La curva de dosis-respuesta muestra un leve aumento en la viabilidad en la primera dilución (1:10000) de AEO a las 48 horas comparado con la muestra control. Con las siguientes diluciones se ve una disminución pronunciada de la viabilidad alcanzando un 0% entre las diluciones 1:400 y 1:100 manteniendo ese porcentaje constante a diluciones mayores (Gráfico 1)

El IC50 para estas curvas fue de 1,001 µg/mL a las 48 h.

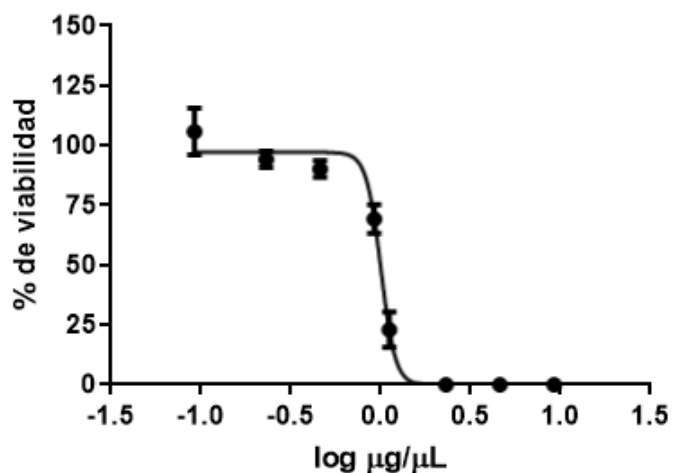


Gráfico 1. Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre células CAL-27

Citotoxicidad celular en líneas celulares DOK del aceite de *Origanum vulgare*

La citotoxicidad del aceite esencial de *Origanum vulgare* en *queratinocitos orales displásicos* DOK, que fue determinada mediante ensayo MTT, durante 48 h, es mostrada en el gráfico 2. El experimento se realizó en cuatro pasajes distintos de líneas DOK, en triplicado cada vez. La curva de dosis-respuesta muestra una leve disminución en la viabilidad de las 3 primeras diluciones de AEO (1:10000, 1:4000, 1:200). Con las siguientes diluciones se ve una disminución más pronunciada, alcanzando un 0% de viabilidad entre las diluciones 1:400 y 1:100 manteniendo este porcentaje constante a diluciones mayores (Gráfico 2).

El IC50 para estas curvas fue de 1,237 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 48 hrs.

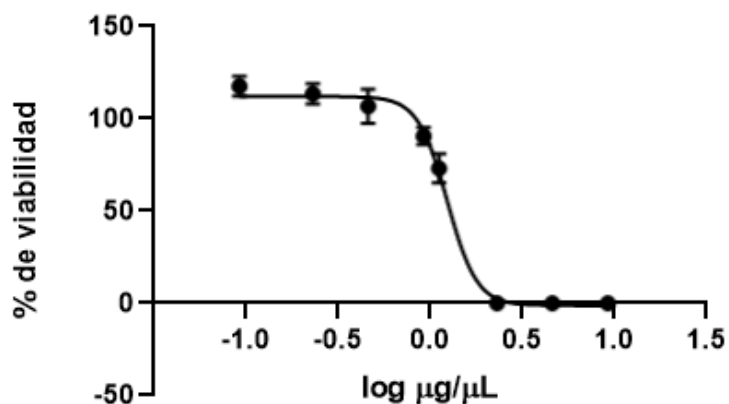


Gráfico 2. Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre células DOK

DISCUSIÓN

De acuerdo con datos recolectados de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) en los últimos 13 años la producción chilena de orégano ha ido disminuyendo su superficie de cultivo, sin embargo, para el 2021 presentó un leve aumento de 269 ha cultivadas, siendo la región Metropolitana donde más se cultiva (www.odepa.gov.cl).

El género *Origanum* posee una alta diversidad inter e intra-específica lo cual implica un alto polimorfismo fitoquímico y morfológico, con varios quimiotipos con marcada segregación en ambientes naturales lo cual hace difícil establecer su taxonomía (Radušiene y cols, 2005; Lukas y cols, 2013; Ince y cols, 2014). Así, las diferencias en cantidad y calidad del AEO comparado con otras investigaciones puede variar dependiendo de características geográficas, temperatura, altitud, nivel de precipitaciones, etapa vegetativa, tiempo de cosecha o técnica de secado de la planta. (Faleiro y cols, 2003). Sin embargo, la cantidad de AEO producido ante situaciones por ejemplo de estrés hídrico, tiene resultados contrapuestos, ya que se puede mantener o incrementar, dependiendo de la especie o la magnitud del estrés. En general, bajo estrés hídrico moderado, las plantas acumulan carbono que está dirigido a la síntesis de compuestos de defensa como son los monoterpenos. A pesar de la influencia que tienen los citados factores ambientales en la composición química del AEO, su control primario en relación al quimiotipo que expresan, está mayoritariamente bajo control genético (Figueiredo y cols, 2008, Kumar y cols, 2007). Esto quiere decir que, aunque las condiciones ambientales perfilan ciertos patrones químicos, éstos son característicos de cada planta o grupo de plantas (Usano-Aleman y cols, 2014). Sería interesante estudiar de qué manera la variación de factores ambientales actúan sobre los componentes de *Origanum vulgare*, y si aquello modifica su actividad citotóxica.

El vehículo utilizado para este estudio fue DMSO, fue aplicado como control a la misma dilución que la utilizada en las células tratadas con AEO, para que cualquier efecto citotóxico producido por el vehículo no interfiriese con la evaluación de la acción de cada aceite esencial. La aplicación de DMSO puede provocar

citotoxicidad en diferentes grados en distintas líneas celulares, por lo que se recomienda usar a bajas concentraciones (Nguyen cols., 2020).

Respecto a la caracterización del AEO, extraído de *Origanum vulgare* se lograron identificar 36 compuestos que corresponden 98.86% del aceite. De la composición total, 85,12% corresponden a monoterpenos y 13,74% corresponden a sesquiterpenos (véase Tabla 4). El hidrato de cis-sabineno fue el compuesto más abundante del AEO utilizado, con un 16,72%, en segundo lugar, el timol con un 14,20%, luego el 4-terpineol con un 13,57% y el γ -terpineno con un 11,66%.

	AE de <i>O. Vulgare</i>
Monoterpenos hidrocarburos	30,2%
Monoterpenos oxigenados	54,92%
Monoterpenos totales	85,12%
Sesquiterpenos hidrocarburos	8,24%
Sesquiterpenos oxigenados	5,5%
Sesquiterpenos totales	13,74%
Total de compuestos identificados	98,86%

Tabla 4, Resumen de tipo de compuestos agrupados por familia del aceite esencial de *Origanum Vulgare*

El porcentaje de estos componentes es algo distinto al visto en el análisis de otros AEO, en donde los principales elementos son el carvacrol y el timol, en nuestro estudio el carvacrol solo representa un 2,64% del total de compuestos. (D'Antuono, L. y cols 2000; Russo, M y cols 1998; Leyva-López y cols, 2017).

Govindarajan y cols, (2016) en un estudio en India encontraron en su caracterización del AEO que mayoritariamente aparecía el carvacrol con un 38,3 % y el L-4-terpineol con un 28,70 %. Leyva-López y cols en el 2017 clasificaron los componentes del AEO de distintos países (tabla 2), entre ellos Chile donde aparecía principalmente el cis- β -Terpineol con un 16.49%, el timol con un 13.26% y el

terpinen-4-ol con un 10.24%. (Elizalde y Espinoza, 2011). Tellez y Nolazco (2017) en Tacna, Perú, analizaron los componentes de *Origanum vulgare spp*, con un 26,56 % el L-4-terpineol o terpinen-4-ol, el timol con 18,80 % y carvacrol en 2,24 %, siendo este último porcentaje muy similar al encontrado en esta tesis, sin embargo, Quintana J. y cols (2022) también en un estudio efectuado en Perú identificó como componentes del AEO al Iso terpineol con un 27,9% a 31,3%, el timol con un 12,3% a 12,5% y el γ -terpineno con un 6,6% a 7,6%. Existe una tendencia que, tanto en esta tesis, como en los estudios realizados en Perú, el timol ocupa el segundo lugar en importancia de los compuestos encontrados, no así el carvacrol que es muy variable en su porcentaje. Por lo tanto, vemos que los componentes del AEO presentan gran variabilidad dependiendo del país, región o incluso entre variedades de orégano de procedencias similares, donde se mezclan distintos factores geoclimáticos, (altitud, tipo de suelo, temperatura, precipitaciones, humedad) herencia genética, edad de las plantas, momento de cosecha y técnica de secado (Tabla 5).

Argentina	Carvacrol (26.70%), <i>p</i> -cymene (15.20%), γ -terpinene (15.10%), terpinene (7.50%).
Argentina	γ -Terpinene (25.1%), terpinen-4-ol (16.7%), carvacrol (16.2%), α -terpinene (8.54%).
Argentina	γ -Terpinene (32.1%), α -terpinene (15.1%), <i>p</i> -cymene (8.0%), thymol (8.0%).
Argentina	Carvacrol (81.92%), γ -terpinene (4.49%), thymol (3.5%), <i>p</i> -cymene (3.07%).
Brazil	Carvacrol (73.9%), γ -terpinene (3.6%), thymol (3.0%), β -caryophyllene (2.8%).
Chile	cis- β -Terpineol (16.49%), thymol (13.26%), terpinen-4-ol (10.24%), α -terpineol (4.35%).
China	Carvacrol (30.73%), thymol (18.81%), <i>p</i> -cymene (10.88%), β -caryophyllene (8.21%).
China	β -Citronellol (85.3%), citronellol acetate (5.2%), β -citronellal (1.2%).
China	Thymol (42.9%), citronellol (12.2%), β -caryophyllene (7.8%), <i>p</i> -cymen-2-ol (7.5%).

Tabla 5, composición de *oregano vulgare* en distintos países. (Leyva-López y cols, 2017).

El aceite esencial de *O. vulgare* tiene actividad anti-radicales libres y esta propiedad se les atribuye a los fenoles carvacrol y timol (Deighton y cols, 1993). Sin embargo, esto no garantiza su capacidad para neutralizar estrés y prevenir el daño oxidativo, ya que las diferencias en la composición del AEO pueden modificar la actividad biológica (Leyva-López y cols 2017).

De acuerdo con lo observado en nuestra experimentación (véase sección resultados) y expresado en las curvas de dosis-respuesta, el AEO utilizado no provoca cambios en la sobrevivencia de las líneas CAL-27 a concentraciones subtóxicas. Luego de ello, produce un rápido descenso en la viabilidad y, por tanto, un efecto citotóxico dosis-dependiente, hasta inhibir completamente el desarrollo de esta línea celular. En la literatura no hay trabajos respecto del efecto del AEO en células de cáncer oral, si se ha visto el efecto antiproliferativo de este aceite en otros tipo de líneas celulares como en el trabajo de Balusamy y cols, (2017) donde se analizó el efecto del AEO en líneas celulares de cáncer de estómago humano (AGS) (a través de un ensayo MTT), las cuales después de ser tratadas con diferentes concentraciones de AEO por un periodo de incubación de 48 h, se estimó que su IC50 fue de 13,4 $\mu\text{g/mL}$, además se determinó que la mayor actividad antiproliferativa del AEO fue al usar 100 $\mu\text{g/mL}$, donde casi el 100% de las células fueron dañadas. En nuestro estudio con CAL-27 el IC50 fue de 1,001 $\mu\text{g/ml}$, una cantidad muy inferior en relación con el trabajo de Balusamy y cols, (2018). En diferentes líneas celulares de cáncer, como en cáncer de colon (HT-29), melanoma (A375) y hepatocarcinoma (HepG2), se ha encontrado una reducción en la viabilidad celular de una manera dosis dependiente al usar AEO (Rojo-Ruvalcaba y cols., 2020) Sin embargo, estas líneas celulares exhiben diferente sensibilidad a este aceite, evidente por los distintos valores de IC50, el efecto antiproliferativo más fuerte se observó en HT-29 ($0,35 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$) seguida de A375 ($8,90 \pm 0,7 \mu\text{g/ml}$), y HepG2 ($23,0 \pm 4,2 \mu\text{g/ml}$) (Spyridopoulou K, 2019). Elshafie y cols (2017) mostraron que el extracto de AEO redujo la viabilidad de HepG2 de manera dosis dependiente (estudiado en un rango de 25–800 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), con un IC50 de 236 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Al usar los componentes aislados específicamente timol y carvacrol, tienen resultados prometedores contra HepG2 con IC50 de 289 y 48 $\text{mg}/\mu\text{L}$ respectivamente. Sobre cáncer de mama, Makrane y cols. informó el 2018 que las

células de la línea celular mamaria MDA-MB-231 BC eran más susceptibles al efecto citotóxico de AEO en comparación HT-29, ya que se observó que la viabilidad celular disminuyó drásticamente en las células BC a medida que aumentaba la dosis de AEO, encontrándose IC50 a una dosis de 87,09 µg/mL. (Rojo-Ruvalcaba, y cols, 2020)

De acuerdo con lo observado en nuestra experimentación (véase sección resultados) y expresado en las curvas de dosis-respuesta, el AEO utilizado no provoca cambios en la sobrevivencia de las líneas DOK con las primeras diluciones. Luego de ello, se produce un rápido descenso en la viabilidad y, por tanto, un efecto citotóxico dosis-dependiente, hasta inhibir completamente la viabilidad celular de esta línea celular, encontrándose un IC50 de 1,237 µg/ml, que es mayor al observado en las células tumorales Cal-27.

En la bibliografía no hay estudios MTT usando AEO en DOK, pero un trabajo similar realizado por Rojo-Ruvalcaba, y cols en el año 2020, que utilizó queratinocitos humanos transformados e inmortalizados (HaCaT), expuestos a dos dosis ascendentes de *O. vulgare* (20 µL y 40 µL) encontró que los índices de proliferación disminuyeron al 18,62% ± 1,43 con la primera dosis y al 12,75% ± 1,41 con la segunda dosis. También en esta línea celular se realizó una curva dosis respuesta en que se aplicaron cuatro dosis ascendentes de Carvacrol al 2% (20 µL, 40 µL, 60 µL y 80 µL) para estandarizar el IC50. Los resultados mostraron que los índices de proliferación disminuyeron de manera dosis dependiente, con reducciones en los valores del índice de proliferación a partir de la segunda dosis, que tenía una concentración de 0,028 M (33,06% ± 5,35), y se potenció aún más en la tercera (10,28% ± 1,29) y cuarta dosis (9,95% ± 2,06) con concentraciones de 0.042 M y 0.056 M, respectivamente (Rojo-Ruvalcaba, y cols, 2020).

En nuestro estudio la efectividad del AEO sobre las líneas celulares CAL-27 y DOK puede deberse por la presencia de hidrato de cis-sabineno o por la presencia de timol que ha demostrado (este último), en estudios anteriores, actividad citotóxica en numerosas líneas tumorales. Sin embargo, la variación entre los distintos genotipos de orégano es tan amplia, que requiere mayor investigación sobre la

actividad de cada uno de sus componentes y qué factores determinan su mayor o menor expresión.

El mecanismo por el cual el AEO logra su efecto citotóxico, es por inhibición del crecimiento celular, contracción celular, condensación nuclear, formación de vesículas en la membrana, y fragmentación en cuerpos apoptóticos. Los mecanismos que conducen a la apoptosis son por modificación de diversas vías de señalización, daños en el material genético y cambios en los niveles de proteínas intracelulares; específicamente la relación de expresión de Bax/Bcl2 que es uno de los principales indicadores de apoptosis. Se ha descrito en la literatura que el tratamiento con 10 µg/ml de AEO gradualmente disminuyó la expresión de BCL2 (proteína anti-apoptótica) y alcanzó su máxima disminución con 50 µg/mL de AEO. Por otro lado, la expresión de BAX (proteína pro-apoptótica) aumentó gradualmente y alcanzó la expresión más alta cuando se trató 50 µg/mL de AEO. (Balusamy y Perumalsamy, 2018; Páez-Hernández y cols, 2019). También el AEO actúa sobre la lipogénesis y la biosíntesis de colesterol, tras el tratamiento con este aceite las células AGS mostraron una disminución del patrón de expresión de HMGCR (biosíntesis de colesterol), ACC, FASN (lipogénesis) y SREPB1 (regulador de colesterol y metabolismo de los ácidos grasos) inhibiendo su crecimiento (Balusamy y Perumalsamy, 2018).

Acerca de la seguridad de usar AEO es importante destacar el grado de toxicidad del orégano, en estudios toxicológicos agudos, con extracto acuoso liofilizado de orégano francés, demuestran que este no es tóxico por vía oral (Menéndez Castillo y Pavón González, 1999). Ensayos en ratas durante 90 días de administración de carvacrol/timol (10:1) a dosis de 5, 100 y 200 mg/kg pc/día, ningún animal murió ni mostró desviaciones del grupo control. Los parámetros monitoreados fueron estado de salud general, peso, consumo de alimento, hemograma y hallazgos histopatológicos. Solo se redujeron los niveles de glucosa y las hembras tenían ovarios agrandados en el grupo tratado.

En este sentido, el AEO está categorizado como generalmente reconocido como seguro (GRAS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos (Sokolik y Lellouche, 2018) y está clasificado como aditivo alimentario por la Unión Europea

(Muriel-Galet y cols, 2015). Por tanto, si se utiliza el orégano a la dosis recomendada presenta muy poca toxicidad. Los estudios de genotoxicidad del AEO y sus componentes son muy escasos (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, 2008). Los resultados obtenidos en laboratorio han indicado ausencia de efectos genotóxicos de este AEO en ratas expuestas hasta 200 mg/kg de peso corporal (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2016). Sin embargo, aun hace falta continuar con la experimentación ya que la respuesta en animales y humanos no es idéntica y la variación en la composición del AEO podría modificar su efecto

Otro aspecto a considerar es la forma farmacéutica de los extractos de plantas medicinales. El uso de capsulas via oral puede proteger físicamente los componentes del proceso de digestión, favoreciendo el mantenimiento de su actividad antioxidante, aunque no existe en la literatura una guía que relacione vías de administración con dosis terapéuticas.

También es necesario continuar con más estudios de los componentes del AEO, en este estudio se vio que el porcentaje de carvacrol fue muy bajo, en contraste con el timol que fue uno de los componentes mayoritarios. Por lo tanto, puede que otros componentes tengan igual o mayor efecto antineoplásico que los que se señala en la literatura (carvacrol y timol). En nuestro estudio se vio que el componente que está en mayor porcentaje fue el hidrato de cis-sabineno y no hay en la literatura evidencia de su efecto directo antineoplásico.

Se nos hace relevante recalcar la importancia de continuar con investigaciones en líneas celulares provenientes de lengua, ya que los carcinomas espinocelulares en esta localización son los que presentan mayor incidencia y mortalidad en Chile (De La Fuente y cols, 2016). Lo mismo ocurre con DOK donde no hay en la literatura mucha información del efecto de aceites esenciales y de los mecanismos que están involucrados en evitar la proliferación de estos queratinocitos displásicos.

CONCLUSIÓN

El AEO extraído para este estudio tiene como principal componente monoterpenos y entre ellos el más abundante fue hidrato de cis-sabineno (16,72%), le siguen timol (14,20%), 4-terpineol (13,57%), γ -terpineno (11,66%), α -terpinoleno (5,02%), entre lo más relevantes. Este tipo de composición es distinta a la descrita en otros estudios, donde mayoritariamente se ve que los mayores porcentajes corresponden a carvacrol y timol. En la literatura hay pocos estudios donde aparezca el hidrato de cis-sabineno como componente mayoritario del AEO.

El AEO logró efectos citotóxicos en las líneas celulares CAL-27 y DOK a las 48 horas, mostrando un IC50 muy similar entre ambos cultivos (1,001 $\mu\text{g/mL}$ y 1,237 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente). Por lo que no se observó un grado de selectividad importante. Sin embargo, como ha sido descrito previamente, la seguridad del AEO ha sido ampliamente demostrada. La efectividad de este aceite fue total ya que llegó a tener 0% viabilidad.

El efecto del AEO se ha estudiado en distintos tipos de cáncer in vitro (hepático, de mama, próstata, colon, estomago), tanto de líneas humanas y animales donde mayoritariamente tiene efecto dosis dependiente. Por lo visto en este trabajo su efecto in vitro en carcinoma oral de células escamosas y de queratinocitos orales displásicos, es bien prometedor, sin embargo, queda más por investigar y ver de qué manera puede utilizarse en el tratamiento de neoplasias como terapia única o como coadyuvante con tratamientos ya existentes, por lo que se debe continuar investigando sus efectos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguirre Echebarría P. y Aguirre Urizar JM (2008). Displasia epitelial: Concepto y significación. *Avances en Odontoestomatología*, 24(1), 81-88.

Arias Toledo B (2009). Diversity of uses, recollection practices and gender and age differentials in the use of medicinal plants in Cordoba, Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8 (5), 389-401

Aziz AA, Ahmad A, Setapar SH, Karakucuk A, Azim MM y cols. (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical and Therapeutic Potential - A Review. *Current Drug Metabolism* 19(13):1100–1110.

Balusamy SR, Perumalsamy H, Huq MA, Balasubramanian B (2018). Anti-proliferative activity of *Origanum vulgare* inhibited lipogenesis and induced mitochondrial mediated apoptosis in human stomach cancer cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 108, Pages 1835-1844.

Baser KH (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current pharmaceutical design*, 14(29), 3106–3119.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem Toxicol.*;46(2):446–75.

Baydar H, Sağdıç O, Özkan G, Karadoğan T (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, Volume 15, Issue 3, ,Pages 169-172

Bayala B, Bassole IH, Scifo R, Gnoula C, Morel L y cols (2014). Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *American journal of cancer research*, 4(6), 591–607.

Begnini KR, Nedel F, Lund RG, Carvalho PHD, Rodrigues MRA, Beira FTA y cols (2014). Composition and antiproliferative effect of essential oil of *Origanum vulgare* against tumor cell lines. *J. Med. Food* 17, 1129–1133.

Blot WJ, Mclaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS y cols (1988). Smoking and Drinking in Relation to Oral and Pharyngeal Cancer. In *Cancer Research* (Vol. 48).

Brouha, Tromp D, Hordijk G, Winnubst J, Leeuw R (2005). Role of alcohol and smoking in diagnostic delay of head and neck cancer patients. *Acta Oto-Laryngologica*, 125:5, 552-556.

Cha JD, Kim YH, Kim JY (2010). Essential oil and 1,8-cineole from *Artemisia lavandulaefolia* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation. *Food Sci Biotechnol* 19 (1): 185-191.

Chinsembu KC (2016). Plants and other natural products used in the management of oral infections and improvement of oral health. *Acta Tropica.*;154:6-18.

Cleff MB, Meinerz AR, Xavier M, Schuch LF, Meireles MCA, y cols. (2010). In vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(1), 116–123.

Cossu A, Wang MS, Chaudhari A, Nitin N (2015). Antifungal activity against *Candida albicans* of starch Pickering emulsion with timol or amphoteric in B in suspension and calcium alginate films. *Int J Pharm.*;493(1-2):233-42.

D'Antuono LF, Galletti GC, Bocchini P. (2000). Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean Area (Liguria Region, Northern Italy). *Annals of Botany*, 86(3), 471-478

Dagli N, Dagli R, Mahmoud RS, Baroudi K (2015). Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *J Int Soc Prev Community Dent.*;5(5):335-40.

De Groot AC y Schmidt E (2016). Essential Oils, Part III: Chemical Composition. *Dermatitis.*;27(4):161-9.

De La Fuente M, Díaz M y Martínez B (2016). Carcinoma Espinocelular de Lengua: Estudio de Sobrevida a 5 Años. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral* 9(1):74–78.

Deighton N, Glidewell SM, Deans SG y Goodman BA (1993). Identification by epr spectroscopy of carvacrol and timol as the major sources of free radicals in the oxidation of plant essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63 (2), 221-225.

Deng H, Sambrook P, Logan R. (2011). The treatment of oral cancer: an overview for dental professionals. *Australian Dental Journal*, 56: 244-252.

Dias DA, Urban S, Roessner U (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*.;2(2):303-36.

Edris AE (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy research: PTR*, 21(4), 308–323.

Elizalde JJ y Espinoza M (2011). Effect of ionizing irradiation on *Origanum* leaves (*Origanum vulgare* L.) essential oil composition. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14(2), 164-171.

Elmore S (2007). Apoptosis: una revisión de la muerte celular programada. *Toxicol Pathol*: 35, 495-516

Elshafie HS, Armentano MF, Carmosino M, Bufo SA, De Feo V y cols (2017). Cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and evaluation of its biological activity. *Molecules*, 22(9), 1435.

Epstein JB, Thariat J, Bensadoun RJ, Barasch, A, Murphy BA, y cols (2012). Oral complications of cancer and cancer therapy. *CA. A Cancer Journal for Clinicians*, 62: 400-422.

Faleiro L, Miguel G, Ladeiro F, Venancio F, Tavares R y cols (2003). Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*, Letón. *Appl. Microbiol.*, 36: 35-40

Figueiredo A, Barroso J, Pedro L, Scheffer J (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: Volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 23. 213 – 226

García-García V, y Bascones Martínez A (2009). Cáncer oral: Puesta al día. Avances en Odontoestomatología, 25(5), 239-248.

Gautam N, Mantha AK, Mittal S (2014). Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. BioMed research international, 154106.

Govindarajan M, Rajeswarya M, Hotib SL, Benellic G (2016). Larvicidal Potential of Carvacrol and Terpinen-4-Ol from the Essential Oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) Against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). Research in Veterinary Science, (104), 77-82.

Gursoy UK, Gursoy M, Gursoy OV, Cakmakci L, Könönen E, Uitto VJ (2009). Antibiofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. Anaerobe.;15(4):164-7.

Hahn WC, Weinberg RA (2002). Rules for making human tumor cells. N England J Med. Vol 347 (20): 1593-1603.

Harrison LB, Sessions RB, Hong WK (2009). Head and Neck Cancer: A Multidisciplinary Approach. 3rd ed. Lippincott, William & Wilkins.

Hickl J, Argyropoulou A, Sakavitsi ME, Halabalaki M, Al-Ahmad y cols (2018). Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. Plos one, 13(12).

<https://www.cancer.org/es/tratamiento/como-comprender-su-diagnostico/estadificaciondelcancer.html>

Ince AG, Karaca M y Elmasulu SY (2014). New microsatellite and CAPS-microsatellite markers for clarifying taxonomic and phylogenetic relationships within *Origanum* L. Mol Breeding 34, 643–654.

Kumar M, Nanavati R, Modi TG, Dobariya Ch (2016). Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. Journal of Cancer Research and Therapeutics, 12(2), 458-63.

Leyva-López N, Gutiérrez-Grijalva EP, Vazquez-Olivo G, Heredia, JB (2017). Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(6), 989.

Logan RM (2009). Advances in understanding of toxicities of treatment for head and neck cancer. *Oral Oncol*; 45: 844– 848.

Lukas B, Schmiderer C, Novak J (2015). Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Phytochemistry*; 119: 32-40

Llana-Ruiz-Cabello M, Maisanaba S, Puerto M, Pichardo S, José A, y cols (2017). A subchronic 90-day oral toxicity study of *Origanum vulgare* essential oil in rats. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 101, 36–47.

Makrane H, El Messaoudi M, Melhaoui A, El Mzibri M, Benbacer L y cols (2018). Cytotoxicity of the Aqueous Extract and Organic Fractions from *Origanum majorana* on Human Breast Cell Line MDA-MB-231 and Human Colon Cell Line HT-29. *Adv. Pharm. Sci.* 3297193.

Martínez C, Hernández M, Martínez B, Adorno D (2016). Frecuencia de displasia epitelial y carcinoma escamoso en mucosa oral y orofaríngea en Chile, entre los años 1990 y 2009. *Revista médica de Chile*, 144(2), 169-174.

Mateo-Sidrón Antón MC, y Somacarrera Pérez ML (2015). Cáncer oral: genética, prevención, diagnóstico y tratamiento. revisión de la literatura. *Avances en Odontostomatología*, 31(4), 247-259.

Menéndez Castillo RA y Pavón González V (1999). *Plecthranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 4(3), 110-115.

Moreira-Muñoz A, Morales V, Muñoz, M. (2017). Biogeografía de La Flora Endémica de Chile. *Revista Del Jardín Botánico Chagual* 15:30–42.

Muriel-Galet V, Cran MJ, Bigger SW, Hernández-Muñoz P, Gavara R (2015). Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. *Journal of Food Engineering*, Volume 149, Pages 9-16,

Muthukrishnan A y Warnakulasuriya S (2018). Oral health consequences of smokeless tobacco use. *The Indian journal of medical research*, 148(1), 35–40

Neville BW y Day TA (2002). *Oral Cancer and Precancerous Lesions*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 52: 195-215.

Nguyen S, Nguyen H y Truong K (2020). Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines. *Biomedical Research and Therapy*, 7 (7), 3855-3859.

<https://www.odepa.gob.cl/publicaciones/boletines/boletin-de-hortalizas-abril-2023>.

Páez-Hernández G, Espinosa-Andrews H, Castillo-Herrera GA, Herrera-Rodríguez SE. (2019). Uso de aceites esenciales como agentes quimiopreventivos contra el cáncer colorrectal. *Sal Jal.*;6(3):199-206

Pavoni L, Perinelli DR, Bonacucina G, Cespi M, Palmieri GF (2020). An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. *Nanomaterials.*;10(1).

Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, La Vecchia C (2007). Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver. *Alcohol Research & Health*; 29(3):193-8.

Quintana-Quispe JO, Llalla-Córdova O, Vilcanqui-Chura YL, Ramos-Rivera SR (2022). Caracterización y determinación de la actividad antioxidante de aceite esencial de orégano (*origanum vulgare* L.) de valles interandino de moquegua. *Revista El Ceprosimad*, 10(2), 06-15.

Radusiene, J, Judzentiene A, Peèiulytė D, Janulis, V (2005). Chemical composition of essential oil and antimicrobial activity of *Origanum vulgare*. *Biologija*. Nr. 4. P. 53–58.

Ramírez V, Vásquez-Rozas P, Ramírez P (2015). Mortalidad por Cáncer oral y faríngeo en Chile, años 2002-2010. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil Oral*; 8 (2): 133-8.

Riera S, Paula, y Martínez R, Benjamín. (2005). Morbilidad y mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile. *Revista médica de Chile*, 133(5), 555-563.

Rajo-Ruvalcaba BE, García-Cobián TA, Pascoe-González S, Campos-Bayardo TI, Guzmán-García LM y cols (2020). Dose-Dependent Cytotoxicity of the *Origanum vulgare* and Carvacrol on Triple Negative Breast Cancer Cell Line Procedimientos. 2020; 61(1):6.

Ruiz A, Mercado M, Guantay M, Ponessa G (2009). Morfoanatomía y Arquitectura Foliar de *Schinus Areira* (Anacardiaceae). *Lilloa* 46(1-2):137-46.

Russo M, Galletti GC, Bocchini P, Carnacini A (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Letswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3741-3746.

Şahin F, Güllüce M, Daferera D, Sökmen A, Sökmen M y cols (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, Volume 15, Issue 7.

Santelices MJ, Cárcamo M, Brenner C y Montes R (2016). Cáncer oral en Chile: Revisión de la literatura. *Revista médica de Chile*, 144(6), 758-766.

Samet, JM (2002). Los riesgos del tabaquismo activo y pasivo. *Salud pública de México*, 44(Supl. 1), s144-s160.

Schoonhoven L, Van Loon J, Dicke M (2005). *Insect-Plant Biology*. 2nd ed. Oxford University Press on Demand

Skoula M y Harborne, JB (2002). *The taxonomy and chemistry of Origanum*.

Sokolik CG, Lellouche JP (2018). Hybrid-silica nanoparticles as a delivery system of the natural biocide carvacrol. *RSC advances*, 8(64), 36712-36721.

Spencer K, Ferguson J, Wiesenfeld D (2002). Current concepts in the management of oral squamous cell carcinoma. *Australian Dental Journal*, 47: 284-289.

Specenier PM, Weyler J, Van Laer C, Weyngaert D, Van den Brande J y cols (2009). A non-randomized comparison of gemcitabine-based chemoradiation with or without induction chemotherapy for locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC Cancer*. 9. 10.1186/1471-2407-9-273.

Spyridopoulou K, Fitsiou E, Bouloukosta E, Tiptiri-Kourpeti A, Vamvakias, M y cols (2019). Extraction, Chemical Composition, and Anticancer Potential of *Origanum onites* L. Essential Oil. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(14), 2612.

Srihari T, Sengottuvelan M, Nalini N (2008). Dose-dependent effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Volume 60, Issue 6, 787–794

Téllez Monzón LA y Nolazco Cama DM (2017). Estudio de la composición química del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* spp.) de Tacna. *Ingeniería Industrial*, (35), 195-205.

Usano-Aleman J, Palá-Paúl J, Díaz S (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca (Biología)* (2): 60-70.

Varela BG, Ganopol MJ, Gurni AA, Bosco P y Agostinelli L (2014). Morpho-anatomical analysis for the quality evaluation in “oregano” commercial samples of Buenos Aires City (Argentina). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas*, 13(1), 20-30.

Warnakulasuriya S (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*; 45: 309-16

Wong TSC y Wiesenfeld D (2018). Cáncer oral. *Australian Dental Journal*, 63: S1 S91– S99.

Wunsch-Fiho V y de Camargo A (2001). The burden of mouth cancer in Latin America and the Caribbean: epidemiologic issues. *Seminars Oncol*; 28: 158-68.

Yao M, Epstein JB, Modi BJ, Pytynia KB, Mundt AJ y cols (2007). Current surgical treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology*, 43(3), 213–223.

Zu Y, Yu H, Liang L, Fu Y, Efferth T y cols (2010). Activities of ten essential oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(5), 3200–3210.