



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
ICOD  
ÁREA DE FARMACOLOGÍA  
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA PARA EL  
DESARROLLO DE ANTINEOPLÁSICOS Y ANTIFÚNGICOS**

**“Formulación de hidrogel de aceite esencial de *Origanum vulgare* y su efecto sobre líneas celulares de cáncer oral”**

**DANIEL ALBERTO OJEDA BONILLA**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Mario Diaz-Dosque**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. José Jara Sandoval**

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 1916  
Santiago - Chile  
2023**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA  
ICOD  
ÁREA DE FARMACOLOGÍA  
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA PARA EL  
DESARROLLO DE ANTINEOPLÁSICOS Y ANTIFÚNGICOS**

**“Formulación de hidrogel de aceite esencial de *Origanum vulgare* y su efecto sobre líneas celulares de cáncer oral”**

**DANIEL ALBERTO OJEDA BONILLA**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Mario Diaz-Dosque**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. José Jara Sandoval**

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 1916  
Santiago - Chile  
2023**

## **Dedicatoria**

A mis amados padres Cecilia y Daniel

A mi amado hermano Benjamín

A mis abuelos y en especial a ti mi Tatita, que se desde donde estes me has acompañado en todo este proceso.

Sin ustedes nada de esto sería posible, gracias.

## **Agradecimientos**

Al Doctor Mario Diaz-Dosque por su incondicional apoyo desde el inicio de mi formación en la Universidad tanto en lo académico con en el plano personal y al Proyecto FIOUCH 1916.

Al Doctor José Jara Sandoval por su paciencia y disposición a enseñarme y acompañarme en el desarrollo de este trabajo.

Al laboratorio de Nanobiomateriales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y todos sus integrantes, por entregarme el espacio y apoyo en el desarrollo de esta Tesis.

Al laboratorio de Farmacología para el desarrollo de antineoplásicos y antifúngicos de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y todos sus integrantes, en especial a Perla por su apoyo.

A mi gran amigo y hermano Franco Silva Balagna, con quien trabajamos codo a codo y nos entregamos mutuamente la motivación para seguir adelante y desarrollar nuestros trabajos de investigación.

A las bellas personas que me permitió conocer las largas horas de trabajo en el laboratorio Carolina Álvarez de Araya Picero y Paula Rojas Maluenda, quienes fueron fundamentales, me enseñaron y apoyaron en todo el proceso de las pruebas celulares.

A mi amada Isi, por la paciencia y nunca dejarme de apoyar en este proceso, gracias.

A mis queridos amigos Vicente, Fernanda, José Tomás, Camila, Colomba, Constanza, quienes me acompañaron durante todos estos años, en las distintas etapas de esta aventura que emprendimos juntos.

Al Dr. Pablo Milla, por su incondicional apoyo y entrega en mi formación clínica, además de sus inagotables consejos, confianza y cariño con mi persona.

No puedo dejar de agradecer a mis tíos Vicky y Sergio y a mis primos Mati y Popi, con quienes viví mi primer año de universidad y siempre han sido mi hogar acá en Santiago, a mi tía Chelo que siempre estuviste conmigo cuando te necesite, gracias.

# ÍNDICE

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER .....	3
2. TRATAMIENTO DEL CÁNCER ORAL.....	6
3. ACEITES ESENCIALES .....	8
4. ACEITES ESENCIALES Y CÁNCER.....	10
5. BIOPOLÍMEROS Y ACEITES ESENCIALES .....	11
<b>III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
1. HIPÓTESIS:.....	13
2. OBJETIVO PRINCIPAL:.....	13
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	13
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
1. REACTIVOS E INSUMOS .....	14
2. MUESTRA VEGETAL.....	14
3. EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES POR ARRASTRE DE VAPOR DE AGUA .....	14
4. LÍNEAS CELULARES .....	16
5. CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES .....	16
6. REALIZACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR DE TIMOL .....	16
7. PREPARACIÓN DE HIDROGELES EN BASE A ACEITE ESENCIAL DE <i>O. VULGARE</i> E HIDROCOLOIDE NATURAL.....	18
8. CUANTIFICACIÓN DE PERDIDA DE HUMEDAD EN FUNCIÓN DEL TIEMPO Y SELECCIÓN DEL MOMENTO ÓPTIMO PARA LA UTILIZACIÓN DEL HIDROGEL.....	20
9. ANÁLISIS DE MORFOLOGÍA DE HIDROGELES MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	20
10. ENSAYO DE TRANSPARENCIA DE LOS HIDROGELES (%T) .....	21
11. ENSAYO DE LIBERACIÓN CONTROLADA DEL ACEITE ESENCIAL CARGADO EN EL HIDROGEL .....	21
12. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE AEO CONTENIDO EN CADA DISCO DE HIDROGEL 0,5% v/v .....	22
13. ENSAYO CUALITATIVO DE CITOTOXICIDAD DEL HIDROGEL-ACEITE ESENCIAL SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CAL-27 .....	23
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
1. PREPARACIÓN ÓPTIMA DEL HIDROGEL-ACEITE ESENCIAL DE <i>O. VULGARE</i> .....	25
2. CUANTIFICACIÓN DE ACEITE ESENCIAL QUE SE LIBERA AL MEDIO DESDE EL HIDROGEL-ACEITE ESENCIAL EN BASE A UN PERIODO DE TIEMPO ESPECÍFICO .....	28
3. ESTUDIO CUALITATIVO LA CITOTOXICIDAD GENERADA POR EL HIDROGEL-ACEITE ESENCIAL SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CAL-27 .....	32
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
1. PREPARACIÓN ÓPTIMA DEL HIDROGEL-ACEITE ESENCIAL DE <i>O. VULGARE</i> .....	35
2. CUANTIFICACIÓN DE ACEITE ESENCIAL QUE SE LIBERA AL MEDIO DESDE EL HIDROGEL-ACEITE ESENCIAL EN BASE A UN PERIODO DE TIEMPO ESPECÍFICO .....	37
3. ESTUDIO CUALITATIVO DE LA CITOTOXICIDAD GENERADA POR EL HIDROGEL-ACEITE ESENCIAL SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CAL-27 .....	38
<b>VII. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>VIII. LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....</b>	<b>42</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>43</b>

## I. RESUMEN

**Introducción:** El carcinoma oral de células escamosas es el tipo más común de cáncer oral. Existen quimioterápicos disponibles para el tratamiento, sin embargo, las células tumorales adquieren resistencia farmacológica. Por tanto, es necesario desarrollar nuevos tratamientos. En este contexto, nace la posibilidad de utilizar aceites esenciales, que han mostrado efectos citotóxicos. Estos son volátiles e inestables, por esto requieren de un vehículo que permita su encapsulamiento y posterior liberación. Uno de los vehículos que han sido estudiados son los denominados hidrogeles. Los hidrogeles presenta la ventaja de tener la capacidad de realizar una liberación controlada del aceite esencial, reduciendo el riesgo de concentraciones potencialmente tóxicas que generen un efecto citotóxico inespecífico afectando incluso a células que no son el blanco terapéutico.

**Materiales y métodos:** Se elaboraron hidrogeles con gelatina de piel bovina 4% m/v. Se añadió TWEEN80® 0,005% v/v y aceite esencial de *Origanum vulgare* (AEO) en la concentración deseada. Se elaboraron hidrogeles con 0% v/v de AEO y 0,5% v/v de AEO. Estos hidrogeles fueron deshidratados y cortados en discos de 0,6 mm de diámetro. Ensayos celulares se efectuaron en cultivos planos de CAL-27. Se evaluó el efecto citotóxico de los hidrogeles con AEO mediante tinción de cristal violeta 0,5%, midiendo la absorbancia a 590 nm. Las características estructurales del hidrogel se evaluaron a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) y su transparencia a través de espectrofotometría (UV-VIS).

**Resultados:** Los hidrogeles generaron una liberación controlada del AEO, cada disco 0,5% v/v de AEO libero al medio 9,22 ppm de AEO. De esta manera, el encapsulamiento del aceite en el hidrogel se consideró efectivo, lo que se condice con lo observado por SEM y la transparencia del hidrogel. Sobre líneas celulares los hidrogeles evidenciaron efecto citotóxico en CAL-27, disminuyendo de la viabilidad celular, el hidrogel 0% v/v de AEO disminuyo la viabilidad a un promedio de  $83,5\% \pm 14,3\%$  vs el control y el hidrogel 0,5% v/v de AEO disminuyo la viabilidad celular a un promedio del  $4,3\% \pm 5,3\%$  vs el control.

**Conclusión:** La incorporación del AEO en el hidrogel mantuvo sus efectos citotóxicos y además permitió una liberación controlada en el medio evaluado. Esto nos permite plantear que los hidrogeles generados son un método efectivo y eficaz para el transporte de AEO.



## **II. INTRODUCCIÓN**

### **1. Epidemiología del cáncer**

El cáncer es una enfermedad no transmisible potencialmente mortal, la cual ocurre por una alteración genética, específicamente en los genes que codifican la forma, funcionalidad y proceso replicativo de las células. El cáncer puede iniciar en cualquier célula del cuerpo, sumado a esto existe el potencial invasivo de estas células a otros tejidos, estableciéndose así una metástasis (Hausman, 2019).

Estudios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) proyectan un aumento sostenido en el tiempo de la prevalencia y mortalidad por enfermedades no transmisibles como lo es el cáncer y una disminución continua de las enfermedades transmisibles, siendo así esperable al año 2040, 30.2 millones de habitantes tengan diagnóstico de cáncer, lo cual se estima represente cerca del 70% de las muertes a nivel mundial (International Agency for Research on Cancer, 2023).

En Chile la información más actualizada que se dispone corresponde al año 2016 en el cual los diversos tipos de cáncer cobraron la vida de 25.128 chilenos, representando un 23.6% de la mortalidad total anual, siendo de este modo la segunda causa de muerte más prevalente en Chile según indica el Departamento de Estadística e Información de Salud (DEIS) del Ministerio de Salud (MINSAL) (Anuario de defunciones DEIS, 2021). Además, el cáncer es el primer responsable de Años de Vida Saludable Perdidos (AVISA) en la población Chilena según señala el MINSAL (Ministerio de Salud, 2016).

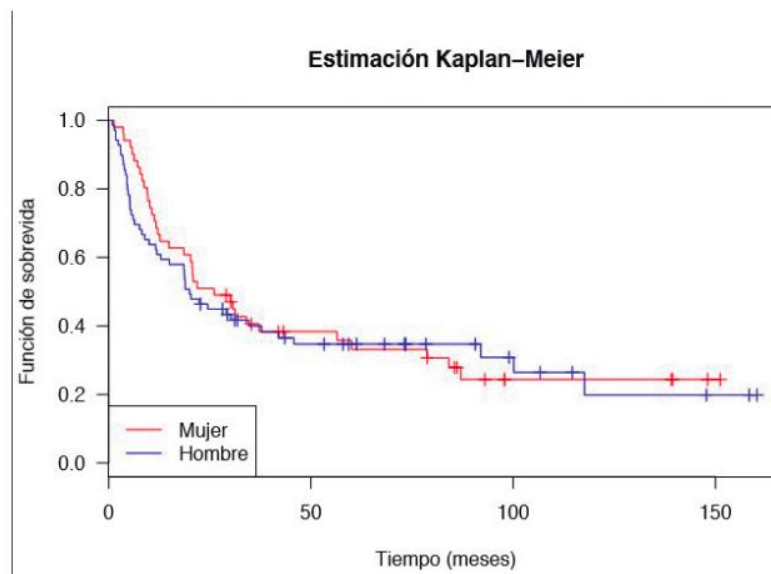
En Chile los cánceres más frecuentes tanto desde el punto de vista de la mortalidad como de la carga de enfermedad son el cáncer de estómago, pulmón, vesícula y vías biliares, colon, mama, próstata y cervicouterino, respectivamente. Con excepción del cáncer de pulmón, Chile tiene mayor carga de enfermedad en todos los cánceres en comparación con la carga a nivel mundial (Estrategia Nacional de Cáncer, 2016).

Es sabido que el cáncer está ampliamente asociado a los determinantes sociales de la salud, entre ellos podemos destacar el nivel educacional, condiciones laborales, calidad de los recursos básicos como agua, servicios sanitarios, factores de riesgo como mal nutrición, estilos de vida no saludables; destacan también condiciones estructurales como lo son las políticas públicas, socioeconómicas, culturales y medioambientales. En suma a todo lo anterior es que se evidencia que existe múltiples inequidades que van a determinar la distribución del cáncer en la sociedad (Coughlin, 2019; Coughlin, 2020). Se considera que cerca de un 40% de los cánceres están relacionados con estilos de vida no saludables y factores de riesgo modificables como lo son el consumo y exposición al cigarrillo, consumo de alcohol, exposición a sustancias tóxicas y carcinogénicas y la obesidad (Rock, 2020; Rumgay, 2021; Li, 2022) disminuyendo así los pacientes sus AVISA.

El cáncer oral es la lesión maligna más prevalente a nivel mundial en el territorio maxilofacial (Montero y Patel, 2015), el cual se puede presentar en la zona anatómica comprendida entre la base de cráneo hacia caudal y las clavículas hacia cefálico, pudiendo comprometer la cavidad nasal, senos paranasales, labios, cavidad oral, faringe, glándulas salivales y laringe (Syrjänen y cols., 2019). Es un serio problema de salud pública dado el impacto y las consecuencias que este causa en la vida tanto de los afectados como de sus familiares (Gupta y Kumar, 2016). El diagnóstico de cáncer oral a nivel mundial representa el 2% de los nuevos diagnósticos de cáncer y se considera como la decimoquinta causa más común de muerte a nivel mundial, existe una tasa de mayor incidencia en el sexo masculino al compararlo con el sexo femenino, con un 2,7 y 1,2 respectivamente (Global Cancer Observatory, 2021).

La neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral es el carcinoma oral de células escamosas (COCE), el cual deriva del epitelio escamoso estratificado de la mucosa oral, con una prevalencia de 95%, correspondiendo a 9 de cada 10 neoplasias malignas orales (Riera y Martínez, 2005; Warnakulasuriya, 2009); los pacientes diagnosticados con cáncer de células escamosas oral (CCEO) tienen una supervivencia global a los dos años de un 48,3% y a los cinco años de un 33,9%

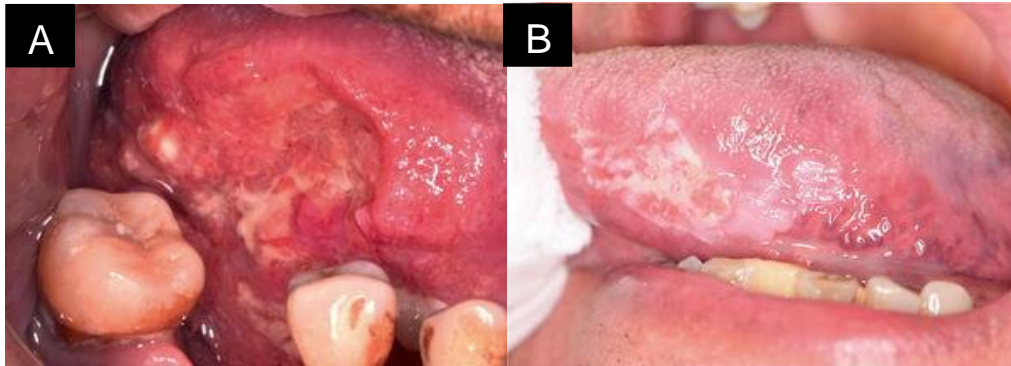
según se muestra en la estimación de Kaplan-Meier de la Figura 1 (Maraboli-Contreras y cols. 2018).



**Figura 1. Probabilidad de sobrevida en pacientes diagnosticados con carcinoma oral de células escamosas entre los años 2000-2012, según sexo.** Extraído de "Sobrevida de carcinoma oral de células escamosas: reporte de la Universidad de Chile" (Maraboli-Contreras y cols. 2018).

Un estudio chileno determinó las localizaciones más frecuentes de cáncer oral, siendo el sitio más frecuentemente diagnosticado la lengua, seguido de la glándula parótida y en tercer lugar el piso de boca, sin tener una diferencia significativa al hacer el análisis diferenciado por sexo (Candia y cols., 2018).

Clínicamente el CCEO es variado, presentándose como cambios de coloración en la mucosa, que se ven como manchas blancas o leucoplasias, también de color rojizas o eritropasias, sumado a cambios de textura y elasticidad de la mucosa oral, que pueden manifestarse como lesiones de tipo induradas, úlceras que no remiten en más de 14 días, lesiones de tipo nodulares, pérdida de sensibilidad y pérdida dentaria, como se muestra en la Figura 2 (Araya,2018).



**Figura 2. Fotografías clínicas de carcinoma de células escamosas oral.** A) Carcinoma escamoso de crecimiento endofítico en borde de lengua. B) Carcinoma escamoso en borde de lengua en relación a leucoplasia. Extraído de “Diagnóstico precoz y prevención en cáncer de cavidad oral” (Araya, 2018).

En Chile, el Programa Nacional del Cáncer no cuenta con un programa específico para el cáncer oral y tampoco es parte de las Garantías Explícitas en Salud (GES) del MINSAL, lo que reduce las posibilidades de acceso al diagnóstico y tratamiento oportuno en la gran mayoría de los pacientes (Candia y cols., 2018).

## 2. Tratamiento del Cáncer Oral

Para el tratamiento del cáncer oral existen diversas opciones como son la cirugía, la radioterapia, la inmunoterapia y la quimioterapia, según sea el caso de cada paciente se pueden realizar múltiples combinaciones de estas.

Para el CCEO el fármaco de primera elección es el cisplatino (cis-diaminodicloroplatino, CIS) el cual es un derivado del platino que fue aprobado en 1978 por la FDA para el tratamiento del cáncer (Dasari y Tchounwou, 2014). Desde entonces, se utiliza como quimioterapéutico para varios tipos tumorales, entre los que destaca el CCEO. Se ha planteado que su mecanismo de acción se divide en dos etapas. En la primera, CIS entra a la célula y se activa al ser hidrolizado. En la segunda, el producto hidrolizado que es un potente electrófilo, es capaz de reaccionar con cualquier nucleófilo, incluidos los grupos sulfhidrilos disponibles en proteínas y átomos donadores de nitrógeno en ácidos nucleicos, por lo que cisplatino tiene alta afinidad por el ADN. Principalmente se une al nitrógeno de la posición 7 (N7) en las bases púricas, provocando el colapso del ADN en las células cancerosas, bloqueando la división celular y dando como resultado la muerte celular

por apoptosis (Browning y cols., 2017). Además, en el citoplasma, es capaz de interactuar con el ADN mitocondrial y múltiples proteínas, lo que estimula estrés oxidativo y reticular (Dasari y Tchounwou, 2014; Obrist y cols., 2018).

El cisplatino tiene poca selectividad por las células tumorales, por lo que es capaz de causar citotoxicidad en células normales, es por esto que puede inducir diversos efectos secundarios como por ejemplo el cansancio, caída del cabello, mayor susceptibilidad a infecciones, náuseas y vómitos, múltiples afecciones a nivel oral como úlceras y disfagia, cambios en el apetito, estreñimiento, cambios en el estado anímico, afectarse el deseo y función sexual, problemas de fertilidad, hepatotoxicidad y nefrotoxicidad (Oun y cols., 2018). En consecuencia se afecta tanto el aspecto psicoemocional, fisiológico y físico de los pacientes sometidos a estos, a pesar de lo anterior por largos años se ha demostrado la efectividad terapéutica de estos tratamientos.

En casos de pacientes sometidos a cirugía es necesaria la posterior rehabilitación multidisciplinaria, dado el gran compromiso de tejidos que producen este tipo de cirugías, con respecto a los pacientes que son sometidos a radioterapia en el territorio maxilofacial al largo plazo existen efectos adversos como lo son la osteoradionecrosis de los huesos maxilares y el compromiso de las glándulas salivales, estableciéndose la hiposialia, mientras que en el caso de la quimioterapia, son múltiples los fármacos y blancos terapéuticos que son susceptibles de ser utilizados, destacándose el uso de agentes alquilantes, nitrosoureas, antimetabolitos, antraciclinas, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la mitosis, corticoesteroides, inmunomoduladores y terapias hormonales (Chronopoulos y cols., 2018; American Cancer Society, 2021).

Señalados los puntos anteriores y teniendo en claro las múltiples reacciones adversas y complicaciones que existen sobre los fármacos y tratamientos actuales, sumado a la resistencia que existe ante el cisplatino (Ghosh, 2019), es que surge la necesidad de generar nuevos tratamientos, es en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas es que surge como opción el uso de aceites esenciales, los cuales son

productos naturales y han demostrado en el tiempo excelentes resultados (Chang y cols., 2017; Tubtimsri y cols., 2018).

### 3. Aceites Esenciales

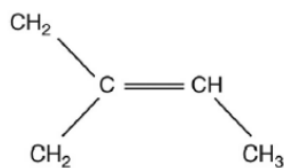
Los aceites esenciales son definidos por la séptima edición de la Farmacopea Europea como “productos odorantes, que tienen una composición compleja, y se obtienen a partir de extracto vegetal crudo, ya sea extraído por vapor de agua, destilación en seco o un método mecánico adecuado sin calentar. Generalmente, se utiliza un método físico para la separación del aceite esencial de la fase acuosa” (Asbahani y cols., 2015).

La aplicación en la odontología de los aceites esenciales es extensa y desde muchos siglos atrás. Existe un producto que se utiliza ampliamente en la práctica clínica diaria conocido como Eugenol, cuya composición en gran parte es aceite esencial de *Syzygium aromaticum* o más conocido como clavo de olor, así también en casa los utilizamos frecuentemente en colutorios, jabones, productos cosméticos entre muchos otros (González-Escobar, 2002).

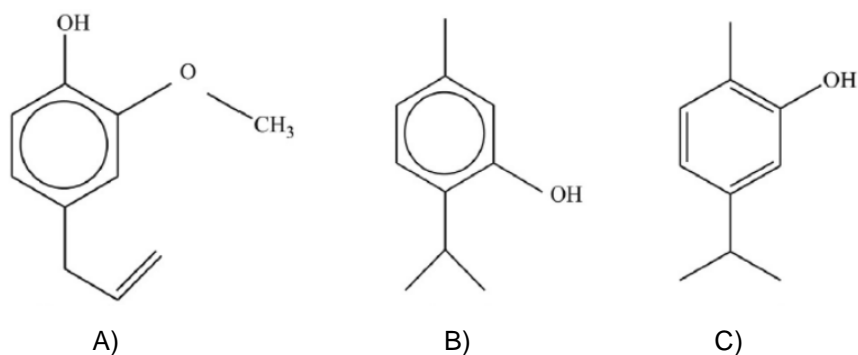
Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de las plantas, que poseen funciones desde la reproducción hasta la defensa frente a factores estresores tanto abióticos como bióticos, constituyendo así parte importante de su sistema inmunológico. Las singularidades del aceite esencial producido por cada planta dependerán de las características geográficas, climáticas, hídricas, estacionales e incluso la susceptibilidad de ser depredadas, en tanto, se puede inferir que el aceite esencial producido por una misma especie de planta en una región tendrá características distintas al aceite producido por su homóloga de otra región (Llorens-Molina, 2021). Además de ello, no existen protocolos definidos para el tiempo de extracción del aceite, ya que este dependerá del objetivo de cada estudio a realizar, obteniendo así distintas cantidades y cualidades del aceite esencial extraído (Božović y cols., 2017; Olayemi, 2017). Diversas son las acciones que poseen los aceites esenciales, destacando actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiparasitaria, insecticida, anticancerígena, antioxidantes y muchas otras

características que le permiten su aplicación en la industria en general (Bayala y cols., 2014).

Dentro de la composición de los aceites esenciales se encuentran distintos hidrocarburos, por lo general más de 20 tipos distintos, dentro de estos destacan los terpenos, tales como monoterpenos y sesquiterpenos. En su composición encontraremos otros elementos como alcoholes, fenoles, aldehídos, cetonas y ésteres que se conocen como terpenoides. La composición de cada aceite determinará las características físicas y propiedades biológicas que este posea (Moghaddam y Mehdizadeh, 2017). Respecto a su composición química, tanto los terpenos como terpenoides se conforman por una unidad molecular llamada isopreno (Figura 3), siendo el número de unidades y la adición de grupos funcionales los que determinan el nombre de los compuestos. Dentro de los monoterpenos (2 unidades de isopreno) más frecuentes encontramos a limoneno, cimeno, pineno, camfeno, entre otros, mientras que los sesquiterpenos (3 unidades de isopreno) son aromadendreno, isaboleno, cedreno y zingibereno. Los terpenoides más destacados por su actividad biológica son aquellos pertenecientes al grupo de los fenoles, como eugenol, timol y carvacrol (Figura 4) (Moghaddam y Mehdizadeh, 2017).



**Figura 3. Unidad de isopreno**



**Figura 4. Terpenoides del grupo fenol. A) Eugenol; B) Timol; C) Carvacrol.**

#### 4. Aceites Esenciales y Cáncer

Expuesto lo anterior, surge la duda de que efecto tienen estos aceites sobre líneas celulares de cáncer oral. Un estudio Chileno demostró que el Kaempferol genera inducción a la apoptosis en cánceres de cabeza y cuello, este compuesto es encontrado en múltiples plantas y alimentos (Catalán y cols., 2020), otro estudio utilizó aceite esencial de *Cinnamomun cassia*, el cual es un árbol de la misma familia que el Canelo encontrado en Chile, se constató arresto del ciclo celular y apoptosis de las células de carcinoma escamoso humano al ser expuestas a este aceite esencial (Chang y cols., 2017), en concomitancia a lo anterior, otro estudio utilizó una nano emulsión de aceite esencial de menta verde (*Mentha spicata*), el cual demostró efecto citotóxico sobre líneas celulares de carcinoma oral (Tubtimsri y cols., 2018).

Múltiples estudios han buscado determinar las vías por las cuales se logra el efecto citotóxico y de inhibición proliferativa. Autores reportan que existe señalización por interferones, biosíntesis de n-glicano, señalización extracelular regulada por ERK5 y activación de las caspasas dependiente de ROS, siendo estas las vías más destacadas. Lo anterior resulta en una acumulación de compuestos lipófilicos en las membranas celulares de las células cancerígenas, lo cual produce un aumento de la permeabilidad de estas, así es como ocurre la fuga de múltiples enzimas y metabolitos propios de la célula en cuestión, sumado al efecto transcripcional que estos producen en los genes involucrados en el ciclo celular (Jo y cols., 2012; Sertel y cols., 2011).

Estudios con Timol el cual químicamente corresponde a un fenol alcohólico, han buscado demostrar cuáles son las vías por las cuales este genera un efecto antineoplásico, destacando así la inhibición del crecimiento celular, inducción a la apoptosis, producción de especies reactivas de oxígeno, despolarización de la membrana mitocondrial, activación de la proteína BAX, interacción de ADP ribosa polimerasa, disminución de proteína BCL-2 e incremento de células en fase Sub0 G1 como marcador de apoptosis (Islam y cols., 2019).



Es fundamental determinar las concentraciones de aceite esencial efectivas para lograr el efecto inhibitorio o citotóxico deseado de los diversos aceites que se deseen utilizar, ya que concentraciones subtóxicas celulares estimulan y promueven el crecimiento celular, por el contrario, concentraciones muy elevadas generan un efecto tóxico masivo, afectando incluso células normales, las cuales no son el blanco terapéutico, por lo cual es de suma importancia determinar la ventana terapéutica. Sumado a lo anterior se ha determinado que el efecto citotóxico además de ser dosis dependiente también es tiempo dependiente, por lo cual tenemos dos variables claves para lograr el éxito terapéutico (Cha y Kim, 2012; Sertel y cols., 2011).

## **5. Biopolímeros y Aceites Esenciales**

Uno de los aspectos a considerar para proponer a los aceites esenciales como una posible alternativa terapéutica, es su baja estabilidad en el tiempo. Además, son volátiles y altamente liposolubles, lo que dificulta la elección de un medio de entrega adecuado de estos preparados.

En la literatura encontramos múltiples formas de administración de los aceites esenciales, donde se destaca la aplicación tópica, la ingesta en infusiones, la inhalación, la difusión de discos, la inclusión en nano partículas, el uso de geles, entre otros (Bialon y cols., 2019; Farrar y Farrar, 2020; Zhong y cols., 2019; Boruga y cols., 2014; Saporito y cols., 2017; Matulyte y cols., 2021).

Por ello es fundamental utilizar un vehículo que logre mantener la estabilidad en el tiempo de los aceites esenciales, en esta búsqueda es que surge la opción de utilizar biopolímeros los cuales son biomoléculas naturales que son sintetizadas por múltiples organismos como microbios, plantas y animales, teniendo por ello un alto grado de biocompatibilidad. Dentro de los biopolímeros más conocidos encontramos la celulosa, el alginato, el ácido hialurónico, el colágeno, y el quitosano, entre otros (Sahana y Rekha, 2018).

Los hidrogeles corresponden a la mezcla de un biopolímero con agua, por lo cual es hidrófilo; dentro de sus características destacan que son blandos, flexibles y en

presencia de agua se pueden hinchar manteniendo su forma, mientras que en estado deshidratado mantienen una estructura laminar (Kumar, 2022). Los hidrogeles han sido ampliamente utilizados en las ciencias médicas para la creación de andamios en reparación tisular, la ingeniería de tejidos, administración de sustancias como fármacos entre otros (Gao y cols., 2016; Huang Q y cols., 2017; Oltarzhevskaya y cols., 2018; Liang y cols., 2021).

La mezcla de hidrogeles y aceites esenciales pueden ser sintetizados gracias al uso de algún surfactante y ultrasonido u homogeneizadores de alta presión, logrando así gotas de aceite esencial a nivel nanométrico (Scartazzini y cols., 2019). De este modo se logra sortear la dificultad de lograr la estabilidad en el tiempo de los aceites esenciales, ya que estos se encuentran incluidos al interior del hidrogel, no obstante, debemos someter a las células tumorales a concentraciones y tiempo suficientes para lograr el efecto terapéutico deseado, por lo que para mejorar este efecto es necesario realizar un control de liberación. Tal característica, es propia de los hidrogeles, siendo así estos una opción económica y de fácil manipulación al ser utilizados como vehículos, de este modo se logran incluso mejores niveles de permeabilidad del aceite esencial a la célula y se reduce el riesgo de concentraciones potencialmente tóxicas (Kodadová y cols., 2015, 2017).

El control de la liberación está definido como una forma de dosificación que va a permitir la liberación de un fármaco a una velocidad y/o localización determinada, consiguiendo de este modo valores adecuados de biodisponibilidad a niveles plasmáticos y garantizar a la vez el correcto efecto farmacoterapéutico de forma eficaz y segura (Muñoz y Ferrero, 2020).

En suma, a todo lo anterior es que los hidrogeles cargados con aceites esenciales podrían ser una buena opción para el tratamiento de lesiones de cáncer oral como coadyuvantes para la cirugía, radioterapia y quimioterapia (Kim y Li, 2019).

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 1. Hipótesis:

La formulación del hidrogel de gelatina que contiene aceite esencial de *Origanum vulgare* permite su liberación controlada y tiene un efecto citotóxico sobre células tumorales de cáncer oral.

#### 2. Objetivo Principal:

Formular el hidrogel de gelatina cargado con aceite esencial de *Origanum vulgare* y evaluar su efecto citotóxico en líneas celulares de cáncer oral.

#### 3. Objetivos Específicos:

1. Formular y estudiar las propiedades de encapsulación y liberación del aceite esencial de *Origanum vulgare* desde el hidrogel de gelatina.
2. Evaluar la actividad citotóxica del hidrogel de gelatina con aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre líneas celulares de cáncer oral.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Reactivos e Insumos

Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, código #D7777 Sigma-Aldrich®), Anfotericina B (código #03-028-1B, Biological Industries®), Hidrocortisona (código #H0888 Sigma-Aldrich®), Piruvato de sodio (código #11360070, Gibco®), L-glutamina (código #25030-081 Gibco®), Suero fetal Bovino (FBS del inglés Fetal Bovine Serum, código #04-127-1A Biological Industries®), Solución Penicilina-Estreptomicina (código #03-031-1B Biological Industries®), Bicarbonato de sodio (código #S5761 Sigma-Aldrich®), DMSO (código #276855 Sigma-Aldrich®), HCl (código #AC-0065 Winkler®), NaCl (código #793566 Sigma-Aldrich®), PBS al 10X (tampón fosfato salino pH 7,4) (código #16505 Merck®), Tripsina EDTA solución A (código #03-050-1B Biological Industries®), Solución azul de tripán (código #25-900-CI Corning®), Cristal Violeta (código #0528-100G Amresco®), Ácido acético (código #27225-2.5L-R Sigma-Aldrich®), Gelatina de piel bovina (código #G9031-100G Sigma-Aldrich®), Tween® 80 (código #P4780-100ML Sigma-Aldrich®), Timol (código #T0501-100G Sigma-Aldrich®).

### 2. Muestra vegetal

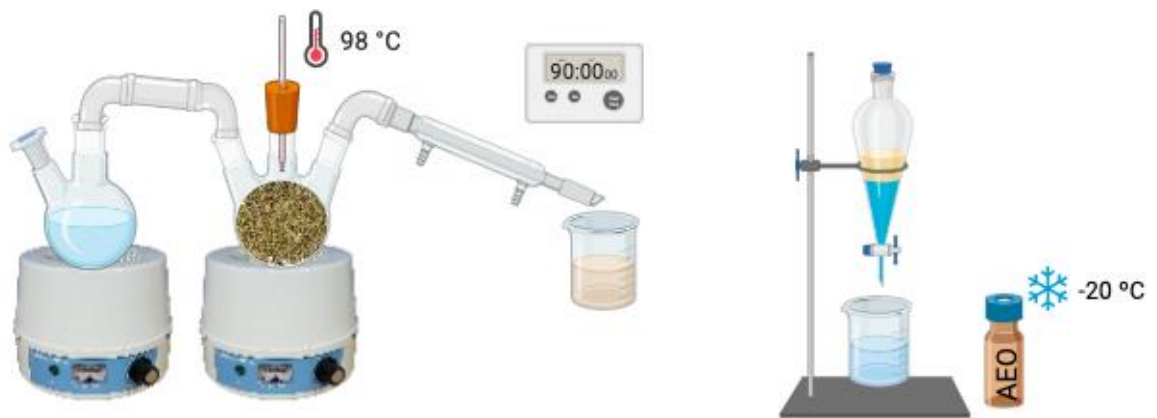
Se utilizaron hojas y tallos de *Origanum vulgare* recolectado durante la floración primaveral del año 2021 en Chicauma, Lampa, Región Metropolitana, Chile (33°14'23''S, 70°54'27''O).

### 3. Extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor de agua

Se realizaron diversas cargas con aproximadamente 500 g de hojas y tallos de orégano en un balón para destilación de 2 litros, conectado a este, se situó un segundo balón de iguales características con agua destilada, el cual estaba sustentado en una manta calefactora, logrando llevar a ebullición el agua generando así vapor de agua que fue traspasado mediante conectores de silicona y tubo de vidrio conector al balón cargado con el producto vegetal; en este último el vapor realizó el arrastre de los compuestos volátiles, el cual luego paso por un

condensador de Liebig conectado a una fuente de agua fría constante para así lograr la condensación de la muestra, llevándola a estado líquido, posteriormente esta muestra obtenida fue almacenada en un vaso precipitado. Todo el proceso anteriormente señalado se mantuvo durante 90 minutos desde el inicio de la ebullición del agua. La temperatura del sistema fue controlada mediante un termómetro en el balón cargado con el producto vegetal, la cual se mantuvo constantemente a 98°C aproximadamente para el proceso (Figura 5).

La muestra líquida obtenida fue luego traspasada a un embudo de decantación, hasta lograr la separación de las fases, separando así el hidrolato del aceite esencial. El aceite esencial obtenido fue almacenado a -20 °C en frascos de vidrio color ámbar herméticos, previamente rotulados con fecha de obtención y el producto vegetal utilizado.



**Figura 5. Esquema equipo de extracción por arrastre de vapor y sistema de decantación.** Elaboración propia con software BioRender.

#### 4. Líneas celulares

Los ensayos se realizaron utilizando la línea celular CAL-27 (ATCC® CRL-2095™), células de carcinoma de células escamosas de lengua humana resistentes a cisplatino, adquiridas en American Type Culture Collection (ATCC). La línea celular CAL-27 se cultivó en Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado con Anfotericina B al 1%, penicilina-estreptomina al 2% y FBS al 10%. Las células se incubaron en placas de Petri de 100 mm a 37 °C, en 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 5. Caracterización del aceite esencial mediante cromatografía de gases

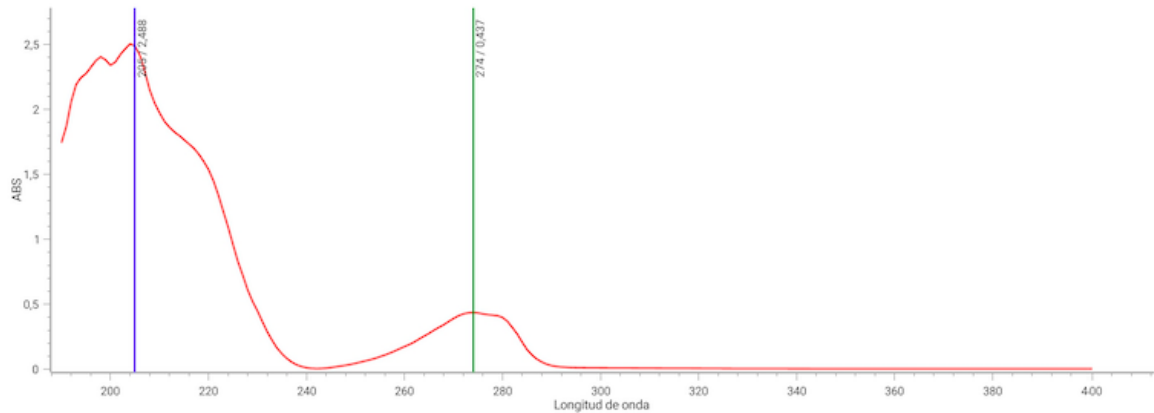
El aceite esencial obtenido de la muestra vegetal para este estudio, fue previamente caracterizado mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS/MS), obteniendo así que los principales elementos constituyentes de este aceite fueron monoterpenos oxigenados, representando el 64,13% del aceite (cis-sabieno hidrato 16,72%, timol 14,2% y 4-terpineol 13,57%), seguido de hidrocarburos monoterpenicos con un 26,59% del aceite ( $\gamma$ -terpineno 11,66%) y sesquiterpenos en un 5,12% del aceite; en suma se identificaron el 98,66% de las moléculas que componen el aceite esencial de *O. vulgare* (Cid-Chevecich, C. y cols., 2022).

#### 6. Realización de curva estándar de timol

Se preparó una solución madre de timol en agua, según su solubilidad máxima en agua 0,98 g/L (Sigma-Aldrich, 2022). Para ello se masó 0,98 g de timol que se traspasaron a un vaso precipitado de 1000 mL en el cual se agregó aproximadamente 800 mL de agua destilada y mediante agitación magnética a 300 rpm se solubilizó el timol parcialmente, luego esta solución fue traspasada a un matraz de aforo de 1000 mL para ser aforado con agua destilada y completar la solubilización total del timol.

Mediante el uso de espectrofotómetro Thermos® Genesys 150, se realizó una lectura un barrido en el espectro ultravioleta (190 nm - 400 nm) utilizando cubetas

de cuarzo para espectrofotómetro SCC® de 2000 µL, considerando como blanco 1500 µL de agua destilada. Se identificó en el espectro los picos de en las diversas longitudes de onda UV, identificando entre las señales, la señal para timol corresponde a los 274 nm.



**Figura 6. Barrido en el espectro ultravioleta para solución madre de timol,** se identifica línea en color verde correspondiente a longitud 274 nm como señal para timol. Línea color azul señal inespecífica.

Posteriormente se realizó las diversas diluciones de la solución madre a fin de generar una curva estándar para timol, obteniendo así una curva de absorbancia en función de la concentración de timol, según las siguientes diluciones seriadas a partir de la solución madre, en donde 0,98 g de timol es la solubilidad máxima por litro de agua: 0,98 g/1000 ml (980 ppm); 0,4 g/1000 ml (400 ppm); 0,2 g/1000 ml (200 ppm); 0,1 g/1000 ml (100 ppm); 0,05 g/1000 ml (50 ppm); 0,025 g/1000 ml (25 ppm) y 0,0125 g/1000 ml (12 ppm).

Mediante el uso de espectrofotómetro Thermos® Genesys 150, a una alícuota de 1500 µL de cada una de las soluciones anteriores se les realizó un barrido en el espectro Ultravioleta (190 nm - 400 nm) utilizando como blanco 1500 µL de agua destilada. Los datos anteriormente obtenidos fueron traspasados al software GraphPad Prism versión 10, para realizar análisis de datos, para esto se realizó una regresión lineal de absorbancia medida en función de las concentraciones estipuladas, interpolando una curva estándar lineal y obteniendo el  $r^2$ , se consideró como estadísticamente significativo un  $r^2 > 0,9$ .

Para la realización de esta curva estándar, el ensayo se realizó 3 veces en triplicado.

## 7. Preparación de hidrogeles en base a aceite esencial de *O. vulgare* e hidrocoloide natural

Se prepararon 250 mL de solución madre 4% m/v de gelatina de piel bovina en un vaso precipitado de 400 mL.

Esta solución madre se dividió en 2 muestras iguales de 100 mL cada una, el excedente de volumen fue descartado. A una de estas soluciones se le agregó 500µL de aceite esencial de *O. vulgare* para obtener el hidrogel experimental, mientras que la otra solución no se cargó con aceite a fin de generar el hidrogel control. Todo lo anterior según se detalla a continuación:

Se dispuso de un vaso precipitado de 400 mL, 10 g de gelatina de piel bovina, sobre placa de agitación magnética Heidolph® MR3001K con agitador magnético a 400 rpm a temperatura ambiente, luego se añadieron 100 mL de agua destilada a 90°C, una vez parcialmente disuelta la gelatina, se añadieron 150 mL de agua destilada a temperatura ambiente. Se mantuvo la agitación por 20 minutos, logrando así una solución homogénea; transcurridos los 20 minutos se agregaron 139 µL de Tween 80®, manteniendo la agitación magnética a 400 rpm.

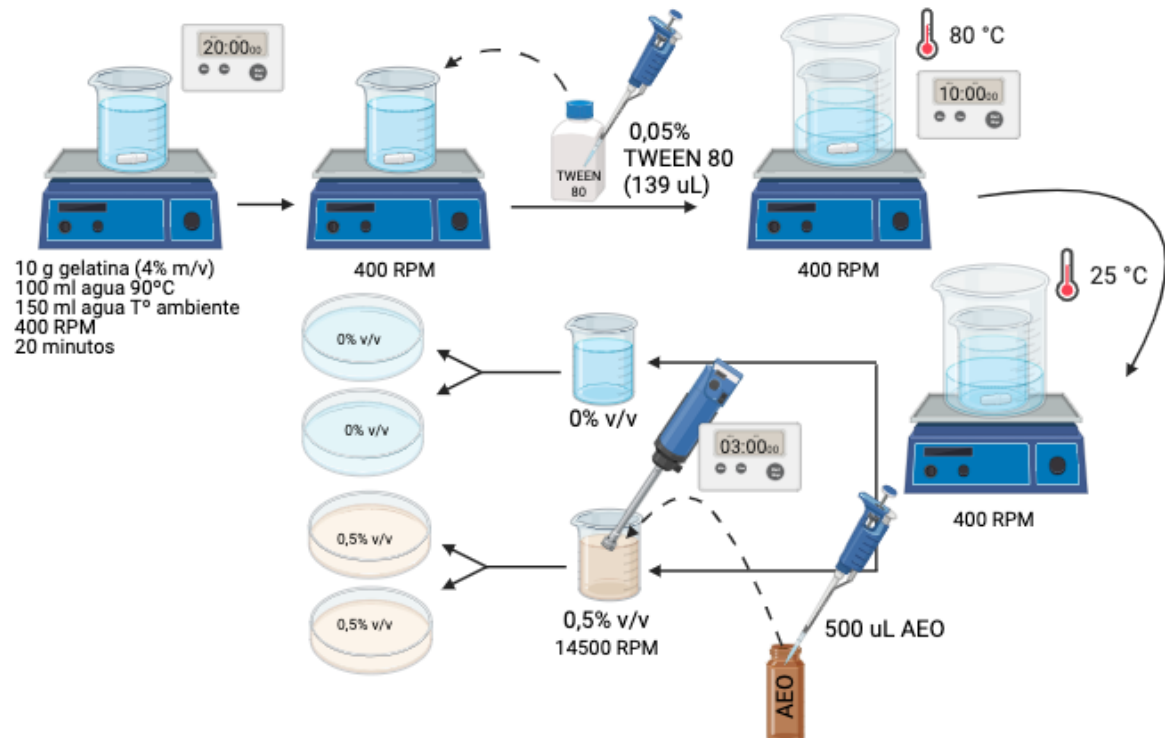
Se llevó la solución anterior en baño maría a 80°C mediante el uso de la placa calefactora, durante 10 minutos y manteniendo la agitación magnética a 400 rpm, luego se enfrió la solución anterior hasta los 25°C mediante baño maría inverso, luego se tomaron 100 mL de la solución anterior en un vaso precipitado de 250 mL el cual fue reservado, se repitió lo anterior para tomar 100 mL de la solución en un vaso precipitado de 250 mL y posteriormente agregar los 500 µL aceite esencial de *O. vulgare* (AEO), inmediatamente luego de agregar el aceite se homogenizó la solución con instrumento de dispersión Ultra-Turrax® a 14.500 rpm por 3 minutos.

Se traspasaron 40 mL de solución obtenida a una placa de silicona antiadherente de 10 cm de diámetro, logrando una altura de solución en la placa de 1 cm, se repitió con la solución sin carga de aceite, disponiendo de 40 mL en cada placa de silicona,



sin pasar está por el proceso de dispersión con Ultra-Turrax®, ya que este último no tiene carga de aceite.

En cada ciclo de elaboración se obtuvieron dos discos sin deshidratar de 10 cm de diámetro del hidrogel 0% v/v y 2 discos sin deshidratar de 10 cm de diámetro del hidrogel 0,5% v/v, según se indica en la Figura 7, el sobrante de cada solución fue descartado.



**Figura 7. Diagrama elaboración hidrogeles,** se identifica el paso a paso, el hidrogel 0,5% v/v al ser cargado el AEO es tratado con Ultra-Turrax®, luego cada solución es dividida en dos placas antiadherente, tal procedimiento no se realiza para el hidrogel 0% v/v y solo es dividido en dos placas antiadherente. Elaboración propia con software BioRender.

Finalmente se llevaron las placas de silicona previamente cargadas con los respectivos hidrogeles a 4°C en refrigerador para conseguir la gelificación de la solución.

### **8. Cuantificación de pérdida de humedad en función del tiempo y selección del momento óptimo para la utilización del hidrogel.**

Se registró la masa de la placa de silicona previamente identificada y rotulada con la concentración del hidrogel a elaborarse en balanza analítica Precisa® 125A, de igual forma se masó la placa de silicona con los 40 mL de hidrogel en los tiempos 0 h, 96 h, 120 h, 168 h y 216 h. A fin de cuantificar la pérdida de humedad en función del tiempo en base a la pérdida de masa.

Se identificó el tiempo en que se detiene la pérdida de humedad y se obtiene una lámina en forma de disco deshidratada, encontrándose está en óptimas condiciones para ser seccionada en discos uniformes mediante el uso de un perforador de alicate manual de 6 mm de diámetro ADIX®. Una vez cortados los discos estos fueron almacenados en placas de Petri de 100 mm previamente rotuladas, identificando el número de partida de elaboración, fecha y la concentración de aceite cargado en el disco.

Las placas con los discos seccionados fueron llevadas a una campana de protección biológica tipo II y esterilizadas bajo luz UV durante 15 minutos, posteriormente fueron selladas con lámina de parafina y almacenadas las placas de Petri alejadas de la luz, quedando los discos almacenados para ser utilizados posteriormente.

### **9. Análisis de morfología de hidrogeles mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La morfología de la película de hidrogeles 0% v/v y 0,5% v/v se analizó mediante microscopía electrónica de barrido para el estudio de la superficie del material. Se realizó una sección de 3 mm de ancho por 5 mm de largo de cada hidrogel ya deshidratado y este se plegó sobre sí mismo hasta obtener pequeños rectángulos. Se ubicaron los hidrogeles en la superficie del porta muestras de aluminio, con la ayuda de una cinta conductora adhesiva de carbono. Las muestras fueron metalizadas con Sputter Coater® SCG 050 y visualizadas en microscopio electrónico de barrido Jeol® JSM IT300LV a 20Kv, equipado con espectroscopía de

dispersión de rayos X (EDX) PentaFET Precision®, Oxford Instruments con software Aztec®, para el análisis elemental de las muestras. Se obtuvieron imágenes representativas en un rango de 20-9000X.

### **10. Ensayo de transparencia de los hidrogeles (%T)**

Para este ensayo se seccionaron películas del hidrogel ya deshidratado de 1 cm de ancho por 4 cm de largo y se adaptaron al interior de una cubeta de vidrio SCC® para espectrofotómetro de 10 mm x 10 mm. La transparencia se midió por transmitancia (%T) a 500 nm utilizando un espectrofotómetro Thermos® Genesys 150. La transmitancia total (100% T) se determinó utilizando la misma cubeta sin ninguna película al interior.

Para cada concentración de aceite cargado en el hidrogel se realizó la medición de tres hidrogeles distintos, los datos obtenidos fueron analizados en software GraphPad Prism versión 10, mediante T-test, se determinó un valor de  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

### **11. Ensayo de liberación controlada del aceite esencial cargado en el hidrogel**

Se dispuso de 10 discos de 6 mm de diámetro del hidrogel ya deshidratado de cada muestra (0% v/v y 0,5% v/v) en un vaso precipitado de 20 ml con 10 ml de agua destilada sobre placa de agitación magnética con agitador magnético a 500 rpm a temperatura ambiente.

Se tomó una alícuota de 2000  $\mu\text{L}$  de la solución anterior mediante el uso de pipeta Bioevopeak® 1000-5000  $\mu\text{L}$  desde el centro de la solución y fue traspasado a un tubo Eppendorf® de 2cc en el rango de tiempo de 15 a 255 minutos, con intervalos de 15 minutos cada toma.

Luego, se centrifugó la muestra obtenida previamente en tubo Eppendorf® de 2cc a 10000 rpm con aceleración y desaceleración en nivel 9 durante 90 segundos a 20°C en equipo Hermle® Z216MK, para luego tomar una alícuota de 1500  $\mu\text{L}$  desde el tubo Eppendorf® previamente centrifugado y está fue traspasada a cubeta de cuarzo para espectrofotómetro SCC® de 2000  $\mu\text{L}$ ; midiendo la absorbancia de la

muestra en espectrofotómetro Thermos® Genesys 150 a 274 nm, se consideró como referencia blanco una alícuota de 1500 µL de solución de 10 discos sin carga de aceite completamente disueltas en 10 mL de agua destilada.

Una vez medida la absorbancia, se reintegró la alícuota ya analizada tanto desde el tubo Eppendorf® como también el volumen de la cubeta de cuarzo para espectrofotómetro SCC® de 2000 µL a la solución en estudio para una vez cumplidos los 15 minutos desde la toma de alícuota anterior repetir todo el proceso descrito en este protocolo hasta el tiempo de 255 minutos.

Todos los pasos se realizaron en paralelo para ambos hidrogeles de 0% v/v y 0,5% v/v ya deshidratados en estudio.

Se registraron los datos obtenidos de absorbancia en función del tiempo y concentración de aceite esencial de los discos utilizados para ser analizados mediante el software GraphPad Prism versión 10 y realizar modelamiento de la curva de liberación en función de timol.

Para la realización de este estudio, se realizaron 3 experimentos manera independiente.

## **12. Determinación de la cantidad de AEO contenido en cada disco de hidrogel 0,5% v/v**

Primero se masaron 10 discos de 6mm de diámetro del hidrogel 0,5% v/v en triplicado y se determinó su promedio y DE, del mismo modo se masó 1 disco de 6mm de diámetro del hidrogel 0,5% v/v en triplicado y se determinó su promedio y DE.

Con el dato de absorbancia obtenido del ensayo de liberación del hidrogel 0,5% v/v en el tiempo 255 minutos, este se llevó a la curva estándar de timol mediante el despeje de X en la ecuación de la recta obtenida de la curva estándar de timol ( $Y = 0,007x + 0,1074$ ), el valor obtenido se determinó como la cantidad en ppm de timol contenido en 10 discos de 6mm 0,5% v/v.

Luego, para conocer la cantidad de timol contenido en 1 disco se utilizó la masa de 1 disco, la masa de los 10 discos obtenidos anteriormente y la concentración de timol contenido en 10 discos obtenido del despeje de X en la ecuación de la recta de la curva estándar de timol, según se indica en la siguiente formula.

$$[\text{timol en 1 disco}] = \frac{\text{masa de 1 disco} \times [\text{timol en 10 discos}]}{\text{masa de 10 discos}}$$

Conocido que el AEO contiene un 14,2% de su composición de timol, se tomó el valor obtenido del paso anterior para obtener la cantidad de AEO contenido en 1 disco, según se indica en la siguiente formula.

$$[AEO] = \frac{100\% \times [\text{timol 1 disco}]}{14,2\%}$$

### **13. Ensayo cualitativo de citotoxicidad del hidrogel-aceite esencial sobre líneas celulares de CAL-27**

Las células se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, el medio fue cambiado cada 2-3 días hasta alcanzar la confluencia de las células en las placas de cultivo de 100 mm. Las células fueron soltadas de las placas con Tripsina-EDTA 0.05% por 5 min, contadas en cámara de Neubauer por exclusión de azul de tripán, y sembradas en placas de 24 pocillos, sembrando 3x10<sup>4</sup> células/pocillo en un volumen final de 400 µL de medio DMEM alto en glucosa en cada pocillo. Luego de 24 horas desde la siembra, las células fueron tratadas con dos hidrogeles de manera independiente uno 0% v/v de AEO y otro 0,5 % v/v de AEO, disponiendo en cada pocillo de 1 disco de hidrogel-aceite esencial y utilizando las cuatro filas de la placa de cultivo, siendo incubada la placa tratada con los discos durante 24 h, según se indica a continuación.

Columna 1 → Blanco (400 µL de medio DMEM alto en glucosa).

Columna 2 → Control (3x10<sup>4</sup> células/pocillo con 400 µL de medio DMEM alto en glucosa).

Columna 3 → Test disco 0% v/v de AEO (3x10<sup>4</sup> células/pocillo con 400 µL de medio DMEM alto en glucosa + 1 disco por pocillo de 0% v/v de AEO).

Columna 4 → Test disco 0,5% v/v de AEO (3x10<sup>4</sup> células/pocillo con 400 µL de medio DMEM alto en glucosa + 1 disco por pocillo de 0,5% v/v de AEO).

Posterior al tiempo de incubación, se removió el medio de cultivo de las placas y se lavó cada pocillo con 400  $\mu$ L de PBS 1%, luego este fue descartado para agregar en cada pocillo 150  $\mu$ L de cristal violeta 0,2% para ser incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos, transcurrido el tiempo el cristal violeta fue descartado y se procedió a lavar cada pocillo 3 veces con 400  $\mu$ L de PBS 1%. Posteriormente la placa se llevó a microscopio invertido Lieder® para observar con aumento de 25X cualitativamente las células y fotografiando estas mismas utilizando cámara Optika® C-B3 con software LiteView®.

Para la cuantificación de la adhesión a superficie abiótica, se aplicaron 300  $\mu$ L de ácido acético 10% y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos, para remover la tinción no adherida a las células, posterior a esto, se tomó de cada pocillo 200  $\mu$ L de la solución obtenida y se llevó a una placa de 96 pocillos de fondo plano para ser leída la absorbancia a  $\lambda = 590$  nm según protocolo para ensayo de cristal violeta en lector de placas Infinite F50 Tecan®. Los resultados se expresaron como porcentaje de adhesión respecto al control. El ensayo se realizó en 5 pasajes celulares por cuadruplicado.

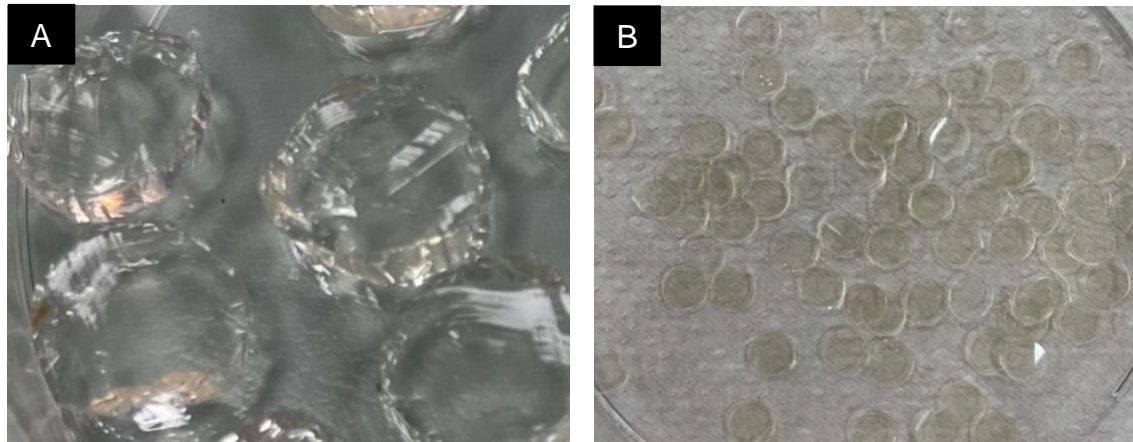
El análisis estadístico fue realizado en el software GraphPad Prism versión 10, mediante test de D`Agostino & Pearson y Shapiro-Wilks se determinó si existía una distribución Normal de los datos y luego estos fueron analizados mediante test de ANOVA de una vía, se determinó estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ .

## V. RESULTADOS

### 1. Preparación óptima del hidrogel-aceite esencial de *O. vulgare*

Se obtuvieron las soluciones homogéneas para las concentraciones estipuladas de 0% v/v y 0,5% v/v. En la solución de 0,5% v/v se logró la integración total de las fases. Posteriormente los hidrogeles ya dispuestos en los moldes antiadherentes fueron almacenados a 4 °C, logrando así la gelificación y realizar el monitoreo de pérdida de masa en los tiempos 0 h, 96 h, 120 h, 168 h y 216 h (Tabla 1), determinando de este modo cual es el tiempo de secado óptimo para la manipulación y uso de los hidrogeles.

Se obtuvo que a las 72 h los hidrogeles se encontraban gelificados, pero su manipulación era muy compleja, disgregándose al manipularlos, en este tiempo habían perdido aproximadamente el 50% de su masa inicial (Figura 8A), por lo anterior se decidió mantener las condiciones de almacenamiento de 4 °C a fin de esperar el momento óptimo para la manipulación de estos.



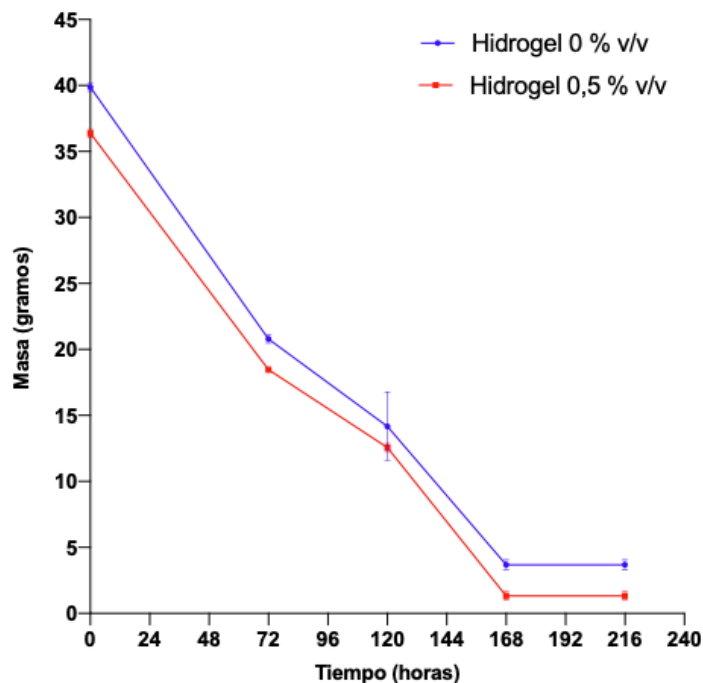
**Figura 8. Fotografías de hidrogeles en distintos tiempos ya almacenados.** A) Hidrogel 0,5% v/v con 72 h. ya cortados y almacenados. B) Hidrogel 0,5% v/v con 210 h. ya cortados y almacenados.

Se constató que los hidrogeles van perdiendo su masa en el tiempo de manera lineal, de esta forma disminuyen en aproximadamente un 15% de su masa cada 24 h, esta pérdida de masa se estabiliza a las 168 h (7 días), tiempo tal en que los hidrogeles ya han perdido aproximadamente el 90% de su masa inicial, no obstante se esperó hasta las 210 h, confirmando que no existe una pérdida de masa

significativa (Tabla 1, Figura 9); ya en este punto los hidrogeles se presentan como una lámina de consistencia firme y parcialmente rígida, con un grosor aproximado de 0,4 mm, lo cual permite su optima manipulación, siendo de este modo luego cortados uno a uno los discos uniformes mediante el uso de un perforador de tipo alicate manual marca ADIX® de 6 mm de diámetro (Figura 8B).

**Tabla 1. Masa promedio de los hidrogeles según su concentración de aceite esencial en función del tiempo.** Los valores representan el promedio de 3 experimentos distintos  $\pm$  DE.

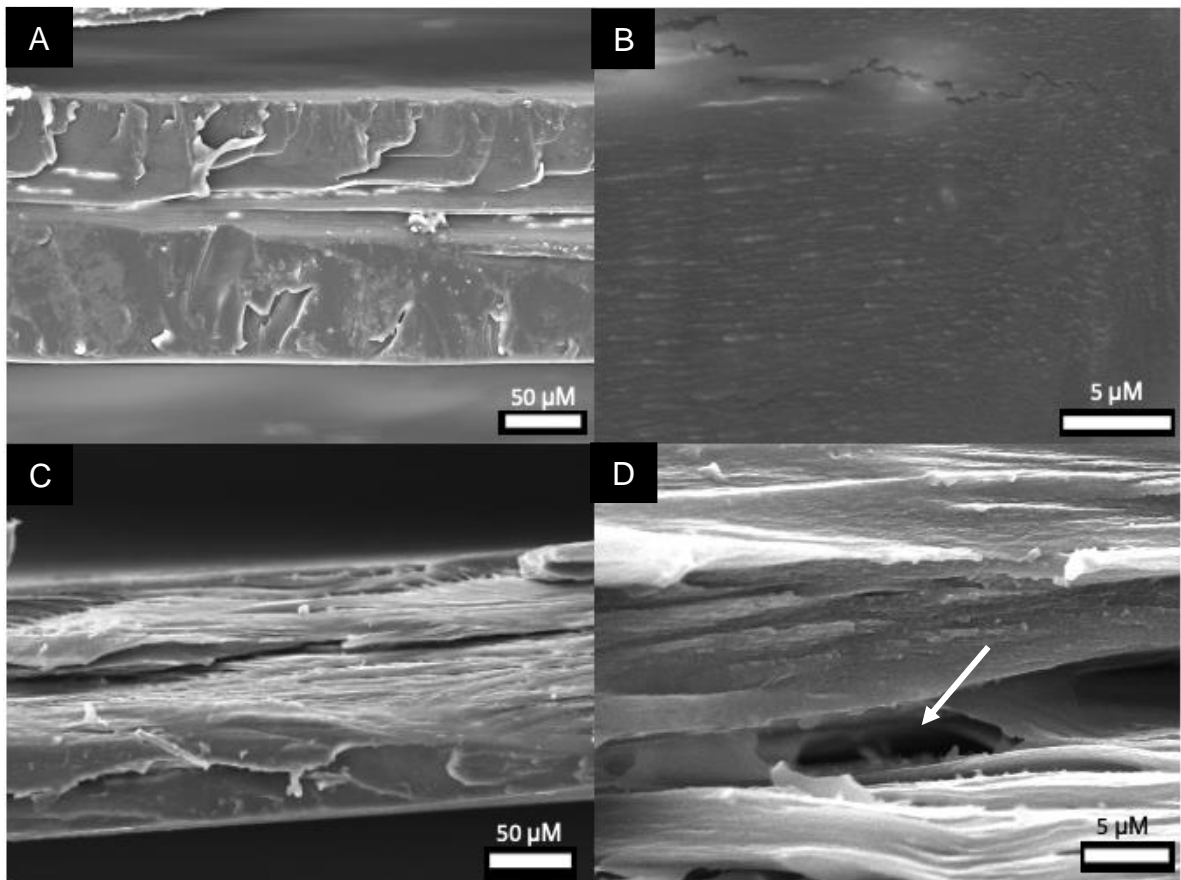
Tiempo (h)	0% v/v (g)	0,5% v/v (g)
0	39,87 $\pm$ 0,30	36,83 $\pm$ 0,31
96	20,79 $\pm$ 0,29	18,47 $\pm$ 0,15
120	14,17 $\pm$ 2,60	12,56 $\pm$ 0,33
168	3,68 $\pm$ 0,38	1,32 $\pm$ 0,34
216	3,67 $\pm$ 0,39	1,31 $\pm$ 0,35



**Figura 9. Grafica pérdida de masa en el tiempo de los hidrogeles.** Los valores representan el promedio de 3 experimentos distintos  $\pm$  DE.



Para el análisis de la superficie del hidrogel se utilizó la microscopía electrónica de barrido como se muestra en la Figura 10, en donde se constata que tanto el hidrogel 0% v/v como el hidrogel 0,5% v/v mantienen una estructura laminar, sumado a ello que en el hidrogel 0,5% v/v evidencia porosidades, las que corresponde a los espacios en el cual se incorporaría el AEO cargado en el hidrogel como se muestra en la Figura 10D, el tamaño de estos espacios en que está contenido el AEO oscila entre los 10 y 15  $\mu\text{M}$ .



**Figura 10. SEM hidrogel 0% v/v y 0,5% v/v.** A) hidrogel 0% v/v de AEO 300x. B) hidrogel 0% v/v de AEO 4300x. C) hidrogel 0,5% v/v de AEO 330x. D) hidrogel 0,5% v/v de AEO 3500x. Se indica con flecha color blanco espacio correspondiente al espacio en donde se incorporaría el AEO en el hidrogel 0,5% v/v.

La transparencia de los hidrogel fue determinada mediante la transmitancia de luz en estos a 500 nm, teniendo como 100% de transmitancia la cubeta sin ningún hidrogel, para el hidrogel 0% v/v se obtuvo un promedio de transparencia del 87,26% y un 84,36% de transparencia para el hidrogel 0,5% v/v, como se indica en

la Tabla 2. Al realizar el análisis mediante T-test se obtuvo que entre los geles 0% v/v y 0,5% v/v existió una diferencia significativa al comprar la transparencia entre estos, con un valor de P de 0,0279.

**Tabla 2. Promedio de transparencia de los hidrogeles.** Los valores representan el promedio de 3 experimentos distintos  $\pm$  DE. Se considero como diferencia significativa valor de  $p < 0,05$ (\*)

Hidrogel	Promedio Transparencia (%)
0% v/v	87,26 $\pm$ 1,01
0,5% v/v	84,36 $\pm$ 1,11*

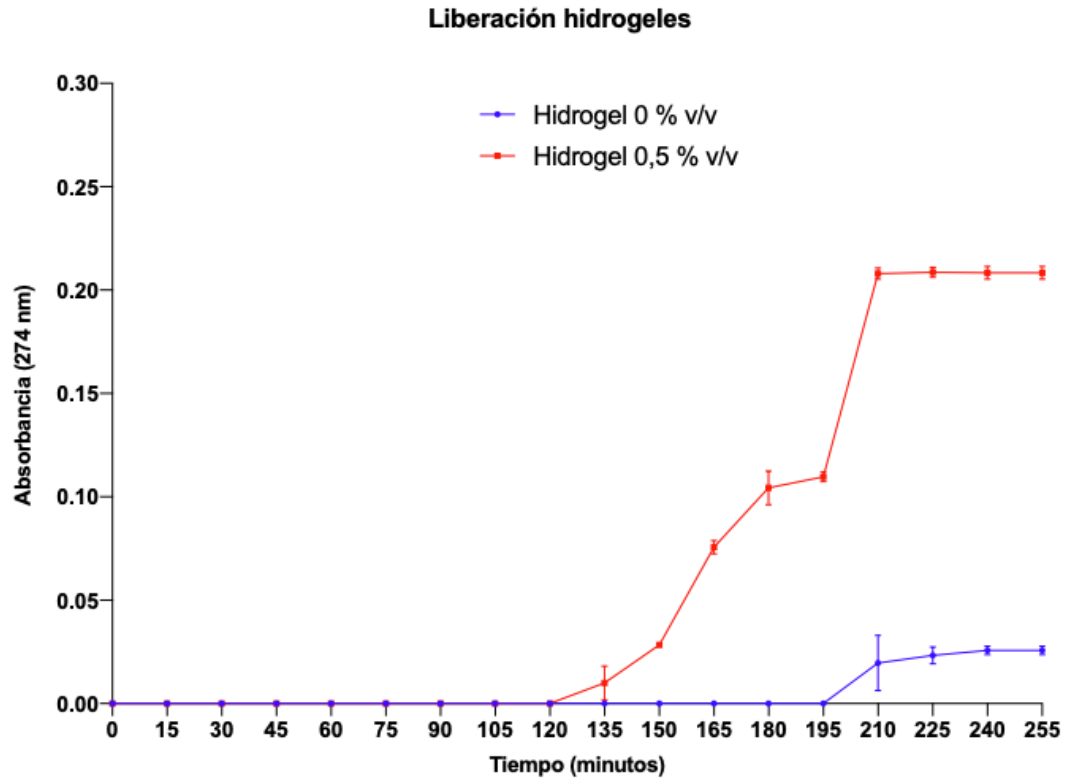
## 2. Cuantificación de aceite esencial que se libera al medio desde el hidrogel-aceite esencial en base a un periodo de tiempo específico

Para este ensayo se realizaron 3 experimentos independiente. Se dispuso de 10 discos del hidrogel 0% v/v en un volumen de 10 mL de agua destilada y 10 discos del hidrogel 0,5% v/v en 10 mL de agua destilada, para realizar la medición de absorbancia a 274 nm, longitud de onda que corresponde al punto de absorción del timol (Figura 6), se utilizó timol como sonda de seguimiento ya que este es soluble en agua y representa el 14,2% de la composición del aceite esencial de *O. vulgare*. Como blanco se utilizó una alícuota de 1500  $\mu$ L de 10 discos del hidrogel 0% v/v en 10 mL de agua destilada ya completamente disueltos.

Con respecto al hidrogel 0% v/v se obtuvo una curva de liberación que comienza con una absorbancia promedio de 0 a 274 nm en el tiempo 0 minutos y que se modela de manera lineal en 0 hasta los tiempos 195 y 210 minutos momento en el cual el gel se disuelve en el medio y la absorbancia asciende hasta 0,0196, en el tiempo 225 minutos existe una absorbancia de 0,0256, la cual se mantiene constante en el tiempo modelándose como una meseta estable. Según se muestra en la Figura 11.

Con respecto al hidrogel 0,5% v/v se obtuvo una curva de liberación que comienza con una absorbancia promedio de 0 a 274 nm en el tiempo 0 minutos y que se modela de manera lineal en 0 hasta el tiempo 135 minutos momento en el cual existe absorbancia positiva ya que el AEO liberado al medio es suficiente para ser detectado por el espectrofotómetro, ascendiendo la absorbancia a 0,01; entre los

tiempos 135 y 210 minutos existe un ascenso de absorbancia, llegando está a 0,2083, momento en el cual el gel se termina por disolver y liberar el resto de AEO cargado en este, manteniéndose luego la absorbancia constante, modelándose así como una meseta estable, lo anterior se ve reflejado en la Figura 11.

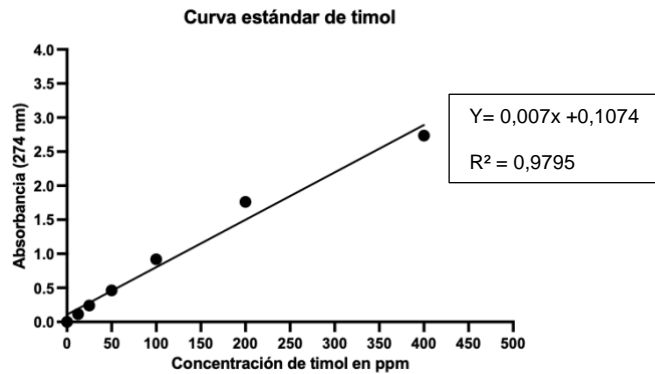


**Figura 11. Curvas de liberación para hidrogeles 0% v/v y 0,5% v/v.** Los valores representan el promedio de 3 experimentos distintos  $\pm$  DE.

Para determinar la cantidad de aceite esencial contenido en el hidrogel 0,5% v/v se utilizó la curva estándar de timol realizada en función de la absorbancia a 274 nm de distintas soluciones con una concentración expresada en ppm previamente conocida, los datos obtenidos se expresan en la Tabla 3 y la curva estándar de timol obtenida en la Figura 12, en la cual se obtuvo un valor de  $r^2$  0,9795.

**Tabla 3. Promedio de absorbancia a 274 nm de las distintas soluciones para la realización de la curva estándar de timol.** Los valores representan el promedio de 3 experimentos distintos  $\pm$  DE.

Concentración (ppm) de timol	Promedio de absorbancia a 274 nm
12,5	0,114 $\pm$ 0,0087
25	0,24 $\pm$ 0,0035
50	0,462 $\pm$ 0,0058
100	0,919 $\pm$ 0,0021
200	1,762 $\pm$ 0,0061
400	2,735 $\pm$ 0,0095



**Figura 12. Curva estándar de timol.** Se realizó a partir de 7 concentraciones conocidas de timol en agua destilada. La ecuación de la recta de la forma  $Y=0,007X+0,1074$  permitió calcular la concentración de las muestras de interés. Se reemplazó en "Y" el valor de absorbancia de cada muestra y se despejó la incógnita "X" que corresponde a la concentración.

Para determinar la cantidad de AEO se masaron en triplicado y de manera independiente 10 discos del hidrogel 0,5% v/v, de igual manera en triplicado se masó 1 disco de hidrogel 0,5% v/v, se determinó promedio y DE según se indica en la Tabla 4.

**Tabla 4. Promedio de masas para 10 discos de hidrogel 0% v/v y 0,5% v/v y 1 disco de hidrogel 0% v/v y 0,5% v/v respectivamente.** Los valores representan el promedio de 3 experimentos distintos  $\pm$  DE.

	Masa (g) 10 discos de hidrogel/AEO	Masa (g) de 1 disco de hidrogel/AEO
0% v/v	0,071 $\pm$ 0,006	0,007 $\pm$ 0,001
0,5% v/v	0,066 $\pm$ 0,004	0,006 $\pm$ 0,001

Con el valor de absorbancia obtenido para el ensayo de liberación de los 10 discos de hidrogel 0,5% v/v a los 255 minutos (0,2083), se interpola en la curva estándar de timol mediante el despeje en la ecuación de la recta  $Y=0,007x + 0,1074$ , según se indica a continuación

$$0,2083 = 0,007x + 0,1074$$

$$x = \frac{0,20833 - 0,1074}{0,007}$$

$$x = 14,41 \text{ ppm de timol en 10 discos } 0,5\% \text{ v/v}$$

Para conocer la cantidad de timol promedio contenido en 1 disco se utilizó el promedio de masa de 1 disco, el promedio de masa de 10 discos y la concentración de timol contenido en 10 discos previamente obtenida, según la formula

$$[\text{timol en 1 disco}] = \frac{\text{masa de 1 disco} \times [\text{timol en 10 discos}]}{\text{masa de 10 discos}}$$

$$[\text{timol en 1 disco}] = \frac{0,006 \times [14,41]}{0,066}$$

$$[\text{timol en 1 disco}] = 1,31 \text{ ppm de timol en 1 disco } 0,5\% \text{ v/v}$$

Conocida la concentración de timol promedio existente en 1 disco 0,5% v/v se determinó la cantidad total de AEO contenido en un disco 0,5% v/v, conociendo que el 14,2% del AEO está representado por timol, se calculó según la siguiente formula

$$[\text{AEO}] = \frac{100\% \times [\text{timol 1 disco}]}{14,2\%}$$

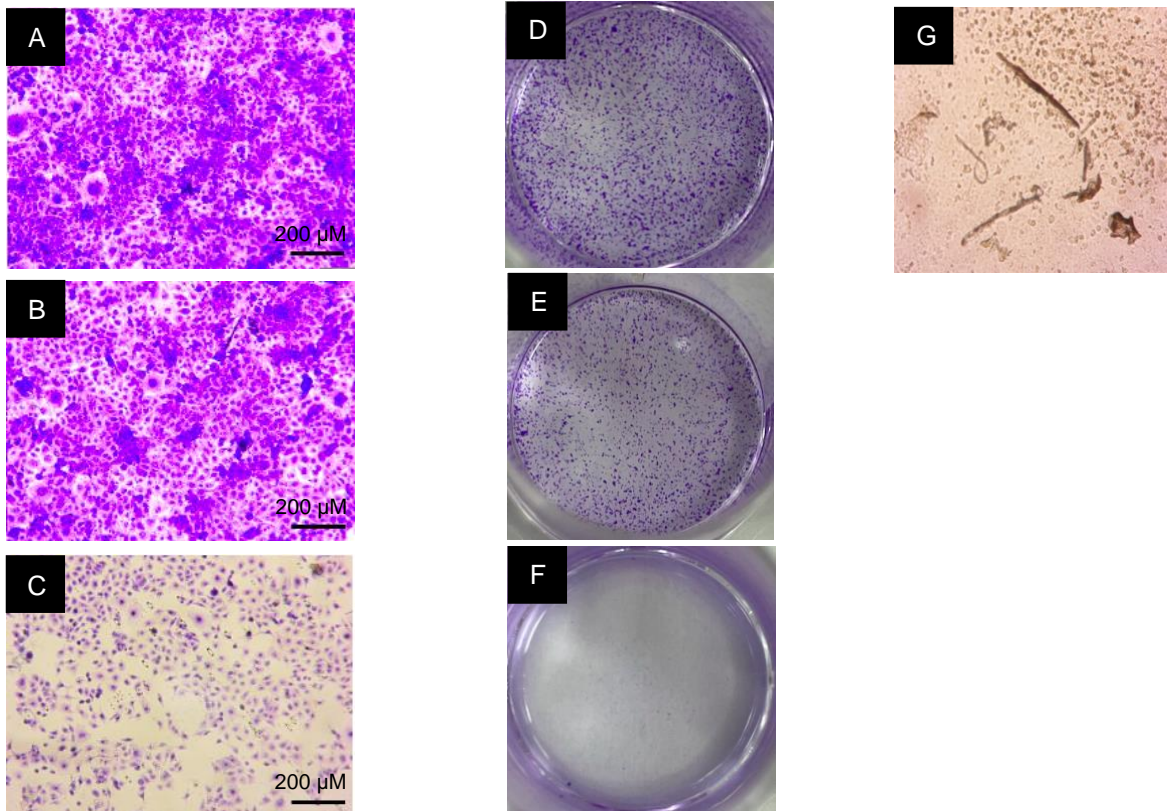
$$[\text{AEO}] = \frac{100\% \times [1,31]}{14,2\%}$$

$$[\text{AEO}] = 9,22 \text{ ppm de AEO por disco } 0,5\% \text{ v/v}$$

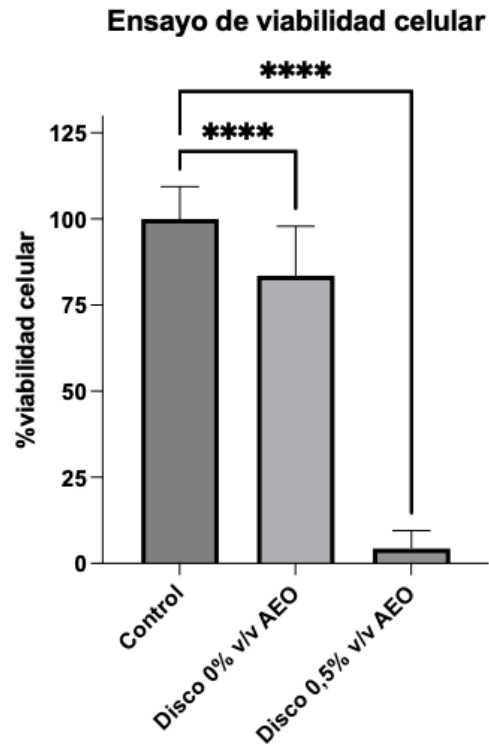
Se obtuvo así que cada disco 0,5% v/v contiene 9,22 ppm de AEO.

### 3. Estudio cualitativo la citotoxicidad generada por el hidrogel-aceite esencial sobre líneas celulares de CAL-27

Para determinar la citotoxicidad de los hidrogeles en estudio sobre cultivos celulares de CAL-27, se realizó un análisis de la citotoxicidad mediante aplicación de los hidrogeles 0% v/v y 0,5% v/v y posterior tinción con cristal violeta de las células viables adheridas a los pocillos.



**Figura 13. Fotografías microscópicas y macroscópicas de los cultivos celulares.** A) fotografía pocillo control con tinción de cristal violeta, aumento 25x. B) fotografía pocillo tratado con hidrogel 0% v/v con tinción de cristal violeta, aumento 25x, C) fotografía pocillo tratado con hidrogel 0,5% v/v con tinción de cristal violeta, aumento 25x, D) fotografía pocillo control con tinción de cristal violeta, E) fotografía pocillo tratado con hidrogel 0% v/v con tinción de cristal violeta, F) fotografía pocillo tratado con hidrogel 0,5% v/v con tinción de cristal violeta, G) fotografía pocillo tratado con hidrogel 0% v/v sin tinción de cristal violeta, se observan trazas del hidrogel.



**Figura 14. Porcentaje viabilidad celular luego de 24 h. de tratamiento con los hidrogeles.** La grafica representa el promedio  $\pm$  DE de 5 experimentos independientes. \*\*\*\* P <0,0001 vs Control.

Es así como el hidrogel 0% v/v genera un efecto en la viabilidad celular disminuyéndola en un  $16,5\% \pm 14,3\%$  y el hidrogel 0,5% v/v genera un marcado efecto en la viabilidad celular disminuyéndola en más de un  $95\% \pm 5,3\%$ .

## VI. DISCUSIÓN

La obtención del aceite esencial de *O. vulgare* mediante arrastre por vapor es uno de los métodos óptimos para la obtención del aceite esencial en especial de *O. vulgare*, más aún cuando la muestra vegetal utilizada está seca (Aziz y cols., 2018). En nuestro estudio, utilizando este método se obtuvo un rendimiento de aproximadamente 2 ml de AEO, con un tiempo de extracción de 90 minutos desde la ebullición del agua, lo cual se condice con otro estudio en el cual se utilizó el mismo método y obtuvo un rendimiento de aproximadamente 2,5 ml de AEO con un tiempo de extracción de 180 minutos el cual incluye el tiempo previo a la ebullición del agua (Cid-Chevecich y cols., 2022).

Como indica la evidencia, la composición de los aceites esenciales de cada planta van a estar condicionados por múltiples factores tanto bióticos como abióticos, es por ello se decidió obtener la muestra vegetal en la temporada de primavera, época en la cual ocurre la floración, en consecuencia, se espera una mayor concentración de sustancias en el aceite producido por las plantas (Božović y cols., 2017; Olayemi, 2017).

Al analizar la composición del aceite obtenido este es muy similar a lo reportado en la literatura. Simirgiotis y cols. (2020), caracterizaron AEO obtenido de las zonas altiplánicas áridas del norte de Chile, identificando que timol era el mayor componente de su aceite esencial con un 15,9%, concordante con el AEO utilizado en este estudio, en el cual timol representa el 14,2%. Con respecto al cis-sabieno hidrato se identificó como segundo componente mayoritario con un 13,4%, mientras que nuestro AEO tiene como componente mayoritario a cis-sabieno hidrato con un 16,2%.

Plati y cols. 2021, caracterizaron de igual manera AEO proveniente de un laboratorio de Alemán, identificaron como componente mayoritario al carvacrol, seguido de timol, de este modo al igual que en nuestro AEO timol fue el segundo componente con mayor presencia. Bora y cols. 2022, al caracterizar su aceite obtuvieron que timol y carvacrol eran los componentes con mayor presencia.



Se ha reportado que el aceite esencial de *O. vulgare* posee múltiples propiedades antioxidantes, antifúngicas, antiparasitarias, antibacterianas y citotóxicas (Sakkas y Papadopoulou 2017; Aziz y cols. 2018; Donato y cols. 2020; Aebisher y cols. 2021), es por esta razón que se planteó en este trabajo estudiar su actividad citotóxica sobre una línea celular de cáncer oral. Anteriormente en estudios publicados ha sido evaluado el aceite esencial de *O. majorana*, especie originaria de la costa oriental del Mediterráneo, planta de la misma familia de *O. vulgare* sobre líneas celulares de cáncer de pulmón, probando tanto *in vitro* como *in vivo* que este aceite disminuye el crecimiento y la metástasis tumoral (Arafat y cols. 2022). Athamneh y cols. (2020) probaron *O. majorana* sobre cáncer colorrectal evidenciando *in vitro* la inducción de la apoptosis, en concomitancia un estudio probó una nanoemulsión de *O. vulgare in vitro* sobre líneas celulares de cáncer de próstata, obteniendo como resultado, la inducción de apoptosis celular (Perumalsamy y cols., 2022). No obstante lo anterior, hasta la fecha no se encontraron estudios publicados sobre el uso de aceite esencial de *O. vulgare* y cáncer oral, lo cual justifica el estudio sobre este aceite esencial y su efecto sobre el cáncer oral.

### **1. Preparación óptima del hidrogel-aceite esencial de *O. vulgare***

Para la elaboración del hidrogel se utilizó como base el protocolo publicado por Scartazzini y cols. 2019, con modificaciones, dentro de estas podemos mencionar que para este estudio la disolución de la gelatina fue a 90 °C y no a 20 °C como indica el autor anteriormente señalado; esto porque así se logró una mejor homogeneidad en la solución, integrándose de mejor manera la gelatina, evitando así la formación de un precipitado de gelatina sin integrarse.

Tampoco se agregó plastificante como por ejemplo glicerol, para de esta forma tener menos componentes en el hidrogel, reducir pasos críticos para su elaboración y reducir costos. No obstante, el no tener plastificante en la formulación supone una dificultad en su manipulación, ya que, está se torna más compleja, porque lograda la gelificación estamos frente a un hidrogel que se rompe y disgrega al manipularlo. Esto hace sumamente difícil de cortar en tamaños pequeños, quedando bordes

irregulares y su almacenamiento es muy complejo, además de ser lábil a la temperatura, ya que al exponerlo a temperaturas mayores a la temperatura ambiente este se comienza a disgregar. Por esta razón, se tomó la decisión de dejarlo secar a 4°C través de la pérdida de humedad en el tiempo, logrando determinar así que a los 7 días se lograba una lámina de hidrogel la cual fue fácil de trabajar, manipular y almacenar. La pérdida de humedad fue constante en el tiempo hasta el día 7. Se concluyó así que no hay una pérdida de masa significativa que hiciera pensar que es necesario un tiempo mayor a los 7 días en las condiciones indicadas para la manipulación y posterior uso de los hidrogeles, por ello todos los hidrogeles utilizados para este estudio fueron utilizados luego de 7 días de elaborados.

Para el estudio morfológico del hidrogel se utilizó SEM, en donde al observar las imágenes se constata que los hidrogeles mantienen una estructura laminar al ver en un aumento de entre los 3000x y 4000x, lo cual se condice con la literatura en la cual un autor estudió los hidrogeles indicando que estos mantienen una estructura laminar al encontrarse deshidratados (Kumar, 2020). Con respecto al tamaño de los poros o espacios del AEO incluido en el hidrogel se obtuvo tamaños que variaban entre los 10  $\mu\text{m}$  y 15  $\mu\text{m}$ , los cuales se distribuían de manera uniforme en toda la extensión del hidrogel. Al compararlo con la literatura se constató que otros autores reportan tamaño de poros entre los 5  $\mu\text{M}$  y 18  $\mu\text{M}$ , los cuales también se distribuyeron de manera homogénea en todo el hidrogel (Martucci y cols., 2015; Scartazzini y cols., 2019). Por otro lado el porcentaje de transmitancia obtenido en el hidrogel 0,5% v/v fue menor respecto del hidrogel 0% v/v, lo cual nos indica que el aceite está presente en el hidrogel. Al comparar nuestros datos con la literatura estos se condicen ya que Tongnuachan y cols. (2014, 2015) al probar aceite esencial de citronella y aceite de palma, obtuvieron que a mayor concentración de aceite menor fue la transmitancia, situación que ocurre de igual manera en nuestro estudio.

## **2. Cuantificación de aceite esencial que se libera al medio desde el hidrogel-aceite esencial en base a un periodo de tiempo específico**

Si bien el mayor componente del aceite esencial de *O. vulgare* obtenido fue cis-sabieno hidrato con un 16,2%, en segundo lugar, con mayor presencia encontramos el timol con un 14,2%; se decidió utilizar al timol como molécula de seguimiento o marcador en todos los ensayos realizados, esto ya que es soluble en agua destilada, el cual es un medio de fácil acceso y se disponía de timol puro en el laboratorio para realizar los ensayos respectivos. Se decidió realizar los ensayos con 10 discos de 6 mm en un volumen de 10 mL de agua destilada, ya que creemos 1 disco no sería representativo y la cantidad de AEO cargado en este y por ello de timol sería difícil de seguir. Para este ensayo descubrimos que el hidrogel formulado en un inicio sufre un proceso de rehidratación, en el cual mantiene su forma de disco, pero este se hincha, para luego comenzar a disgregarse y disolverse en el medio. Esto hizo necesario el uso de la centrifuga, ya que al realizar las lecturas en espectrofotómetro antes de utilizar la centrifuga se obtenían valores muy disímiles y sin ninguna tendencia, esto porque al observar la cubeta de cuarzo cargada con la solución en estudio veíamos múltiples fragmentos del hidrogel en proceso de disgregarse y antes de solubilizarse completamente, por lo cual al pasar el haz de luz del espectrofotómetro arrojaba valores alterados, por ello mediante el centrifugado y posterior medición solo del sobrenadante logramos sortear este problema, obteniendo así valores que si indicaban una tendencia esperada.

Al observar el grafico para la curva de liberación del disco 0% v/v de AEO y como indica su nombre sin carga de AEO podemos constatar que en un inicio los valores de absorbancia a 274 nm son 0, hasta los 210 minutos en el cual el gel se encuentra disuelto y hay una absorbancia de 0,01966, ya a los 255 minutos la absorbancia fue de 0,02566. Si bien era esperable que la absorbancia fuera 0, ya que, el blanco fue una alícuota de 1500  $\mu$ L de 10 discos 0% v/v en un volumen de 10 mL de agua destilada completamente disuelto, está fue muy cercana a cero y se tomó como una diferencia tolerable.

Con respecto a los discos 0,5% v/v en su curva de liberación constatamos que de igual manera, los valores de absorbancia comienzan a aumentar luego de 135 minutos, donde la cantidad de AEO es suficiente para ser detectada por el espectrofotómetro. Cabe destacar que en el tiempo entre los 195 y 210 minutos existe un ascenso brusco en la curva, esto dado que en este transcurso del tiempo termina de solubilizarse completamente el hidrogel y así liberándose todo el AEO al medió. Todo lo anterior se condice con lo reportado en la literatura en el cual autores de igual manera obtienen un régimen de ascenso lineal en la concentración del fármaco en estudio y luego una meseta que representa la concentración máxima alcanzada, lo cual nos habla de la capacidad de liberación controlada del hidrogel (Gao y cols,2016; Puiggalí-Jou y cols. 2020; Yan y cols. 2023).

### **3. Estudio cualitativo de la citotoxicidad generada por el hidrogel-aceite esencial sobre líneas celulares de CAL-27**

En este estudio experimental *in vitro* se utilizaron cultivos celulares de carcinoma escamoso de lengua humano CAL-27 resistentes a Cisplatino, fármaco que representa la quimioterapia clásica para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello (Head y cols., 2015; Shi y cols., 2017). Como indica la literatura durante la muerte celular las células adherentes en cultivo se desprenden del fondo de la placa de cultivo. Esta característica se puede usar para la cuantificación indirecta de la muerte celular y para determinar las diferencias en la proliferación tras la estimulación con agentes que inducen la muerte celular. Un método simple para detectar la adherencia mantenida de las células es la tinción con colorante cristal violeta, el cual interactúa con las proteínas y el ADN celular. Por lo tanto, las células que sufren muerte celular pierden su adherencia y posteriormente en el proceso de tinción se pierden esta población de células, reduciendo así la cantidad de tinción que será cuantificada. Esta tinción es entonces un método de detección rápido y confiable que es adecuado para el estudio del impacto de los agentes quimioterapéuticos y otros compuestos que pretenden interferir sobre la supervivencia celular y la inhibición del crecimiento, en suma, la tinción con cristal

violeta es un ensayo rápido para evaluar la viabilidad celular bajo diversas condiciones de estimulación (Geserick y cols. 2009; Checa 2018).

Así es como al obtener en un pocillo una mayor coloración se entiende que existía una directa proporción en la cantidad de células viables, por lo que al observar de manera cualitativa los pocillos el pocillo control (Figura 13A) tiene mayor coloración que el pocillo tratado con hidrogel 0% v/v (Figura 13B) y este último mayor coloración que el pocillo tratado con hidrogel 0,5% (Figura 13C). Del mismo modo ocurre al hacer el análisis en las fotografías a nivel microscópico en que en la Figura 13D se constata una gran densidad celular, mientras que en la Figura 13E correspondiente al hidrogel 0% v/v la densidad celular es un poco menor que la anterior. Por último, al observar la Figura 13F vemos una mínima densidad celular respecto a las anteriores. Morfológicamente las células de la Figura 13C correspondientes al pocillo tratado con hidrogel 0,5% v/v se ven más pequeñas, de límites menos definidos y menos agrupadas que las células de los pocillos control y pocillo tratado con el hidrogel 0% v/v.

Respecto del efecto del hidrogel sin AEO sobre la viabilidad, no se encontró evidencia alguna que la gelatina genere algún efecto citotóxico. De hecho, la etiqueta de seguridad del producto indica una DL50 mayor a los 5000 mg/kg para ratas (Sigma-Aldrich. 2022) y en el caso del Tween®80, la etiqueta de seguridad del producto en la cual se indica una DL50 mayor a los 34500 mg/kg para ratas (Sigma-Aldrich. 2022). Todo lo anterior nos hace pensar que el efecto observado, responde a un fenómeno físico en el cual el disco de hidrogel afecta la cantidad de espacio disponible para fijarse las células o interfiere en la unión de estas, ya que al analizar las placas al microscopio previo al lavado y a la aplicación de la tinción con cristal violeta encontramos trazas del gel en el pocillo (Figura 13G).

En la literatura publicada no existen datos sobre dosis de AEO necesaria para generar el efecto citotóxico, pero si hay publicaciones que indican la dosis de timol que generó algún efecto sobre las líneas celulares que aquellos autores estudiaron. Al respecto, sobre una línea celular de cáncer gástrico 50  $\mu\text{M}$  de timol generan un efecto proapoptótico, mientras que concentraciones entre 20 $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  inducen

un daño directo al ADN (Kowalczyk y cols., 2020). Otros autores indican que en líneas celulares de CAL-27 se obtuvo una  $IC_{50}$  de 300  $\mu M$  de timol (De La Chapa y cols. 2018); nuestro hidrogel está cargado con 196  $\mu M$  de timol en cada disco 0,5% v/v, si bien en este trabajo no se determinó  $IC_{50}$ , es posible que al utilizar el hidrogel como vehículo se requiere de una menor concentración de timol y por ello del AEO para conseguir el efecto terapéutico deseado. Además, cabe recordar que los aceites esenciales tienen variados componentes, los cuales pueden tener efecto sinérgico, explicando por qué se obtuvo un efecto a concentraciones menores cuando normalizamos respecto a timol.

En resumen, los datos presentados en este trabajo indican que el hidrogel preparado puede ser una opción para la entrega de aceites esenciales, de manera sostenida en el tiempo y con efecto citotóxico sobre células de cáncer oral. Estos resultados son la punta de lanza para seguir evaluando y probando estos hidrogeles cargados con aceite esencial en diversas situaciones como podría ser la prueba sobre cultivos tridimensionales, prueba sobre cultivos sometidos a hipoxia y así lograr determinar concentraciones inhibitorias y también conocer a futuro las vías por las cuales este AEO está actuando sobre las células.

Es relevante buscar día a día nuevas herramientas y formas de enfrentar el cáncer, dado que su incidencia y prevalencia va en aumento a nivel mundial y a pesar de esto no es de conocimiento entre la población y en consecuencia su diagnóstico es escaso y tardío, más aún en el cáncer oral. No debemos olvidar que como futuros odontólogos tenemos una tarea pendiente en lo que respecta a educación, diagnóstico y tratamiento de esta patología. Nuestro rol como cirujanos dentistas es estar atento ante cualquier indicio o lesión potencialmente maligna, informar y educar a nuestros pacientes sobre los factores de riesgo y detecciones de lesiones sospechosas, que nos permitan realizar un diagnóstico temprano y prevenir así las terribles consecuencias de esta enfermedad.

## VII. CONCLUSIÓN

El vehículo generado correspondiente al hidrogel demostró ser un método efectivo y eficaz para el transporte de AEO y su posterior liberación controlada en el tiempo, además siguiendo los protocolos su producción no es compleja y es susceptible de recibir modificaciones como el fármaco a utilizar o la concentración de este que se desea probar, por lo cual podemos indicar que son fácilmente modificables.

En este trabajo se estableció que la aplicación de hidrogeles cargados con AEO evidencian un efecto citotóxico sobre el cultivo plano de CAL-27, esto mediante la disminución de la viabilidad celular, por ello podemos decir que estos resultados son preliminares, pero prometedores y nos entregan los lineamientos para poder realizar más pruebas a futuro, ya sea en cultivos sometidos a hipoxia, cultivos tridimensionales, en combinatoria con otros fármacos, de esta forma ir probando estos hidrogeles para lograr en algún momento si se sortean de manera favorable todas las fases previas realizar pruebas en modelos *in vivo* sobre el desempeño de estos hidrogeles.

Si bien es cierto se necesitan realizar más estudios, este es el primero en utilizar este tipo de hidrogeles como vehículo para el aceite esencial, por lo tanto, se abre la puerta a muchas posibilidades en la búsqueda de fármacos y/o uso de otros aceites esenciales que mejoren la calidad de vida y supervivencia de los pacientes diagnosticados con cáncer oral.

## VIII. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Para este estudio se utilizó agua destilada en los ensayos de liberación del hidrogel, no obstante, creemos sería interesante realizar estas pruebas en saliva artificial, ya que a futuro esperamos estos hidrogeles puedan ser usados en el territorio oral, de esta manera así conocer si existe alguna influencia de la composición de este medio versus el agua para la liberación del AEO contenido en los hidrogeles.

Con respecto a los hidrogeles utilizados estos no tenían más de dos semanas de elaborados, pero desconocemos que comportamiento tienen estos al utilizarlos con más tiempo de almacenados, a fin de determinar si con el paso del tiempo el AEO se mantiene estable en el tiempo al interior del hidrogel o este se va perdiendo en el tiempo y por ello su efectividad.

Respecto de los ensayos de viabilidad celular, la concentración inhibitoria semimáxima ( $IC_{50}$ ) es la medida más ampliamente utilizada e informativa de la potencia de un fármaco, ella nos indica la concentración del medicamento necesaria para inhibir un proceso biológico en un 50%, entregando así la medida de la potencia de un medicamento antagonista en la investigación farmacológica (Aykul y Martinez-Hackert, 2016). No obstante, este ensayo es del tipo cualitativo y sería de suma importancia en una segunda fase de este estudio poder realizar los ensayos cuantitativos respectivos para continuar con el proceso de investigación sobre el uso del AEO cargado los hidrogeles.

Es importante destacar también la necesidad de realizar la prueba de estos hidrogeles en líneas celulares normales, a fin de determinar si los hidrogeles de igual manera como ocurre con la línea celular de CAL-27 producen o no un efecto citotóxico, así también probar en otras líneas celulares de cáncer oral cual es el comportamiento que estas evidencian al ser expuestas a los hidrogeles formulados.



## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aebisher, D., Cichonski, J., Szpyrka, E., Masjonis, S., Chrzanowski, G. (2021). Essential Oils of Seven Lamiaceae Plants and Their Antioxidant Capacity. *Molecules*. 26(13):3793.

American Cancer Society. (2021). Cómo funcionan los medicamentos de quimioterapia. <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-funcionan-los-medicamentos-de-quimioterapia.html> (27/07/2021).

Arafat, K., Sulaiman, S., Al-Azawi, AM., Yasin, J., Sugathan, S. y cols. (2022). Origanum majorana essential oil decreases lung tumor growth and metastasis in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother*. 155:113762.

Araya, C. (2018). Diagnóstico precoz y prevención en cáncer de cavidad oral. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 29(4):411 - 418.

Asbahani, A., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, EHA. y cols. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 483(1–2):220 - 243.

Athamneh, K., Alneyadi, A., Alsamri, H., Alrashedi, A., Palakott, A. y cols. (2020). Origanum majorana Essential Oil Triggers p38 MAPK-Mediated Protective Autophagy, Apoptosis, and Caspase-Dependent Cleavage of P70S6K in Colorectal Cancer Cells. *Biomolecules*. 10(3):412.

Aykul, S. y Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical Biochemistry*. (508):97 - 103.

Aziz, ZAA., Ahmad, A., Setapar, SHM., Karakucuk, A., Azim, MM. y cols. (2018). Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. *Curr Drug Metab.* 19(13):1100 - 1110.

Bayala, B., Bassole, IH., Gnoula, C., Nebie, R., Yonli, A. y cols. (2014). Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso. *PLoS One.* 9(3):e92122.

Bialon, M., Krzysko-Lupicka, T., Nowakowska-Bogdan, E., Wieczorek, PP. (2019). Chemical Composition of Two Different Lavander Essential Oils and Their Effect on Facial Skin Microbiota. *Molecules.* 24(18):3270.

Bora, L., Burkard, T., Juan, MHS., Radeke, HH., Mut, AM. y cols. (2022). Phytochemical Characterization and Biological Evaluation of *Origanum vulgare L.* Essential Oil Formulated as Polymeric Micelles Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics.* 12(11):2413.

Boruga, O., Jianu, C., Misca, C., Golet, I., Gruia A.T. y cols (2014). Thymus vulgaris essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of medicine and life.* 3(3):56 - 60.

Božović, M., Navarra, A., Garzoli, S., Pepi, F., Ragno, R. (2017). Essential oils extraction: a 24-hour steam distillation systematic methodology. *Natural Product Research,* 31(20):2387 - 2396.

Browning, RJ., Reardon, PJT., Parhizkar, M., Pedley, RB., Edirisinghe, M. y cols. (2017). Drug Delivery Strategies for Platinum-Based Chemotherapy. *ACS Nano.* 11(9):8560 - 8578.

Candia, J., Fernández, A., Somarriva, C., Horna-Campos, O. (2018). Deaths due to oral cancer in Chile in the period 2002-2012. *Revista Medica de Chile.* 146(4):487 - 493.

Catalán, M., Rodríguez, C., Olmedo, I., Carrasco-Rojas, J., Rojas, D. y cols. (2020). Kaempferol induces cell death and sensitizes human head and neck squamous cell carcinoma cell lines to cisplatin. *Cell Biology and Translational Medicine*. 12:95 - 109.

Cha, JD. y Kim, JY. (2012). Essential oil from *Cryptomeria japonica* induces apoptosis in human oral epidermoid carcinoma cells via mitochondrial stress and activation of caspases. *Molecules*. 17(4):3890 - 3901.

Chang, WL., Cheng, FC., Wang, SP., Chou, ST., Shih, Y. (2017). Cinnamomum cassia essential oil and its major constituent cinnamaldehyde induced cell cycle arrest and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells. *Environmental Toxicology*. 32(2):456 - 468.

Checa-Rojas, A. (2018). Tinción de cristal violeta (0,5%) en cultivos de células adherentes. *Conogasi, conocimiento para la vida*. 2(1).

Chronopoulos, A., Zarra, T., Ehrenfeld, M., Otto, S. (2018). Osteoradionecrosis of the jaws: definition, epidemiology, staging and clinical and radiological findings. A concise review. *International Dental Journal*. 68(1):22 - 30.

Cid-Chevecich, C., Müller-Sepúlveda, A., Jara, JA., Lopez-Muñoz, R., Santander, R. y cols. (2022). *Origanum vulgare L.* essential oil inhibits virulence patterns of *Candida* spp. and potentiates the effects of fluconazole and nystatin in vitro. *BMC Complement Med Ther.* (22), 39.

Coughlin, SS. (2019). Social determinants of breast cancer risk, stage, and survival. *Breast cancer research and treatment*. 177(3):537 - 548.

Coughlin, SS. (2020). Social determinants of colorectal cancer risk, stage, and survival: a systematic review. *Journal of colorectal disease*. 35(6):985 - 995.

Dasari S. y Tchounwou PB. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 740:364 - 78.

De La Chapa JJ, Singha PK, Lee DR, Gonzales CB. (2018). Thymol inhibits oral squamous cell carcinoma growth via mitochondria-mediated apoptosis. *J Oral Pathol Med.* 47(7):674 - 82.

Departamento de Estadísticas e Información de Salud. Anuario defunciones de DEIS. [https://public.tableau.com/app/profile/deis4231/viz/Anuario\\_Defunciones/Defunciones](https://public.tableau.com/app/profile/deis4231/viz/Anuario_Defunciones/Defunciones) (10/12/2021).

Donato, R., Sacco, C., Pini, G., Bilia, AR. (2020). Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species. *J Ethnopharmacol.* 249:112376.

Farrar, AJ. y Farrar FC. (2020). Clinical Aromatherapy. *The Nursing clinics of North America.* 55(4):489 - 504.

Gao, W., Zhang, Y., Zhang, Q., Zhang, L. (2016). Nanoparticle-Hydrogel: A Hybrid Biomaterial System for Localized Drug Delivery. *Annals of biomedical engineering.* 44(6):49 - 61.

Geserick, P., Hupe, M., Moulin, M., Wong, WW., Feoktistova, M. y cols. (2009). Cellular IAPs inhibit a cryptic CD95-induced cell death by limiting RIP1 kinase recruitment. *J Cell Biol.* 187(7):37- 54.

González Escobar, Raimara. (2002). Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Revista Cubana de Estomatología.* 39(2):139 - 156.

Gupta, B., Johnson, NW., Kumar, N. (2016). Global Epidemiology of Head and Neck Cancers: A Continuing Challenge. *In Oncology (Switzerland).* 91(1):13 - 23.

Hausman, DM. (2019). What Is Cancer?. *Perspect Biol Med.* 62(4):778 - 784.

Head, S., Shi, W., Zhao, L., Gorshkov, K., Pasunooti, K. y cols. (2015). Antifungal drug itraconazole targets VDAC1 to modulate the AMPK/mTOR signaling axis in endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 112(52):7276 - 7285.

Huang Q., Zou, Y., Arno, M.C., Chen, S., Wang, T. y cols. (2017). Hydrogel scaffolds for differentiation of adipose-derived stem cells. *Chemical Society reviews.* 46(20):6255 - 6275.

Islam, MT., Khalipha, ABR., Bagchi, R., Mondal, M., Smrity, S. y cols. (2019). Anticancer activity of thymol: A literature-based review and docking study with emphasis on its anticancer mechanisms. *IUBMB Life.* 71(1):9 - 19.

Jo, JR., Park, JS., Park, YK., Chae, YZ., Lee, GH. y cols. (2012). Pinus densiflora leaf essential oil induces apoptosis via ROS generation and activation of caspases in YD-8 human oral cancer cells. *International Journal of Oncology.* 40(4):1238 - 1245.

Kim, D. y Li, R. (2019). Contemporary Treatment of Locally Advanced Oral Cancer. In *Current Treatment Options in Oncology.* 20(4).

Kodadová, A., Vitková, Z., Herdová, P., Ažký, A., Oremusová, J. y cols. (2015). Formulation of sage essential oil (*Salvia officinalis*, L.) monoterpenes into chitosan hydrogels and permeation study with GC-MS analysis. *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 41(7):1080 - 1088.

Kodadová, A., Vitková, Z., Oremusová, J., Herdová, P., Tazký, A. y cols. (2017). Simultaneous formulation of terbinafine and salvia monoterpenes into chitosan hydrogel with testing biological activity of corresponding dialysates against C.

albicans yeast. Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences. 72(1–2):63 - 69.

Kowalczyk,A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., Fecka, I. (2020). Thymol and Thyme Essential Oil - New Insights into Selected Therapeutic Applications. Molecules, 25(18).

Kumar, S. (2020). Hydrogels. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.

LI, Y. y Hecht, SS. (2022). Carcinogenic components of tobacco and tobacco smoke: A 2022 update. Food Chemical Toxicology. 165:113179.

Liang, Y., He, J., Guo, B. (2021). Funcional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing. ACS Nano. 15(8):12687 - 12722.

Llorens-Molina, J. (2021). Los aceites esenciales y su actividad biológica. Una propuesta didáctica. Anales de la Química. 117(2):165 - 170.

Maraboli-Contreras, S., Adorno-Farias, D., Maturana-Ramirez, A., Rojas-Alcayaga, G., Fuentes-Alburquenque, M. y cols. (2018). Sobrevida de carcinoma oral de células escamosas: reporte de la Universidad de Chile. Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral. 11(3):147 - 151.

Martucci, JF., Gende, LB., Neira, LM., Ruseckaite, RA. (2015). Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. Ind Crops Prod. 71:205 - 213.

Matulyte, I., Marksa, M., Bernatoniene, J. (2021). Development of Innovative Chewable Gel Tablets Containing Nutmeg Essential Oil Microcapsules and Their Physical Properties Evaluation. Pharmaceutics, 13(6).

Ministerio de Salud. (2016). Estrategia Nacional de Cáncer. Estrategia Nacional de Cancer. <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2016/10/Estrategia-Nacional-de-Cancer-version-consulta-publica.pdf> (12/06/2021)

Moghaddam, M. y Mehdizadeh, L. (2017). Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. *Soft Chemistry and Food Fermentation*. 1:379 - 419.

Montero, PH. y Patel, SG. (2015). Cancer of the Oral Cavity. In *Surgical Oncology Clinics of North America*. 24(3):491 - 508.

Muñoz, A. y Ferrero, C. (2020). Sistemas de liberación controlada de fármacos obtenidos por impresión 3D. Mecanismos de liberación y factores que influyen. Universidad de Sevilla.

Obrist, F., Michels, J., Durand, S., Chery, A., Pol, J. y cols.(2018). Metabolic vulnerability of cisplatin-resistant cancers. *EMBO J*. 37(14):e98597.

Olayemi, RF. (2017). The Role of Monoterpenoids and Sesquiterpenoids as defense Chemicals in Plants – a Review | University of Nigeria, Nsukka Open Education Resources (OER). *Nigerian Research Journal of Chemical Sciences*. 3:1 - 15.

Oltarzhevskaya, ND., Kirichenko, IM., Khar`kova, NA., Frolov, SV. (2018). The application of the hidrogel-based medicinal compositions for the targeted delivery of medications in rhino and otosurgery. *Vestnik otorinolaringologii*. 83(5):68 - 70.

Oun, R., Moussa, YE., Wheate, NJ. (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalt Trans*. 47(19):6645 - 6653.

Perumalsamy, H., Shanmugam, R., Kim, JR., Anandapadmanaban, G., Huq, MA. y cols. (2022). Nanoemulsion and Encapsulation Strategy of Hydrophobic Oregano Essential Oil Increased Human Prostate Cancer Cell Death via Apoptosis by Attenuating Lipid Metabolism. *Bioinorg Chem Appl*. 2022:9569226.

Plati, F., Papi, R., Parakevopoulou, A. (2021). Characterization of Oregano Essential Oil (*Origanum vulgare L. subsp hirtum*) Particles Produced by the Novel Nano Spray Drying Technique. *Foods*. 10(12):2923.

Puiggalí-Jou, A., Cazorla, E., Ruano, G., Babeli, I., Ginebra, MP. y cols. (2020). Electroresponsive Alginate-Based Hydrogels for Controlled Release of Hydrophobic Drugs. *ACS Biomater Sci Eng*. 6(11):6228 - 6240.

Riera, PS. y Martínez, BR. (2005). Morbilidad y mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile. *Revista Medica de Chile*. 133(5):555 - 563.

Rock, CL., Thomson, C., Gansler, T., Gapstur, SM., McCullough, ML. y cols. (2020). American Cancer Society guideline for diet and physical activity for cancer prevention. *A Journal Cancer for Clinicians*. 70(4):245 - 271.

Rumgay, H., Murphy, N., Ferrari, P., Soerjomataram, I. (2021). Alcohol and Cancer: Epidemiology and Biological Mechanisms. *Nutrients*. 13(9):3173.

Sahana, TG. y Rekha, PD. (2018). Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering. *Molecular Biology Reports*. 45(6):2857 - 2867.

Sakkas, H. y Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *J Microbiol Biotechnol*. 27(3):429 - 438.

Saporito, F., Sandri, G., Bonferoni, MC., Rossi, S., Boselli C. y cols. (2017). Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing. *Journal of Nanomedicine*. 13:175 - 186.

Scartazzini L., Tosati JV., Cortez DHC., Rossi MJ., Flores SH. y cols. (2019). Gelatin edible coatings whit mint essential oil (*Mentha arvensis*): film characterization and antifungal properties. *Journal Food Sai Technol*. 56:4045 - 4056.



Shi T, Yu X, Yan L, Xiao H. (2017). Research progress of hydroxychloroquine and autophagy inhibitors on cancer. In *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 79(2):287 - 294.

Sertel, S., Eichhorn, T., Plinkert, PK., Efferth, T. (2011). Cytotoxicity of *Thymus vulgaris* essential oil towards human oral cavity squamous cell carcinoma. *Anticancer Research*. 31(1):81 - 87.

Sigma-Aldrich. (2022). Ficha de Datos de Seguridad de timol Versión 8.2 (índice nro 604-032-00-1).

Sigma-Aldrich. (2022). Ficha de Datos de Seguridad de gelatina de piel bovina Versión 8.2 (índice nro 9000-70-8).

Sigma-Aldrich. (2022). Ficha de Datos de Seguridad de Tween®80 Versión 8.2 (índice nro 9005-65-6).

Simirgiotis, MJ., Burton, D., Parra, F., López, J., Muñoz, P. y cols. (2020). Antioxidant and Antibacterial Capacities of *Origanum vulgare* L. Essential Oil from the Arid Andean Region of Chile and its Chemical Characterization by GC-MS. *Metabolites*. 10(16):414.

Syrjänen S y Syrjänen K. (2019). HPV in Head and Neck Carcinomas: Different HPV Profiles in Oropharyngeal Carcinomas – Why?. *Acta Cytol*. 63(2):1 -19.

Tongnuanchan, P. y Benjakul S. (2014). Essential Oils: Extraction, Bioactivities, and Their Uses for Food Preservation. *Journal of Food Science*. 79(7): 1231 - 1249.

Tongnuanchan, P. (2015). Gelatin film incorporated with essential oil and palm oil: properties, characteristics and application as edible pouch. Doctoral dissertation, Prince of Songkla University.

Tubtimsri, S., Limmatvapirat, C., Limsirichaikul, S., Akkaramongkolporn, P., Inoue, Y. y cols. (2018). Fabrication and characterization of spearmint oil loaded nanoemulsions as cytotoxic agents against oral cancer cell. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 13(5):425 - 437.

Yan, S., Wu, S., Zhang, J., Zhang, S., Huang, Y. y cols. (2023). Controlled release of curcumin from gelatin hydrogels by the molecular-weight modulation of an oxidized dextran cross-linker. *Food Chem*. 30(418):135966.

Warnakulasuriya, S. (2009). Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. In *Oral Oncology*. 45(4–5):309 - 316.

World Health Organization. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/>. (12/06/2021).

World Health Organization (2023). International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>. (20/06/2023).

Zhong, Y., Zheng, Q., Hu, P., Huang X., Yang M. y cols. (2019). Sedative and hypnotic effects of compound Anshen essential oil inhalation for insomnia. *BCM complementary and alternative medicine*. 19(1):306.