



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS (ICOD)  
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA PARA EL  
DESARROLLO DE ANTINEOPLÁSICOS Y ANTIFÚNGICOS**

**“Desarrollo de un dispositivo de entrega de aceite esencial de *Origanum vulgare* en base a hidrogel para inhibir el crecimiento y la adhesión de *Candida albicans* (ATCC 90029) *in vitro*.”**

**Franco Ignacio Silva Balagna**

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

**TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Mario Díaz-Dosque**

**TUTOR ASOCIADO  
Dr. Alfredo Molina Berríos**

**Adscrito a proyecto FIOUCH S1916**

**Santiago – Chile**

**2023**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS  
ODONTOLÓGICAS (ICOD)  
LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA PARA EL  
DESARROLLO DE ANTINEOPLÁSICOS Y ANTIFÚNGICOS**

**“Desarrollo de un dispositivo de entrega de aceite esencial de *Origanum vulgare* en base a hidrogel para inhibir el crecimiento y la adhesión de *Candida albicans* (ATCC 90029) *in vitro*.”**

**Franco Ignacio Silva Balagna**

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

**TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Mario Díaz-Dosque**

**TUTOR ASOCIADO  
Dr. Alfredo Molina Berríos**

**Adscrito a proyecto FIOUCH S1916**

**Santiago – Chile**

**2023**

## **DEDICATORIA**

A mis amados padres Luis y Elizabeth

A Francisca, por su amor, apoyo y motivación a seguir

A mis abuelas por su amor incondicional

A mi Tío Freddy Coronado

Gracias por creer en mí, sin ustedes, nada de esto sería posible.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más sincera gratitud al Doctor Mario Díaz-Dosque por su guía, apoyo y acompañamiento que fue tanto en lo académico como en mi crecimiento personal a lo largo de mi proceso de formación desde el primer año de universidad y al proyecto FIOUCH S1916.

Al Doctor Alfredo Molina Berríos por su gran apoyo, paciencia y disposición para poder llevar a cabo esta tesis.

Al laboratorio de Nanobiomateriales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y todos sus integrantes por brindarme el espacio y las herramientas para 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 voluntad y apoyo.

A la Doctora Blanca Urzúa Orellana por su apoyo y disposición durante la elaboración de este trabajo.

A mi gran amigo y hermano Daniel Ojeda Bonilla, con quien recorrí todo este largo camino trabajando juntos y logrando que este trabajo de investigación fuera posible.

A mis queridos amigos Fernanda, José Tomás, Camila, Colomba, Constanza, Juan Pablo, Josefina, Benjamín, Matías, Leonardo y Alberto, quienes me han acompañado a lo largo de todas mis etapas y crecimiento personal.

Al Doctor Rodrigo Canales Ulloa, mi tutor de internado, un gran profesional y por sobre todo gran persona que creyó en mí y me levantó cuando lo necesité.

# INDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>2</b>
2.1 <i>Los trastornos bucodentales y su relevancia .....</i>	2
2.2 <i>Candidiasis oral.....</i>	2
2.3 <i>Manifestaciones clínicas de candidiasis oral .....</i>	5
2.4 <i>Manejo clínico de infecciones orales por C. albicans: tratamiento farmacológico, mecanismo de acción y sus limitaciones.....</i>	5
2.5 <i>Aceites esenciales: origen, propiedades terapéuticas y su potencial uso como terapia antifúngica para el control de crecimiento de C. albicans .....</i>	9
2.6 <i>Formulaciones actuales para utilizar aceites esenciales como fármacos .....</i>	12
2.7 <i>Aceite esencial de orégano: un efectivo agente antifúngico contra C. albicans.....</i>	13
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>15</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
4.1 <i>Objetivo general .....</i>	15
4.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	15
<b>5. METODOLOGÍA .....</b>	<b>16</b>
5.1 <i>Tipo de estudio .....</i>	16
5.2 <i>Obtención del aceite esencial de Origanum vulgare (AEO) .....</i>	16
5.3 <i>Obtención del hidrogel/aceite esencial de O. vulgare .....</i>	18
5.4 <i>Actividad antifúngica del hidrogel/Aceite esencial de O. vulgare.....</i>	24
5.5 <i>Análisis estadístico.....</i>	27
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>52</b>
<b>9. REFERENCIAS .....</b>	<b>53</b>

## 1. RESUMEN

**Introducción.** Las infecciones por *Candida albicans* tienen una importante carga para el sector de la salud, cuyo grupo de riesgo comprende principalmente a la tercera edad. El tratamiento farmacológico actual para *candidiasis oral* es limitado, presenta resistencia y toxicidad. Se propone un dispositivo de entrega de aceite esencial de *Origanum vulgare* en forma de hidrogel (hidrogel/AEO) que permita el control de dosificación para ser evaluado sobre *C. albicans* ATCC 90029 *in vitro*.

**Materiales y métodos.** Se estudió el efecto antifúngico del hidrogel/AEO sobre *C. albicans* ATCC 90029 mediante ensayos de difusión por disco y adhesión en superficie abiótica. Se preparó el hidrogel en base a gelatina bovina y se determinó la formulación óptima de hidrogel/AEO cualitativamente. La liberación de AEO se cuantificó mediante su dilución en agua destilada y medición de la absorbancia con espectrofotometría, extrapolando los valores a una curva de estándar de Timol.

**Resultados.** La formulación óptima de hidrogel/AEO fue gelatina 4 % m/v; concentraciones de AEO de 0,5 y 1 % v/v; Tween-80 0,6 % v/v y tiempo de secado de 7 días. Los hidrogeles/AEO tienen control de liberación de forma no lineal con punto máximo de liberación en ~ 210 – 255 min. Los discos de hidrogel/AEO demostraron inhibir cualitativamente el crecimiento de *C. albicans* y tuvieron disminución de un 70 % de adhesión en superficie abiótica.

**Conclusiones.** Los discos de hidrogel permiten la liberación sostenida y controlada de bajas concentraciones de AEO, inhibiendo el crecimiento y la adhesión de *C. albicans in vitro*. Proponemos a este dispositivo de entrega como una opción a futuro para el tratamiento de infecciones localizadas de *C. albicans*; sin embargo, se requieren más estudios de la formulación sobre escenarios más complejos para evaluar su toxicidad, seguridad y determinar concentraciones terapéuticas.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Los trastornos bucodentales y su relevancia

Los trastornos bucodentales afectan a las personas durante toda su vida, constituyendo una importante carga para el sector de la salud. Entre ellos se encuentran la caries dental, enfermedad periodontal, cáncer oral, infecciones causadas por hongos, entre otros (OMS, 2022). Estos trastornos, con el curso de los años incrementan su severidad y prevalencia afectando especialmente a la población de la tercera edad, teniendo como desenlace en muchos casos la pérdida de dientes, cuya alternativa de rehabilitación más frecuente es el uso de prótesis removible acrílica por ser la solución más económica, cuya consecuencia es transformarse en factor etiológico para instalación de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Así, se ha reportado una prevalencia de *Candida albicans* (*C. albicans*) entre un 60 a 100 % de los portadores de prótesis removible (Gleiznys, A. y cols., 2015).

En este sentido, las infecciones orales causadas por especies del género *Candida* son un trastorno bucodental, donde se reportan anualmente alrededor de 400.000 infecciones causadas por *C. albicans* en el mundo, con una tasa de mortalidad del 46 - 75 % en sus manifestaciones más graves como candidemia (Pal, M., 2018).

### 2.2 Candidiasis oral

Los hongos del género *Candida* son microorganismos con desarrollo predominantemente unicelular y son conocidos como levaduras. Comprende más de 150 especies, de las cuales sólo 12 poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37 °C y ocasionalmente ser patógenas para los humanos, destacando *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, entre otras (Pardi, G. y Cardozo, E., 2002). Así, *C. albicans*, una especie comensal de la mucosa oral, es responsable de aproximadamente un 50 % de los casos de candidiasis humana, siendo además la especie más virulenta (Lopes, J. y Lionakis M., 2022; Mba, I. y Nweze, E., 2020).

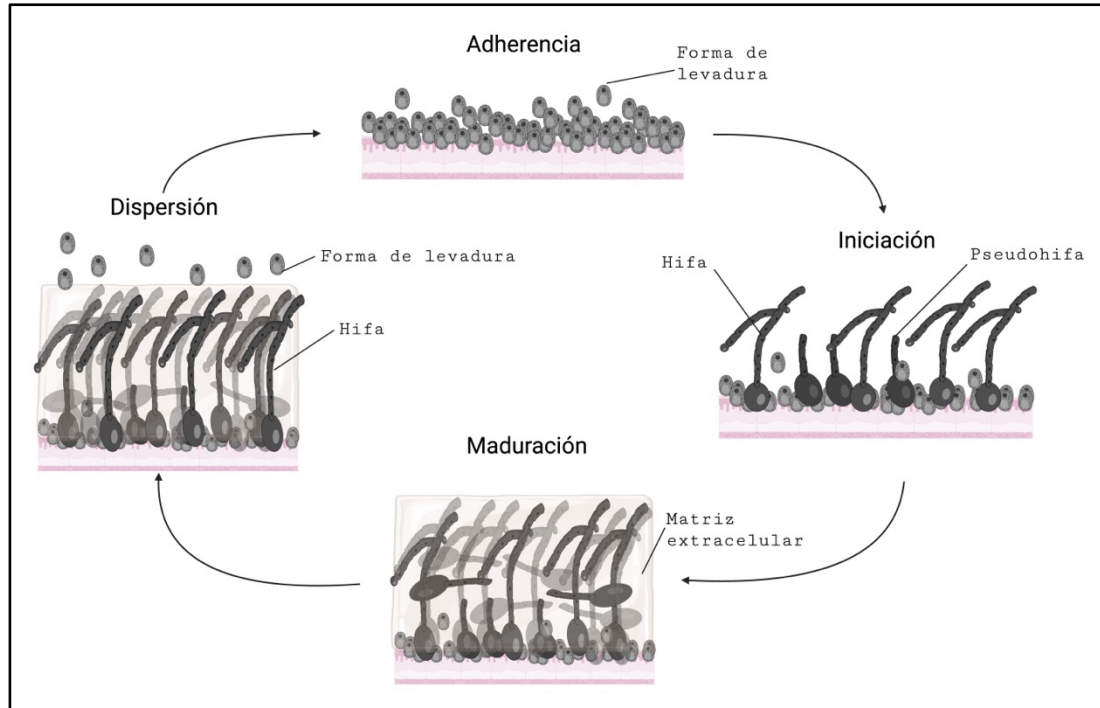
Estos microorganismos son oportunistas, causando desde enfermedad mucocutánea hasta diseminación hematológica, mediante el crecimiento de



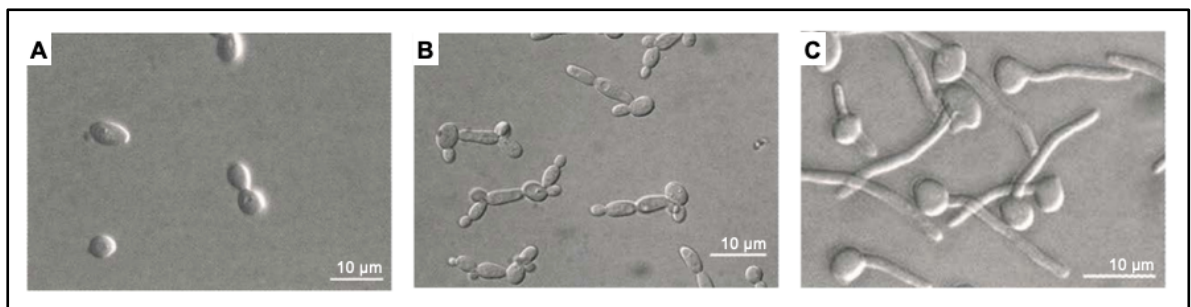
colonias y la penetración de éstas en los tejidos orales cuando existe una disbiosis inducida por antibioterapia, inmunosupresión o intervenciones médico-odontológicas que dañen la integridad de la barrera mucocutánea o perturben los mecanismos de defensa del hospedero (Lopes, J. y Lionakis, M., 2022; Otero, R. y cols., 2015). Dentro de los factores de riesgo destacan el uso de prótesis mucosoportadas, consumo de tabaco, radioterapia/quimioterapia, desordenes hormonales, uso de inhaladores orales y alteraciones salivales cualitativas y cuantitativas (Muzyka, B. y Epifanio, R., 2013).

Una vez inducida la disbiosis, comienza el sobrecrecimiento de colonias de *C. albicans*, cuyo ciclo de vida de formación de biopelículas está comprendido por cuatro etapas en un periodo de 24 horas (Nobile, C. y Johnson, A., 2015). La primera etapa es la adhesión de células en estado planctónico a una superficie biótica o abiótica. Luego, ocurre un cambio en la morfología celular desde el estado planctónico a formas filamentosas, denominadas pseudohifas e hifas verdaderas que proliferan activamente. En paralelo, para la formación de la biopelícula debe producirse abundante matriz extracelular. Finalmente, cuando ya se tiene una biopelícula madura se liberan del medio levaduras para diseminar y formar nuevas biopelículas, permitiendo un equilibrio entre las colonias perdidas debido al recambio de células epiteliales y su persistencia en la superficie (**Figura 1**) (Lohse, M. y cols., 2018). De esta manera, la destrucción de los tejidos de los afectados ocurre por el efecto físico de los filamentos creciendo dentro de los tejidos y liberación de enzimas hidrolíticas extracelulares al ambiente local en el caso de *Candidiasis invasora* (Lewis, M. y Williams, D., 2017).

La capacidad de *C. albicans* de cambiar de morfología, desde levadura propiamente tal a pseudohifas e hifas verdaderas, se ha relacionado con su patogenicidad, permitiéndole atravesar barreras mucosas, establecer la enfermedad en tejidos profundos y al mismo tiempo asegurar su persistencia en la cavidad oral, constituyendo un factor de virulencia clave (**Figura 2**). Esto se correlaciona con la formación de biopelículas, las cuales se definen como una comunidad microbiana organizada tridimensionalmente, adherida a una superficie biótica o abiótica, que otorga patogenicidad a las levaduras brindándoles mayor resistencia a fármacos y a perturbaciones físicas (Blankenship, J. y Mitchell, A., 2006).



**Figura 1. Esquema de ciclo de vida de formación de biopelículas de *C. albicans*:** Se describen cuatro etapas: **Adherencia** de células en forma de levaduras planctónicas a la superficie; **Iniciación o fase proliferativa** de la formación de la biopelícula, donde coexisten las células en forma de levadura, pseudohifa e hifas adheridas a la capa basal; **Maduración** de la biopelícula donde se produce abundante matriz extracelular; y **Dispersión** de células en su forma de levadura desde la biopelícula hacia otros sitios. (Figura de elaboración propia mediante *software* Biorender®).



**Figura 2. Morfologías de *C. albicans*:** a) **Levadura**; b) **Pseudohifa**, se observan constricciones características en cuello de la yema; c) **Hifa verdadera**, se observa que no poseen constricciones ni ramas. (Fotografías extraídas y adaptadas de Sudbery, P. y cols., 2004).

### 2.3 Manifestaciones clínicas de *candidiasis oral*

La clasificación actual de *Candidiasis oral* comprende cuatro formas primarias cuyo diagnóstico es eminentemente clínico, entre ellas se encuentran la *candidiasis pseudomembranosa*, *candidiasis eritematosa aguda*, *candidiasis eritematosa crónica* y *candidiasis hiperplásica crónica*, donde además cualquiera de ellas puede estar asociada concomitantemente con la presencia de queilitis angular, una forma secundaria de *candidiasis oral* (**Figura 3**). Dentro de ellas destaca la *candidiasis eritematosa crónica*, comúnmente asociada con el uso de prótesis removibles desajustadas, higiene oral y protésica deficientes y se conoce comúnmente como “estomatitis subprotésica”, desarrollada principalmente en la mucosa palatina subyacente a un aparato protésico acrílico removible en un 75 % de los pacientes portadores (Figura 3C) (Lewis, M. y Williams, D., 2017).

Las infecciones por *C. albicans*, vienen de la mano con signos y síntomas que van en desmedro de la calidad de vida de los afectados, presentándose en zonas superficiales con picazón, ardor, sangrado, secreción, dolor, erupción y en zonas más profundas con inestabilidad hemodinámica, shock, hemocultivos positivos, fiebre, taquicardia e incluso en hospederos comprometidos el diagnóstico tardío puede conducir a la muerte (Telles, D. y cols., 2017).

### 2.4 Manejo clínico de infecciones orales por *C. albicans*: tratamiento farmacológico, mecanismo de acción y sus limitaciones

Una vez diagnosticada la infección oral por *Candida*, el manejo clínico en Chile, según la guía clínica del MINSAL, 2010, considera: para casos leves, el manejo de factores irritativos, medidas de higiene oral y protésico, el uso opcional de antisépticos o desinfectantes y adicionalmente prescripción de antifúngicos tópicos; en el caso de infecciones resistentes y graves en pacientes inmunocomprometidos se prescriben antifúngicos sistémicos. De esta manera, actualmente se utilizan principalmente tres familias de fármacos antifúngicos en el tratamiento para infecciones por *C. albicans* (**Tabla 1**). Adicionalmente, la lista de fármacos para el tratamiento antifúngico de *Candidiasis oral* y sus observaciones, proporcionada por MINSAL, 2010 se muestra en la **Tabla 2**.



**Figura 3. Fotografías de manifestaciones clínicas de *Candidiasis oral*. A) *Candidiasis pseudomembranosa*, B) *Candidiasis eritematosa aguda*, C) *Candidiasis eritematosa crónica*, D) *Candidiasis hiperplásica crónica*, E) Queilitis angular (Fotografías Extraídas y adaptadas desde Lewis, M. y Williams, D., 2017).**

**Tabla 1. Familias de fármacos antifúngicos.** (Shapiro, R. y cols., 2011; Lewis, M. y Williams, D., 2017).

Familia	Tipo	Estructura en donde actúan	Blanco terapéutico y efecto
Azoles (imidazoles/ triazoles)	En su mayoría se comportan como fungistáticos	Membrana celular	Enzima 14 $\alpha$ -esterol-demetilasa, bloquea la síntesis de ergosterol (análogo funcional del colesterol de los humanos), causando estrés en la membrana. También se ha descrito que causan la acumulación de 14 $\alpha$ -metil-3,6-diol, un intermediario tóxico en la membrana.
Polienos	Fungicida	Membrana celular	Ergosterol, forma complejo fármaco-ergosterol en forma de canal que atraviesa la membrana celular y causa la fuga de iones desde el interior de la célula.
Equinocándidas	Fungicida	Pared celular	Enzima (1,3)- $\beta$ -d-glucano sintasa, bloquea síntesis de (1,3)- $\beta$ -d-glucano, que causa la pérdida de integridad de la pared celular.

**Tabla 2. Agentes antimicóticos utilizados en el tratamiento de *Candidiasis oral*** (MINSAL, 2010).

Droga/Familia	Presentaciones	Observaciones
Anfotericina B/ Polieno	Pastilla Suspensión oral	Actualmente solo cuenta con registro del ISP para formulación intravenosa, por lo que sólo se utiliza en infecciones sistémicas diseminadas. (ISP., 2006).
Nistatina/ Polieno	Crema Pastillas Suspensión oral	Absorción desde el tracto gastrointestinal despreciable. Puede causar náusea y vómitos a altas dosis.
Clotrimazol/ Imidazol	Crema Solución	Efectos locales leves. Presenta actividad anti-estafilococo.
Miconazol/ Imidazol	Gel oral Crema	Ocasionalmente produce reacciones locales leves. Interactúa con anticoagulantes. Evitar porfirina.
Ketoconazol/ Imidazol	Tabletas	Puede causar náusea, vómitos, prurito y daño hepático. Interactúa con anticoagulantes, cisaprida y astemizol.
Fluconazol/ Triazol	Cápsulas	Interactúa con anticoagulantes, terfenadina, cisaprida y astemizol, vómitos, diarrea, dolor de cabeza y disfunción hepática.
Itraconazol/ Triazol	Cápsulas	Interactúa con terfenadina, cisaprida y astemizol. Puede causar náusea, neuropatía y rash.

Existen diversas limitaciones para estos fármacos, destacando: la naturaleza fungistática de algunos azoles y polienos impone una selección natural sobre las células supervivientes que permite desarrollar resistencia al fármaco por su incapacidad de erradicar biopelículas; los fármacos polienos tienen poca absorción intestinal y limitación de eficacia por la dificultad de mantener niveles suficientes del fármaco en el entorno de *C. albicans* y significativa toxicidad debido a la interacción con el colesterol de las células humanas por su similitud estructural con ergosterol; las equinocándidas tienen muy buen perfil de seguridad, pero no tienen un rol en tratamiento ambulatorio para *Candidiasis oral* debido a tener una mínima absorción vía intestinal (Shapiro, R. y cols., 2011; Lewis, M. y Williams, D., 2017).

De esta manera, de la lista proporcionada por MINSAL. (2010), en la práctica clínica sólo se utilizan nistatina, miconazol y fluconazol, donde nistatina y miconazol tienen buena respuesta y tolerabilidad pero deben ser administrados 4 veces al día (MINSAL., 2010), dificultando el cumplimiento terapéutico. Fluconazol solamente se utiliza en casos de infecciones recurrentes y/o alteración del sistema inmune, donde además existe alta tasa de recurrencia al no poseer actividad anti biopelícula.

De esta manera, de la lista proporcionada por MINSAL. (2010), en la práctica clínica sólo se utilizan nistatina, miconazol y fluconazol, donde nistatina y miconazol tienen buena respuesta y tolerancia, pero deben ser administrados 4 veces al día (MINSAL., 2010), dificultando el cumplimiento terapéutico. Fluconazol solamente se utiliza en casos de infecciones recurrentes y/o alteración del sistema inmune, donde además existe alta tasa de recurrencia al no poseer actividad anti-biopelícula. Finalmente, en casos donde las alternativas anteriores no son efectivas, se utilizan antifúngicos de acción sistémica, con mayor espectro de acción tales como itraconazol o posaconazol, pero tienen mayores efectos adversos, mayor costo asociado en el caso de posaconazol y de igual manera existe alta tasa de resistencia a estos fármacos (Nett, J. y Andes, D., 2016; Arnold, T. y cols., 2010).

Como problemas asociados al control de infecciones causadas por *C. albicans*, se han descrito: el número limitado de agentes antifúngicos efectivos, la alta citotoxicidad y costo, la recurrencia de infecciones, el aumento en la resistencia y alta variabilidad de eficacia. En este contexto, los productos naturales han sido de interés en los últimos años, principalmente debido a que presentan baja toxicidad y

propiedades antimicrobianas demostradas, como es el caso de los aceites esenciales.

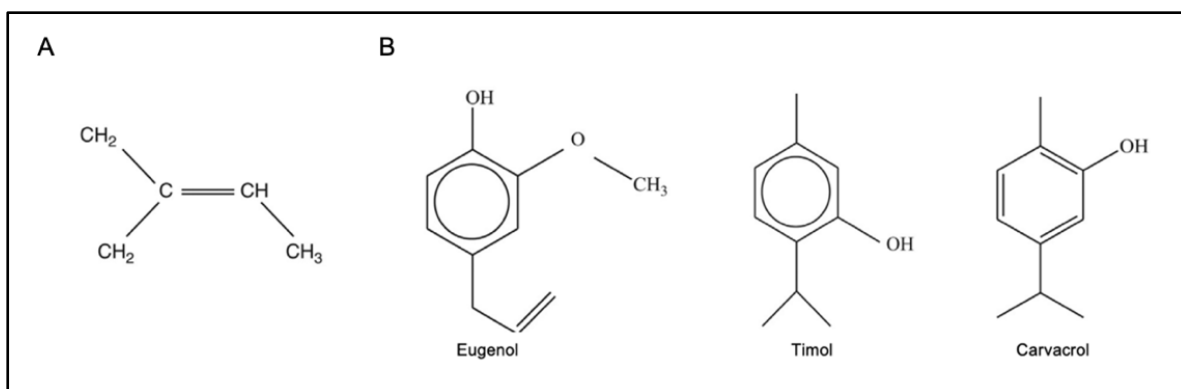
## **2.5 Aceites esenciales: origen, propiedades terapéuticas y su potencial uso como terapia antifúngica para el control de crecimiento de *C. albicans***

Las plantas generan aceites esenciales (AE) en forma de metabolitos secundarios, los que poseen un potencial químico para diversas funciones biológicas, tales como: actúan como sistema inmunológico que brinda protección frente a microorganismos, insectos y herbívoros; sirven como mecanismo de supervivencia frente a diversos tipos de estrés bióticos y abióticos para adaptarse a diferentes condiciones climáticas tales como protección UV; favorecen la reproducción de tipo sexual como agente atractivo para su polinización, entre otras (Olayemi, R., 2017).

Los AE han sido ampliamente utilizados por la medicina tradicional para diferentes afecciones, y sus aplicaciones biológicas están dadas en gran parte por la presencia de estructuras químicas características que constituyen una fracción relativamente volátil de los metabolitos secundarios de las plantas.

Cada aceite esencial puede estar constituido de 20 a 100 metabolitos secundarios de diverso origen químico; sin embargo, para todas las plantas productoras de aceite esencial los metabolitos secundarios predominantes son los terpenos, los cuales son compuestos orgánicos volátiles con propiedades aromáticas sintetizados por las plantas como resultado de polimerización enzimática de una unidad básica llamada isopreno (**Figura 4A**).

Los terpenos se clasifican en base a dos factores: el número de unidades de isoprenos polimerizadas, encontrando los hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos (conformados por 1, 2 y 3 unidades de isopreno, respectivamente), y su modificación química por grupos funcionales, encontrando a los terpenoides, a los cuales se le añaden átomos de oxígeno, destacando por sus propiedades los fenoles, los cuales son terpenoides con un grupo hidroxilo (-OH) unido a un anillo aromático y una cola de tres átomos de carbono, siendo los más comunes timol, eugenol y carvacrol (**Figura 4B**) (Moghaddam, M. y Mehdizadeh, L., 2017).



**Figura 4. Estructuras químicas. A.** Unidad de isopreno. **B.** Eugenol, timol y carvacrol. (Figuras extraídas y adaptadas desde Moghaddam, M. y Mehdizadeh, L., 2017).



Cada AE es único en composición, aunque provenga de una misma especie, pues cada planta produce diferentes metabolitos en función de su localización geográfica y de la estación del año, donde las estaciones de primavera, verano y otoño son las estaciones en las que los aceites exhiben similares y potentes actividades antifúngicas (Bozovic, M. y cols., 2017; Arcilla-Lozano, C. y cols., 2004).

Existen diversos métodos de extracción de los AE, tales como extracción con solventes orgánicos, destilación asistida por microondas, entre otros; sin embargo, los AE se obtienen en la mayoría de los casos a través de un método conocido como arrastre de vapor de agua del material vegetal, que permite adquirir un extracto puro sin subproductos tóxicos para su utilización con aparatología más sencilla y menos costosa en comparación a otros métodos. Cabe destacar que para este método no existe regla sobre un tiempo de extracción apropiada, diferentes plantas necesitan distintos periodos de extracción para que el aceite esencial tenga las características y calidad deseada (Moghaddam, M. y Mehdizadeh, L., 2017; Bozovic, M. y cols., 2017).

En cuanto a las diferentes propiedades que poseen los AE, éstas se asocian con distintos componentes. En este sentido, el efecto antifúngico de los terpenos dependería de la cantidad de fenoles alcohólicos que existan en su composición, destacando como agentes antifúngicos efectivos los monoterpenos, sesquiterpenos con anillos aromáticos, grupos hidroxilos fenólicos y otros terpenos activos como alcoholes, aldehídos y ésteres que pueden contribuir al efecto global antimicrobiano (Santos, A. y cols., 2019).

Se han estudiado distintas especies vegetales, entre ellas *Thymus vulgaris*, *Lavandula hybrida* y *Origanum vulgare*, mostrando resultados prometedores en el control de crecimiento de colonias de *C. albicans*, y un hallazgo común es que los componentes mayoritarios identificados para los aceites fueron terpenoides, tales como carvacrol, timol, eugenol, linalool, entre otros (Juniatik, M. y cols., 2017; Giordani, R. y cols., 2004; Guandalini, C. y cols., 2020; Santos, A. y cols., 2019; Cid-Chevecich, C. y cols., 2022). De esta manera, el mecanismo de acción antifúngico de los AE parece depender de su composición y concentración, pudiendo tener efectos antifúngicos por diferentes vías, tanto las concentraciones inhibitorias como las subinhibitorias.

Pauli, A. y cols., 2009, describieron que los componentes aislados de los AE pueden tener diferentes efectos según su concentración. A altas dosis destruyen a las células por vías comunes; sin embargo, a bajas dosis, distintos terpenoides afectan la fluidez de membrana de manera diferente, disminuyéndola en el caso de  $\alpha$ -terpineol y aumentándola en el caso de terpineno-4-ol. Componentes como carvacrol y timol son potentes inhibidores de la cadena respiratoria y también se ha observado que timol evita la formación de filamentos de *C. albicans* en concentraciones subinhibitorias (Pauli, A., 2006).

En esta misma línea, Palmeira-de-Oliveira, A. y cols., 2009, sugieren que los aceites son capaces de atravesar la pared celular y ubicarse entre las capas de la membrana, pudiendo alterar su fluidez, causar daños a proteínas y enzimas de la membrana, con la consecuente disrupción y degradación de la pared celular. Esto resultaría en la fuga del contenido celular, coagulación del citoplasma, agotamiento de protones y eventual lisis celular, teniendo relación directa con la viabilidad celular y formación de hifas. Los monoterpenos, como timol y carvacrol, han demostrado efectos significativos debido a su propiedad anfipática y capacidad de reaccionar químicamente con proteínas de membrana. Esto respaldaría la idea de utilizar aceites esenciales en su totalidad, para aprovechar el sinergismo entre sus componentes (Palmeira-de-Oliveira, A. y cols., 2009).

## **2.6 Formulaciones actuales para utilizar aceites esenciales como fármacos**

Debido al origen vegetal de los AE, éstos tienen la característica de ser hidrofóbicos, volátiles y tener sensibilidad a la oxidación (Moghaddam, M. y Mehdizadeh, L., 2017).

En esta línea, se requiere de una encapsulación para el uso de los AE, existiendo diferentes formulaciones que ofrecen diversas propiedades en términos de estabilidad y eficacia, tales como emulsiones, encapsulación mediante ciclodextrinas, liposomas, nanopartículas poliméricas, sprays, entre otras (Juniatik, M. y cols., 2017; Oliveira-Filho, R. y cols., 2018; Lelis, C. y cols., 2021; Altay, Ö. y cols., 2022). Estas formulaciones permiten encapsular los aceites, mejorar su solubilidad y protegerlos de su degradación; sin embargo, tienen en común que no crean un dispositivo que sirva como vehículo para su liberación sostenida.

Por este motivo surge la necesidad de desarrollar un dispositivo que permita la aplicación y control de liberación del AE en el contexto del uso oral para infecciones por *C. albicans*, donde la mucosa oral es una superficie con constante flujo salival que dificulta la permanencia de los fármacos sobre el sitio a tratar. En este sentido, en la búsqueda de dispositivos que permitan la liberación controlada de fármacos surgen como alternativa los hidrogeles con inclusiones de AE, los cuales son una red tridimensional conformada por cadenas flexibles de polímeros que absorben cantidades considerables de agua, que tienen características de ser hidrófilos, blandos, elásticos, insolubles en agua y además de hincharse en presencia de agua aumentando su volumen, lo que les aporta la propiedad de absorber, retener y liberar bajo condiciones controladas algunas soluciones orgánicas (Arredondo, A. y Londoño, M., 2009).

De esta manera, se han desarrollado mezclas de biopolímeros tales como hidrogeles e hidrocoloides con AE, a fin de emplear estos productos en el tratamiento de heridas, utilizando extracciones de lavándula, eucalipto, pino, orégano, entre otros. Estos productos, en distintos ensayos demostraron efectividad en la formulación usando hidrogeles como andamio para reparación de heridas y con el efecto coadyuvante de aceites esenciales para favorecer la cicatrización y otorgar efecto antioxidante, antibacteriano y antiinflamatorio (Pérez-Recalde, M. y cols., 2017). En este contexto, se ha reportado que la formulación de hidrogel en base a mezcla de gelatina con AE tuvo resultados prometedores en el control de crecimiento de las especies fúngicas *B. cinerea* y *R. stolonifer*, mostrando actividad inhibitoria *in vitro* (Scartazzini, L. y cols., 2019).

## **2.7 Aceite esencial de orégano: un efectivo agente antifúngico contra *C. albicans***

Para el estudio de muestras vegetales, surge la necesidad de seleccionar una especie que sea factible de obtener en grandes cantidades, debido a que la cantidad de AE que se obtiene es reducida en comparación a la cantidad de muestra requerida para su extracción. En Chile se puede obtener *Origanum vulgare* (*O. vulgare*), una hierba mediterránea que actualmente se cultiva en diversas regiones del país, la cual es factible de cultivar en grandes cantidades a partir de una misma

planta en condiciones conocidas y realizar una selección de la muestra para su utilización.

Recientemente se ha descrito que el aceite esencial de orégano (AEO) posee potente actividad antifúngica, disminuyendo la viabilidad en *biofilms* formados por diferentes especies de *Candida*, inhibiendo la morfogénesis, adhesión y proliferación en al menos un 50 %, además, tiene interacción sinérgica con fluconazol y nistatina (Cid-Chevecich, C. y cols., 2022).

En base a lo anterior, considerando la actividad antibiopelícula del AEO sobre aislados clínicos orales de *C. albicans*, es de interés evaluar una forma de entrega controlada a la cavidad oral, lo cual podría lograrse a través de su encapsulación en un hidrogel. Por este motivo, en este trabajo planteamos desarrollar un hidrogel para la liberación sostenida de AEO y evaluamos su efecto sobre *C. albicans in vitro*.

### 3. HIPÓTESIS

La incorporación de aceite esencial de *Origanum vulgare* a un hidrogel de gelatina, permite su liberación controlada en un medio acuoso, inhibiendo el crecimiento celular y la adhesión de *Candida albicans in vitro*.

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general

Evaluar la incorporación del aceite esencial de *Origanum vulgare* en un hidrogel de gelatina y su perfil de liberación, junto con su efecto sobre el crecimiento celular y adhesión de *C. albicans in vitro*.

#### 4.2 Objetivos específicos

- Generar y caracterizar una formulación de hidrogel/AEO que al solubilizarse permita la liberación controlada del aceite en un medio líquido.
- Determinar el efecto *in vitro* del hidrogel/AEO sobre el crecimiento de *C. albicans* (ATCC 90029).
- Determinar el efecto *in vitro* del hidrogel/AEO sobre la adhesión de *C. albicans* (ATCC 90029) a una superficie abiótica.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Tipo de estudio

Estudio experimental *in vitro*.

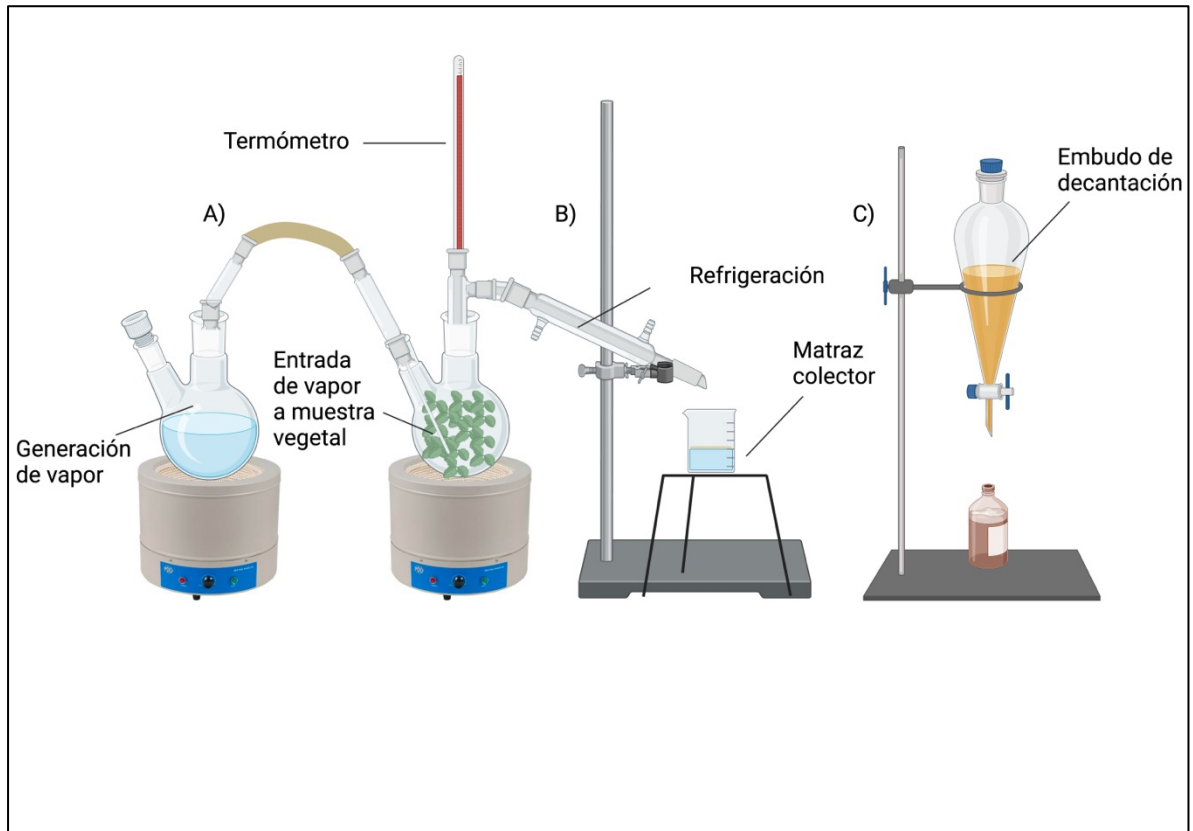
### 5.2 Obtención del aceite esencial de *Origanum vulgare* (AEO)

**5.2.1 Obtención de muestra vegetal.** Se utilizaron 2 kg de hojas y tallos frescos de *O. vulgare*, los que fueron recolectados durante la floración primaveral del año 2021 en Chicauma, Lampa, Región Metropolitana, Chile (33°14'23"S,70°54'27"O) y almacenados en lugar fresco y seco.

**5.2.2 Extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor de agua.** Se realizaron diferentes cargas por separado en balón para destilación de 2 litros con aproximadamente 500 gramos de hojas y tallos de *O. vulgare* (máxima capacidad del balón). En paralelo, se dispuso un segundo balón de destilación cargado con agua destilada sobre un manto calefactor para llevar el agua a punto de ebullición. La temperatura del sistema fue controlada mediante un termómetro situado en el balón con el producto vegetal, el cual se mantuvo a 98 °C para el proceso.

Ambos balones se conectaron mediante conectores de silicona para permitir el paso de vapor desde el balón con agua hacia el balón con las muestras de producto vegetal, realizando el arrastre por vapor de los compuestos volátiles, proceso que tuvo una duración de 90 min. Luego, el vapor cargado con compuestos volátiles pasó desde el balón con muestra vegetal, por un condensador Liebig, hasta un vaso precipitado para finalmente obtener una muestra en estado líquido.

Finalmente, la muestra líquida que se obtuvo está compuesta por una fase acuosa y el aceite propiamente tal, por lo que se filtró mediante un embudo de decantación hasta lograr la separación de las fases y obtener el aceite esencial. El aceite esencial obtenido se almacenó en congelador a - 18 °C, en frascos opacos rotulados con la fecha de obtención y tipo de producto vegetal utilizado (**Figura 5**).



**Figura 5. Esquema del sistema de extracción de aceite esencial por arrastre de vapor de agua. A)** Se lleva a ebullición agua destilada y vapores pasan a balón cargado con material vegetal. **B)** El refrigerante condensa los vapores que contienen los compuestos volátiles del aceite esencial. **C)** Mediante un embudo de decantación se separa la fase oleosa de la fase acuosa (Figura de elaboración propia *mediante software* Biorender®).

El aceite esencial obtenido de la muestra vegetal utilizada en este estudio fue caracterizado previamente por Cid-Chevecich, C. y cols. (2022) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), obteniendo que para este aceite los constituyentes más abundantes fueron monoterpenos oxigenados, representando el 64,13 % de la muestra (cis-sabineno hidrato 16,72 %, 4-terpineol 13,57 % y timol 14,20 %), seguido de hidrocarburos monoterpénicos en un 26,59 % ( $\gamma$ -terpineno 11,66 %) y sesquiterpenos en un 5,12 % (Cid-Chevecich, C. y cols., 2022).

### 5.3 Obtención del hidrogel/aceite esencial de *O. vulgare*

**5.3.1 Formulación y preparación del hidrogel.** Para la formulación del hidrogel se realizó esencialmente el protocolo de Scartazzini, L. y cols. (2019). con algunas modificaciones:

Preparación del hidrogel: Para la preparación de la mezcla, se añadieron los materiales a disolver en porcentaje en masa por volumen total de agua destilada, de esta manera, en 250 ml de agua destilada a 80 °C, se disolvieron 10 g de gelatina de piel bovina (Sigma-Aldrich) (gelatina al 4 % m/v de agua destilada) sobre una placa con agitación magnética a 500 rpm por 20 min. Luego, a la mezcla obtenida se le adicionaron 139  $\mu$ l de Tween-80 (Sigma-Aldrich) (Tween-80 al 0,06 % v/v de agua destilada). Posteriormente, se mantuvo esta solución a 80 °C en baño maría mediante el uso de una placa calefactora (Heidolph, MR3001K) por 10 min con agitación. Una vez que la solución se enfrió (25 °C), se separó en 3 muestras de 50 ml cada una en vasos de precipitado, descartando los 100 ml sobrantes.

Encapsulación de AEO dentro del hidrogel. Para esto se prepararon 3 muestras:

1. **Hidrogel/0**  $\rightarrow$  50 ml de solución sin AEO (AEO al 0 % v/v solución).
2. **Hidrogel/AEO 0,5 %**  $\rightarrow$  250  $\mu$ l de AEO en 50 ml de solución (AEO al 0,5 % v/v solución).
3. **Hidrogel/AEO 1 %**  $\rightarrow$  500  $\mu$ l de AEO en 50 ml de solución (AEO al 1 % v/v solución).

Cada mezcla se homogeneizó por método de dispersión mediante Ultra-Turrax® a 14.500 rpm (nivel 5) por 3 min y se adicionaron sobre placas de silicona



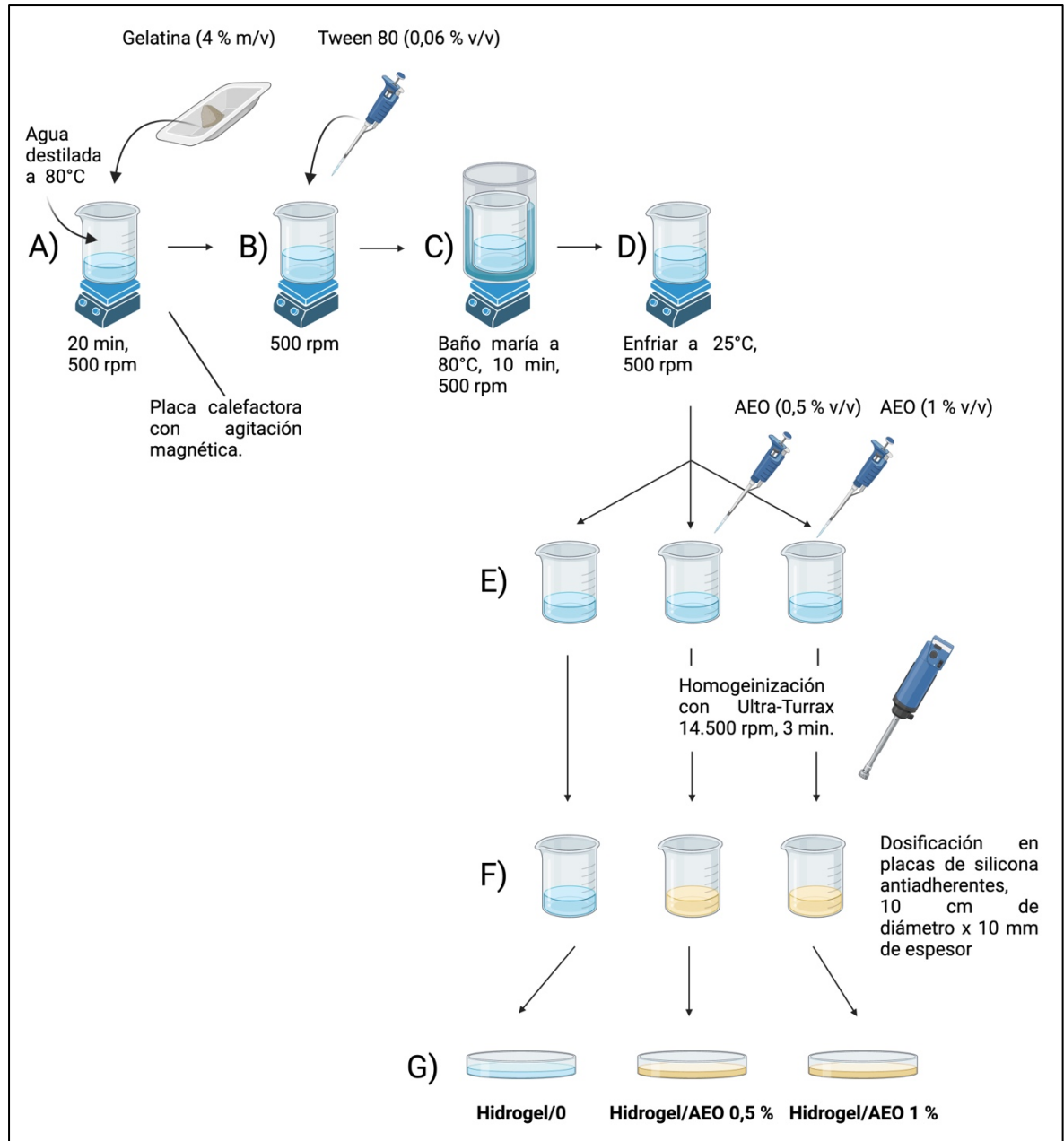
antiadherentes de 10 cm de diámetro, obteniendo un espesor de 10 mm de mezcla por cada placa (**Figura 6**). Se refrigeraron las placas a 4 °C para obtener la gelificación del hidrogel/AEO formulado. Luego de 7 días se seccionaron los hidrogeles en discos uniformes mediante un perforador de alicate manual de 6 mm de diámetro (ADIX) de acuerdo con el método 5.3.2.

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

Se masaron las placas de silicona antiadherente en donde se dosificaron los hidrogeles formulados previo a adicionar la mezcla en una balanza analítica (Precisa 125A). Luego se masaron las placas de silicona con los hidrogeles obtenidos en los tiempos 0; 24; 96; 168; y 240 h, para cuantificar la pérdida de masa en función del tiempo y su expresión en porcentaje de humedad, tomando como el 100 % de humedad la preparación recién gelificada. Finalmente se identificó en que tiempo se detiene la pérdida de humedad y se obtiene una lámina deshidratada que sea óptima para seccionarla en discos uniformes de 6 mm de diámetro.

### **5.3.3 Análisis de morfología de hidrogeles mediante microscopía electrónica de barrido.**

La morfología de la película de hidrogeles/0 e hidrogeles/AEO 0,5 y 1 % se analizó mediante microscopía electrónica de barrido (*Scanning electron microscopy*, SEM) para el estudio de la sección transversal de la película. Se realizó una sección longitudinal de 0,5 mm de ancho de cada hidrogel y se plegó sobre si misma 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), 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 300 - 4300x.



**Figura 6. Esquema de obtención del hidrogel/aceite esencial de *O. vulgare*.** **A)** Se adiciona gelatina al agua destilada bajo agitación. **B)** Se adiciona Tween-80 a la solución bajo agitación. **C)** Solución se lleva a baño maría. **D)** Solución se deja enfriar bajo agitación. **E)** Se fracciona la solución en 3 muestras y se adiciona AEO. **F)** Se homogenizan las soluciones por método de dispersión con Ultra-Turrax. **G)** Se dosifican las soluciones en placas de silicona antiadherentes y se refrigeran a 4 °C para obtener los hidrogel/0 e hidrogel/AEO 0,5 y 1 % v/v. AEO Aceite esencial de *O. vulgare* (Figura de elaboración propia mediante software Biorender ®).

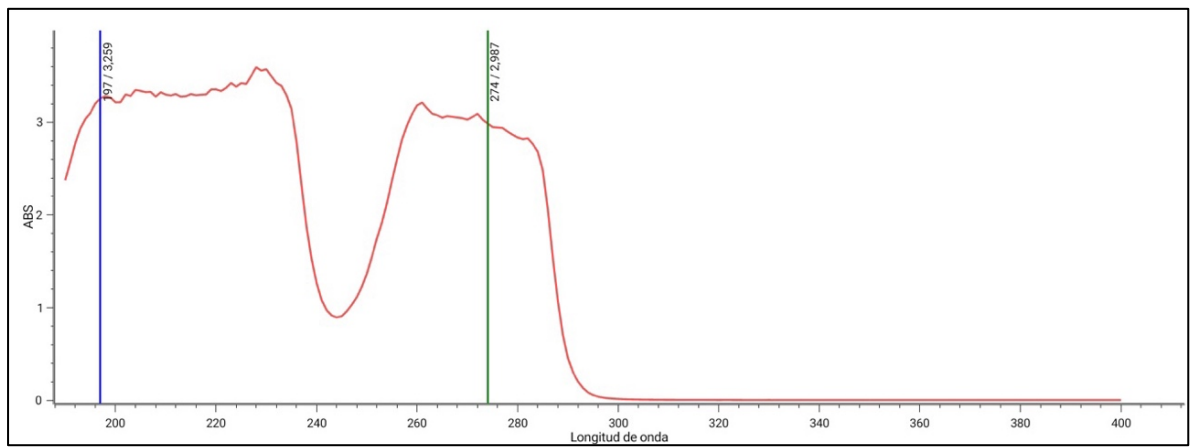
**5.3.4 Análisis de transparencia de hidrogeles mediante transmitancia en espectrofotómetro.** Para este ensayo se realizó el protocolo de Scartazzini, L. y cols. (2019). Para esto se cortaron películas del hidrogel a 7 días desde su gelificación de 1,0 cm x 4 cm y se adaptaron al interior de una cubeta de vidrio (SCC) de 10 mm x 10 mm para espectrofotómetro. La transparencia se midió por transmitancia (%) a 500 nm utilizando espectrofotómetro (Thermos, Genesys 150). La transmitancia total (100 % T) se determinó utilizando la misma cubeta vacía. Los datos obtenidos fueron analizados mediante software GraphPad Prism V 10.0.

**5.3.5 Curva estándar de timol.** Debido a que timol es uno de los componentes mayoritarios obtenidos en la caracterización del AEO utilizado en este estudio (Cid-Chevecich, C. y cols., 2022), se utilizó como marcador para realizar una curva estándar.

Tomando en cuenta la solubilidad reportada de timol en agua a 25 °C, se preparó una solución madre de 0,8 g/L. Luego, se realizó un barrido de absorbancia en el rango UV (190 - 400 nm) en un espectrofotómetro (Thermos, Genesys 150) (**Figura 7**). El pico de referencia de timol utilizado para este estudio es el de 274 nm.

Para realizar la curva de calibración, se prepararon disoluciones seriadas desde la solución madre y se midió la absorbancia de las distintas soluciones tomando como referencia 274 nm:

0. Solución madre 0,98 g/1000 ml → 980 ppm (1 g/l)
1. 81,63 ml de la solución madre en 200 ml de solución → 400 ppm (0,4 g/l)
2. 20,41 ml de la solución madre en 200 ml de solución → 200 ppm (0,2 g/l)
3. 10,2 ml de la solución madre en 200 ml de solución → 100 ppm (0,1 g/l)
4. 5,1 ml de la solución madre en 200 ml de solución → 50 ppm (0,05 g/l)
5. 2,55 ml de la solución madre en 200 ml de solución → 25 ppm (0,02 g/l)
6. 1,27 ml de la solución madre en 200 ml de solución → 12,5 ppm (0,0125 g/l)
7. 0 ml de la solución madre en 200 ml de solución → 0 ppm (0 g/l)



**Figura 7. Barrido de absorbancia en espectro de luz UV para solución madre de timol 0,8 g/l.** Se grafica absorbancia (ABS) en función de la longitud de onda. Línea verde indica señal de absorbancia para timol con longitud de onda en 274 nm, línea azul indica señal inespecífica detectada.

**5.3.6 Ensayo de control de liberación del hidrogel/AEO en agua destilada.** Para medir la liberación de AEO al medio, se utilizó como marcador de absorbancia el timol (274 nm) debido a que es uno de los componentes mayoritarios dentro la muestra vegetal utilizada. Así, se realizó una curva de absorbancia en el tiempo de la siguiente manera:

Para cada concentración de hidrogel/AEO preparada (0; 0,5 y 1 %), se adicionaron 10 discos uniformes de 6 mm de diámetro en un vaso precipitado con 10 ml de agua destilada sobre una placa con agitación magnética a 500 rpm a temperatura ambiente. Luego se tomaron alícuotas de 2000  $\mu$ l cada 15 min durante 255 min desde el centro de la dilución y se traspasaron a un tubo eppendorf de 2 ml. Las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm por 90 s en una centrífuga (Hermle, Z216MK). De las muestras centrifugadas se alicuotaron 1500  $\mu$ l desde el sobrenadante y se traspasó a una cubeta de cuarzo para medir la absorbancia a 274 nm en un espectrofotómetro (Thermos, Genesys 150). Se utilizó como blanco una muestra de 10 discos de hidrogel sin AEO completamente disueltas en 10 ml de agua destilada. Se registraron los datos obtenidos de absorbancia en función del tiempo y concentración de AEO en los discos utilizados.

**5.3.7 Cuantificación de la cantidad total de AEO contenida en los discos de hidrogel/AEO utilizados.** Una vez que se obtuvieron los valores de absorbancia en el tiempo para los geles con distintas concentraciones de AEO (0; 0,5 y 1 %) se procedió a expresar los resultados en función de la curva de calibración realizada previamente para timol (Sección 5.3.5). De esta manera, se reemplazaron los valores máximos de absorbancia obtenidas en la meseta de cada curva de liberación de hidrogeles/AEO (punto máximo de liberación de AEO) en la ecuación de la curva obtenida para timol, obteniendo las concentraciones de timol que contienen 10 discos de hidrogel.

Luego, se masó en triplicado ( $n = 3$ ) para obtener el promedio  $\pm$  DE, de las siguientes muestras:

- a) 10 discos de hidrogel con concentraciones de AEO de 0; 0,5 y 1 %.
- b) 1 disco de hidrogel con concentraciones de AEO de 0; 0,5 y 1 %.

Conociendo las masas (g) de 1 y 10 discos de hidrogel/AEO utilizados, se calculó cuánto timol contiene 1 disco de hidrogel mediante una regla de tres, usando la siguiente ecuación:

$$[\text{Timol en 1 Disco (ppm)}] = \frac{\text{Promedio masa 1 disco (g)} \times [\text{Timol 10 discos (ppm)}]}{\text{Promedio masa 10 discos (g)}}$$

Para expresar la concentración de timol según el sistema internacional de unidades, se calculará la equivalencia de la concentración en ppm calculadas anteriormente en milimoles por litro (mM), conociendo la masa molar reportada de timol (150,22) mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de timol (mM)} = \frac{\frac{\text{Concentración de timol (ppm)}}{150,22}}{1L}$$

Una vez calculada la concentración de timol contenida en 1 disco de hidrogel y conociendo el % de timol que contiene el AEO utilizado (14,2 %) según su caracterización (Cid-Chevecich, C. y cols., 2022), se calculó la concentración de AEO contenida en 1 Disco de hidrogel mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{AEO 1 Disco (ppm)}] = \frac{[\text{Timol 1 Disco (ppm)}] \times 100}{14,2}$$

#### **5.4 Actividad antifúngica del hidrogel/Aceite esencial de *O. vulgare***

**5.4.1 Cepas y condiciones de cultivo a utilizar.** Se utilizó la cepa de referencia de *C. albicans* ATCC 90029 (susceptible a fluconazol) para evaluar el efecto de los hidrogeles/AEO. La cepa fue sembrada en placas de agar *Sabouraud* Cloranfenicol (Biokar), incubadas a 37 °C por 24 - 48 h para obtener colonias de 1 -2 mm de diámetro y fueron mantenidas a 4 °C hasta el momento de su utilización.

**5.4.2. Ensayo de difusión por disco.** Para determinar el efecto antifúngico del aceite esencial y los hidrogeles, se realizó un ensayo de difusión por disco de acuerdo con el protocolo del CLSI (Sheehan, D. y cols., 2004) con mínimas modificaciones:

En primer lugar, a partir de una colonia de *C. albicans* de 1 - 2 mm de diámetro, se preparó una suspensión en buffer fosfato salino (PBS) ajustada a un patrón de turbidez de 0,5 McFarland. Luego, se realizó en triplicado una siembra en césped con la suspensión de trabajo en placas de agar *Sabouraud* cloranfenicol. Luego se adicionaron sobre el agar los discos de hidrogel conteniendo las distintas concentraciones de aceite esencial (0; 0,5 y 1%) o el control (fluconazol, 25 µg). Para las diferentes condiciones experimentales que se realizaron con hidrogeles, se utilizaron discos de hidrogel de 7 días de antigüedad desde su preparación.

Las placas fueron incubadas a 37 °C y se midió el diámetro de los halos de inhibición a las 24 h. Para el control de fluconazol, se determinó la susceptibilidad, susceptibilidad dosis-dependiente o resistencia respecto a los intervalos proporcionados por el CLSI, documento M44-4 (**Tabla 3**), midiendo el halo de inhibición de crecimiento con una regla milimetrada para determinar el efecto sobre colonias sembradas. Mientras que para los hidrogeles no existe una estandarización de halo de inhibición, por lo que se consideró cualitativamente la presencia de un efecto como la existencia de un halo de inhibición (Espinel-Ingroff, A., 2007).

**5.4.3 Ensayo de adhesión de *C. albicans* en superficie abiótica con método colorimétrico de cristal violeta.** Previo al ensayo, se realizó un preinóculo. Para ello, se tomó una colonia aislada de 1 - 2 mm de diámetro y se resuspendió en un tubo de 5 ml con medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich). Se agitó la muestra mediante vórtex durante 3 segundos para la disgregación de las colonias y posteriormente fue incubada por 24 h a 28 °C para obtener una suspensión levaduras en estado planctónico. Luego de este periodo, la suspensión fue ajustada a  $1 \times 10^6$  UFC/ml utilizando una cámara de conteo de Neubauer utilizando RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB 10 %) (Biological) para favorecer la filamentación del cultivo de *C. albicans*. Luego se adicionaron 1000 µl de la suspensión estandarizada en cada pocillo de una placa de 12 pocillos con fondo plano (Falcon).

**Tabla 3. Intervalos de halo de inhibición para clasificar susceptibilidad a fluconazol de *C. albicans* ATCC 90029** (Extraído y adaptado desde CLSI M44.4., 2009.)

Fármaco	Resistente	Dosis dependiente	Susceptible
Fluconazol	$\leq 14$ mm	15 - 18 mm	$\geq 19$ mm



Posteriormente la placa fue incubada durante 4 horas a 37 °C (periodo de adhesión) sin agitación en ausencia y en presencia de los distintos tratamientos señalados:

- Disco de hidrogel/AEO 0,5 %.
- Disco de hidrogel/AEO 1 %.
- Disco de hidrogel/0 como control negativo.

Se contó con pocillos en ausencia de tratamiento que sólo contuvieron la suspensión estandarizada en medio de cultivo, correspondiendo al control positivo de adhesión con el cual fueron comparadas las otras condiciones. Una vez finalizada la incubación, se extrajo el sobrenadante para descartar las células no adheridas y se lavó tres veces con 500 µl de solución de tampón fosfato salino (PBS) (Merk). A continuación, se añadieron 135 µl de solución de cristal violeta 0,1 % (Amresco) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente para permitir la tinción de las células adheridas. Posteriormente se lavó cuidadosamente 3 - 4 veces con PBS. Los pocillos fueron fotografiados para evaluar visualmente el efecto de los tratamientos sobre el proceso de adhesión, utilizando una cámara digital (Optika) acoplada a un microscopio invertido (LIEDER) y usando el software Optika Optikaproview. Luego, para cuantificar la adhesión, se procedió a solubilizar el cristal violeta con 500 µl de solución de ácido acético 10 % (Sigma-Aldrich) y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. Finalmente se trasladó el sobrenadante coloreado a una nueva placa y se midió la absorbancia a  $\lambda = 570$  nm en un lector de placas Infinite F50 (Tecan). Los resultados fueron expresados como porcentaje de adhesión respecto al control.

## 5.5 Análisis estadístico

Todos los experimentos fueron realizados en triplicado y de forma independiente al menos tres veces ( $n = 3$ ). Los valores están expresados como promedio y desviación estándar. Los datos fueron analizados a través del software *GraphPad Prism* versión 10.0.

Para la curva estándar de los ensayos de liberación controlada de los hidrogeles se realizó una regresión lineal de absorbancia medida en función de las concentraciones estipuladas ( $n = 3$ ), interpolando una curva estándar lineal y obteniendo el  $r^2$ . Se consideró como estadísticamente significativas un  $r^2$  mayor a 0,9.

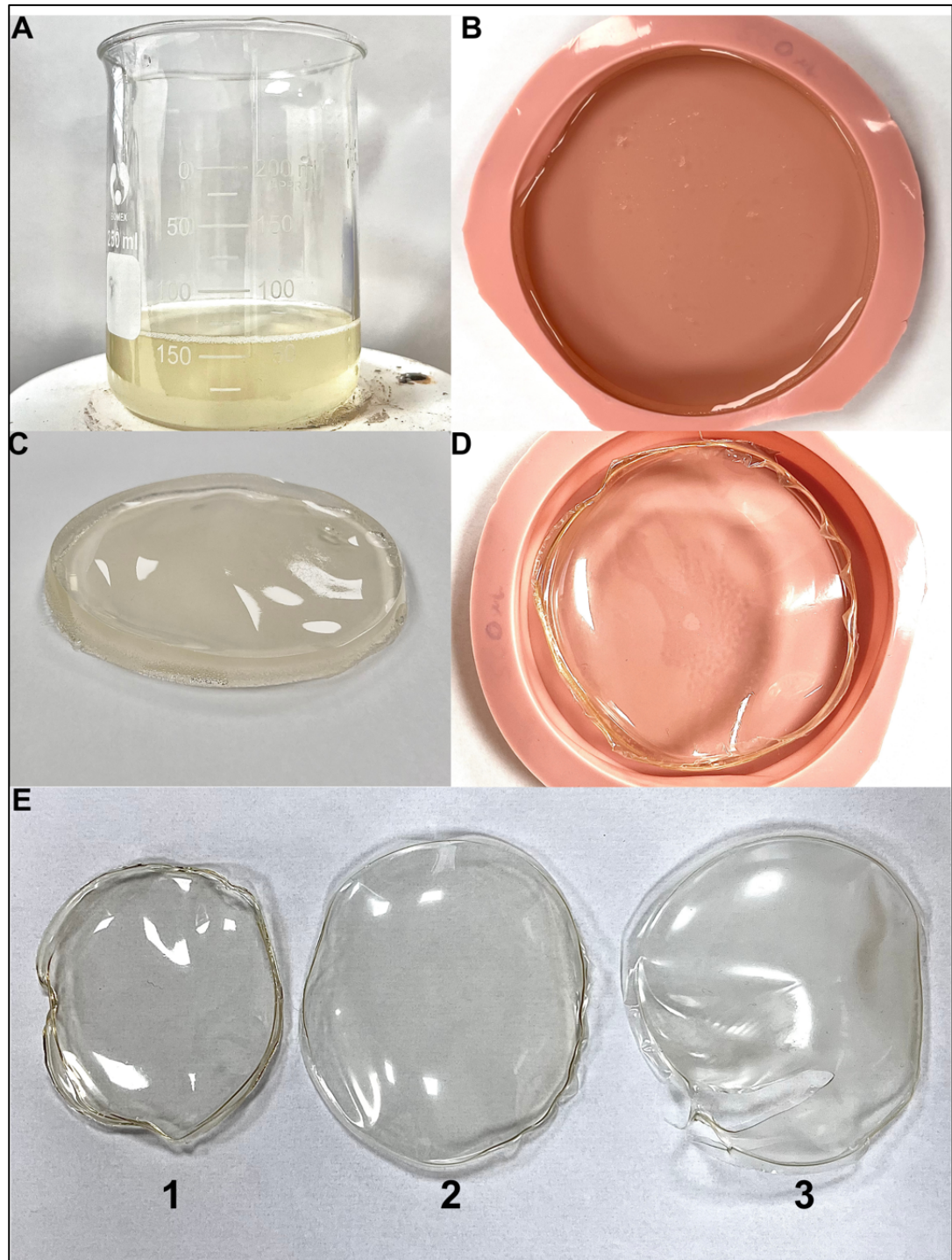
Para los ensayos de difusión por disco y de adhesión en superficie abiótica, para determinar si las variaciones en los resultados entre los diferentes grupos son estadísticamente significativas se determinó si la distribución de los datos corresponde a una distribución Gaussiana mediante test de Shapiro Wilk, posteriormente se realizó un análisis de ANOVA de una vía. Se consideraron como estadísticamente significativas las diferencias que tengan un valor de  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

**6.1 Formulación del hidrogel.** Como se mencionó en métodos, se realizó la formulación de hidrogel con AEO, siguiendo el protocolo de Scartazzini, L. y cols. 2019, con algunas modificaciones.

Se obtuvieron soluciones homogéneas para las concentraciones estipuladas de AEO en los hidrogeles; se dosificaron los hidrogeles en placas de silicona antiadherentes de 10 cm de diámetro y luego se almacenaron a 4 °C para su gelificación y posteriormente cuantificar su pérdida de masa en el tiempo y así determinar cuál es la concentración y tiempo de secado óptimos para poder seccionarlos (**Figura 8**).

**6.2 Pérdida de humedad en función del tiempo y selección del momento óptimo para la utilización del hidrogel.** Se obtuvo que los hidrogeles perdieron masa de forma lineal, disminuyendo en aproximadamente un 15 % su masa cada 24 h, estabilizándose esta pérdida de masa a los 7 días (168 h, **Tabla 4; Figura 9**). Se constató que los hidrogeles a 72 h de su gelificación perdieron ~ 50 % de su masa, volviéndose frágiles y se disgregaban fácilmente al manipularlos (**Figura 10A**). A tiempos de incubación mayores fue posible observar que la máxima pérdida de masa se obtuvo a las 168 horas (90 %). En este tiempo, se obtuvieron láminas deshidratadas transparentes y de consistencia plástica, firme y manipulable que no se disgregó ni fracturó a la manipulación. No hubo cambios significativos entre 168 y 216 h, por lo que se determinó que el tiempo óptimo de deshidratación de los hidrogeles es de 168 h para poder manipularlos y seccionarlos en discos uniformes de 6 mm de diámetro (**Figura 10B**).

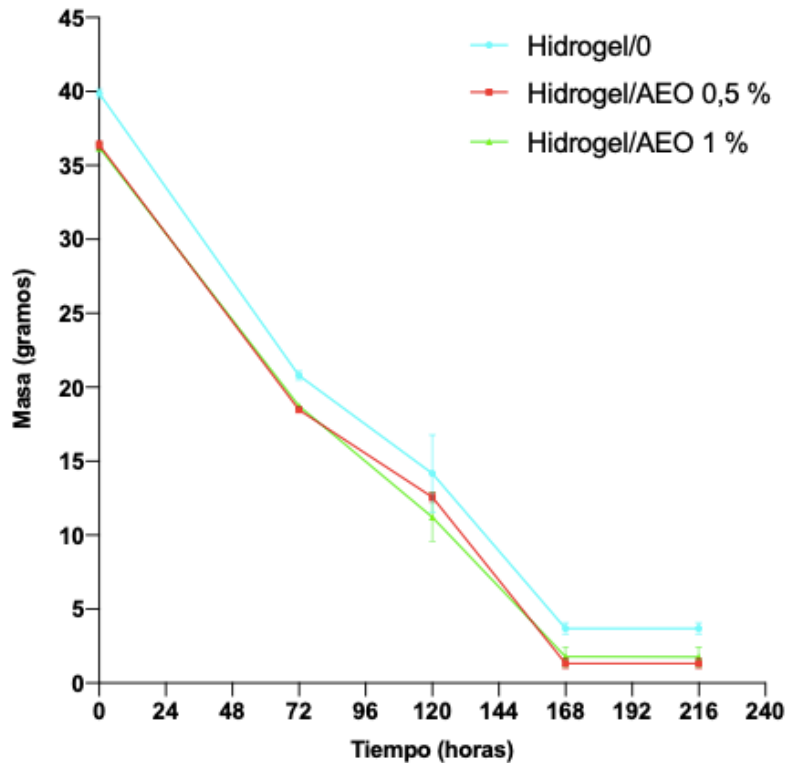


**Figura 8. Registro fotográfico de hidrogel dosificados en placas de silicona de 10 cm de diámetro y su proceso de secado. A.** Mezcla de hidrogel lista para dosificar en placas de silicona antiadherente. **B.** Hidrogel gelificado a 24 h de su preparación. **C.** Hidrogel a 72 h de su preparación. **D.** Hidrogel a 216 h de su preparación. **E.** hidrogel desmoldados listos para su posterior sección en discos; **E1)** Hidrogel/0, **E2)** Hidrogel/AEO 0,5 %, **E3)** Hidrogel/AEO 1%.

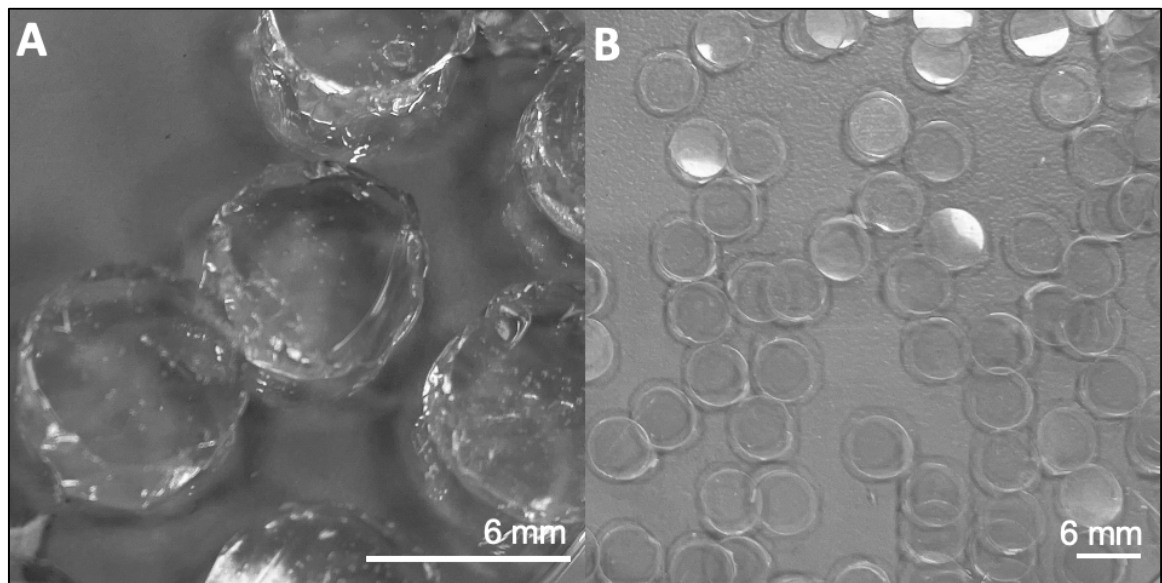
**Tabla 4. Masa promedio (g) de hidrogeles en placa de silicona 10 cm de diámetro según su concentración en función del tiempo y su porcentaje (%) de humedad.**

	Masa (g) hidrogel/0 / % de humedad	Masa (g) hidrogel/AEO 0,5 % / % de humedad	Masa (g) hidrogel/AEO 1 % / % de humedad
<b>0 h</b>	39,87 g ± 0,30 / 100 %	36,83 g ± 0,31 / 100 %	36,21 g ± 0,26 / 100 %
<b>72 h</b>	20,79 g ± 0,29 / 52,1 %	18,47 g ± 0,15 / 50,1 %	18,73 g ± 0,11 / 51,7 %
<b>120 h</b>	14,17 g ± 2,60 / 35,5 %	12,56 g ± 0,33 / 34,1 %	11,22 g ± 1,67 / 30,9 %
<b>168 h</b>	3,68 g ± 0,38 / 9,2 %	1,32 g ± 0,34 / 3,5 %	1,99 g ± 0,51 / 5,4 %
<b>216 h</b>	3,67 g ± 0,39 / 9,2 %	1,31 g ± 0,35 / 3,5 %	1,98 g ± 0,53 / 5,4 %

Los valores de masa de todas las columnas representan el promedio de 3 experimentos independientes (n = 3) ± DE.



**Figura 9. Pérdida de masa (g) en el tiempo para hidrogeles/0 e hidrogeles/AEO 0,5 y 1 %. Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes (n = 3) ± DE.**

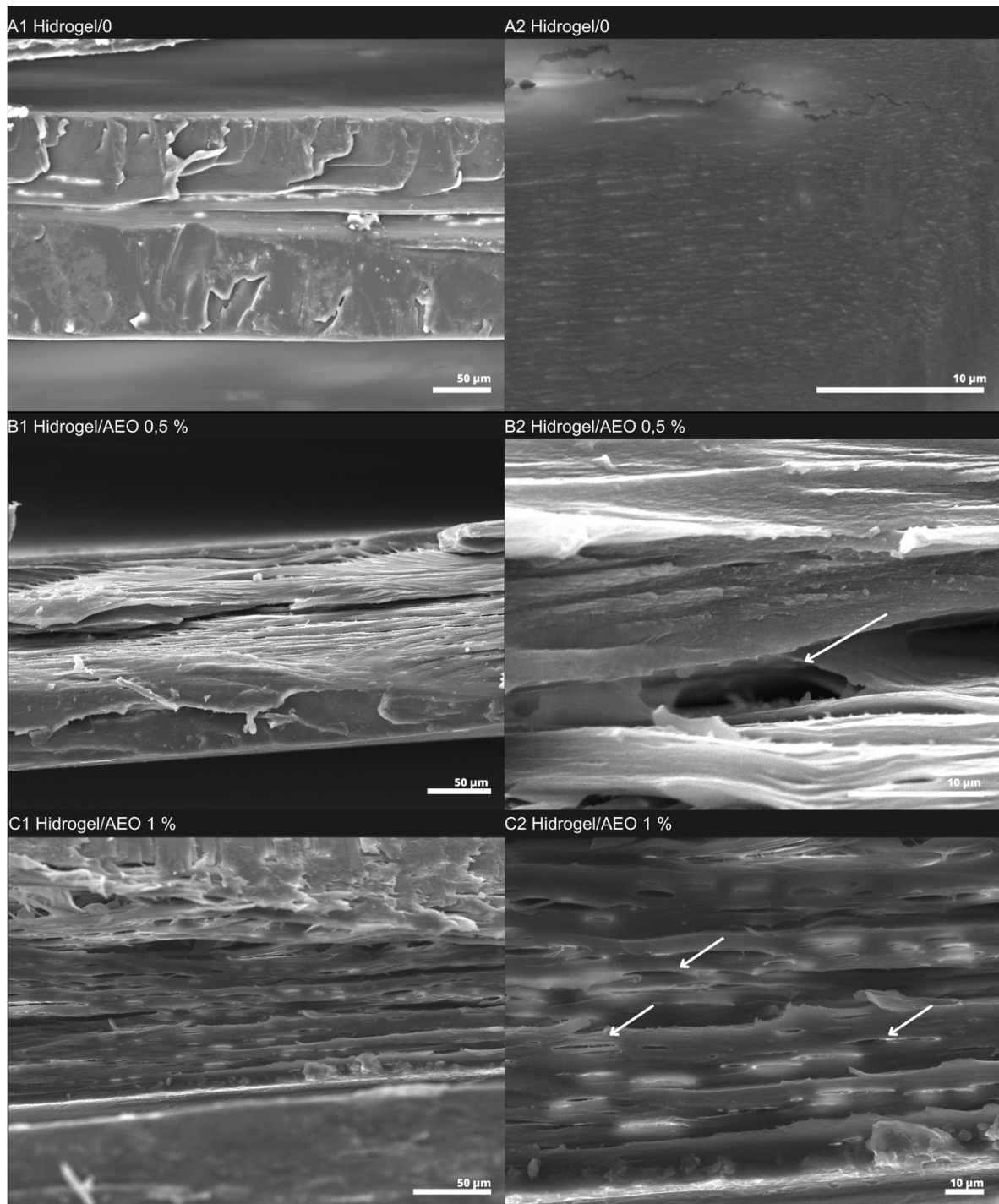


**Figura 10. Hidrogeles a diferentes horas desde su gelificación. A.** Hidrogel a 72 h de su gelificación. **B.** Hidrogel a 168 h desde su gelificación, seccionado a 6 mm de diámetro.

**6.3. Morfología de los hidrogeles visualizada con microscopía electrónica de barrido.** Se estudió la microestructura de la sección transversal de película de hidrogeles 0; 0,5 y 1 % de AEO mediante microscopía electrónica de barrido presentadas en las micrografías de la **figura 11**. Se observó que las secciones transversales de los hidrogeles muestran una estructura de disposición laminar (Figura 11A1 - B1 - C1); sin embargo, en hidrogeles/AEO 0,5 y 1 % se observaron espacios dentro de la estructura, los cuales fueron observados con mayor aumento y determinar si estos espacios se presentaban dentro de toda la estructura. Se constata que los hidrogeles/AEO 0,5 y 1 % presentaron espacios que se encontraron a lo largo de la estructura de los hidrogeles que oscilaron entre 10 - 15  $\mu\text{m}$  de diámetro y que corresponderían los sitios en donde se encuentra el AEO, en cambio los hidrogeles/0 tuvieron una disposición homogénea y compacta sin dichos espacios (Figura 11A2 - B2 - C2).

**6.4 Transparencia de hidrogeles mediante transmitancia en espectrofotómetro.** Al analizar la transparencia de los hidrogeles 0; 0,5 y 1 % de AEO mediante transmitancia de luz a 500 nm, se obtuvo que la transparencia de los hidrogeles/AEO 0,5 y 1 % disminuyó en comparación con el hidrogel/0. Obteniendo que el hidrogel sin aceite esencial tuvo una transparencia de ~ 87 %, disminuyendo en un 2,9 % para el hidrogel/AEO 0,5 %; sin embargo, esta disminución fue mayor para el hidrogel/AEO 1 %, disminuyendo en un 11 % aproximadamente (**Tabla 5**). Los valores fueron estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

**6.5 Determinación de la liberación de aceite esencial desde el hidrogel.** Debido a que el aceite esencial utilizado en este estudio cuenta con más de 30 moléculas como parte de su composición, la cuantificación de la liberación del AEO desde el hidrogel debió ser normalizada respecto a uno de sus componentes principales, en este caso timol (Cid-Chevecich, C. y cols., 2022). Se escogió este compuesto debido a que presenta solubilidad en medio acuoso, por lo tanto, es posible ir midiendo en el tiempo la concentración de timol a medida que se va liberando desde el hidrogel a través de la medición de su absorbancia. Al saber además el porcentaje de timol presente en el aceite esencial podemos hacer una relación con la cantidad de AEO liberado en función del tiempo.



**Figura 11. Microscopía electrónica de barrido de sección transversal de hidrogel/0 e hidrogel/AEO 0,5 y 1 % a distintos aumentos (300 - 4300x). A1. 300x. A2. 4300x. B1. 330x. B2. 3500x. C1. 400x. C2. 1000x. Flechas señalan espacios en estructura de hidrogel de 10 – 15 μm de diámetro.**



**Tabla 5. Transparencia de hidrogel/AEO a diferentes concentraciones.**

	<b>Transmitancia (%)</b>
<b>Hidrogel/0</b>	87,2 ± 1,0
<b>Hidrogel/AEO 0,5 %</b>	84,3 ± 1,1*
<b>Hidrogel/AEO 1 %</b>	76,2 ± 0,8*

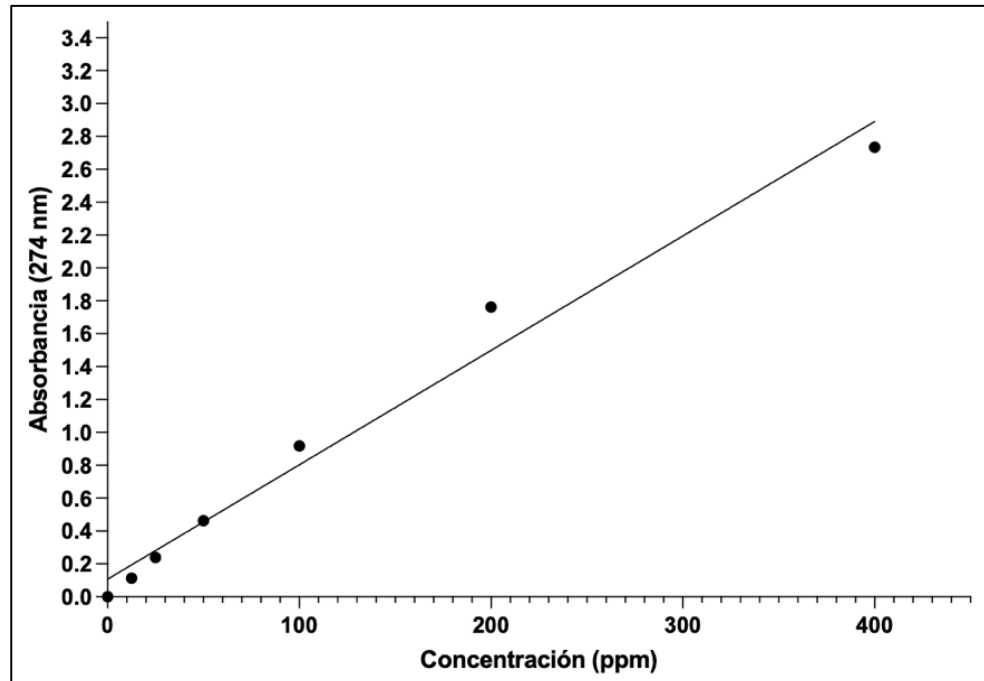
Los valores de transparencia representan el promedio de 3 experimentos independientes (n = 3) ± DE. \* p < 0,05 respecto al control, ANOVA.

Para esto, en primer lugar se realizó un barrido entre 190 - 400 nm obteniendo que el pico de absorbancia de timol se encontró en 274 nm. Con esta información, se construyó una curva estándar de timol usando 7 concentraciones de timol disuelto en agua destilada (**Figura 12**).

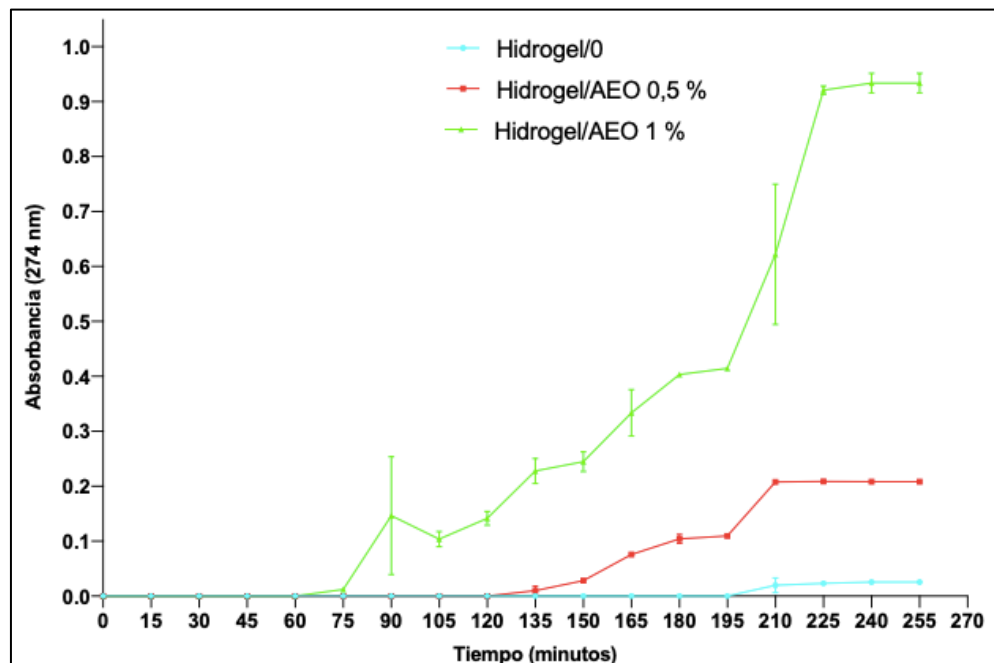
**6.6 Ensayo de control de liberación del hidrogel/AEO en agua destilada.** Se procedió a determinar la liberación del AEO desde el hidrogel en agua destilada, en función del timol cuantificado en el tiempo.

Para los Hidrogeles/0 (control), se obtuvo que la absorbancia de la muestra tuvo valores positivos desde los 210 min con una absorbancia de 0,01; sin embargo, no hubo aumento de los valores en el tiempo. Sólo fue posible observar una pequeña meseta de absorbancia de 0,02 entre los 225 y 255 minutos. Por el contrario, en el caso de los Hidrogeles/AEO 0,5 % se observó un aumento de absorbancia de manera no lineal comenzando a los 135 min con valores de absorbancia cercanos a 0,01 hasta aproximadamente los 195 min. A partir de ese punto, se observó un aumento abrupto de absorbancia que coincidió con el momento en que los hidrogeles se solubilizaron completamente. Luego de 210 min aproximadamente se obtuvo una meseta con una absorbancia de 0,208. Finalmente, para los Hidrogeles/AEO 1 %, se obtuvo que la curva tuvo un crecimiento de absorbancia no lineal comenzando a los 75 min con absorbancia de 0,01 hasta aproximadamente los 195 min. Entre los 195 y 225 min tuvo un crecimiento exponencial abrupto que coincidió con la solubilización completa de los hidrogeles en el medio. Luego de 225 min aproximadamente se obtuvo una meseta con una absorbancia de 0,929 (**Figura 13**).

**6.7 Cuantificación de la cantidad total de AEO contenida en los hidrogeles utilizados.** La cantidad aproximada de AEO contenida en los hidrogeles, se interpoló en la curva estándar de timol y así se obtuvo la cantidad de timol contenida en 10 discos de hidrogel, luego se utilizó la ecuación del método 5.3.7 para obtener la cantidad de timol contenida en 1 disco de hidrogel y finalmente, conociendo el % de timol de la muestra, se calculó la concentración de AEO contenida en 1 disco de hidrogel. Así se obtuvo que los discos de hidrogel/AEO 0,5 y 1 % contienen 9,28 y 70,86 ppm de AEO aproximadamente (**Tabla 6**).



**Figura 12. Curva estándar de Timol.** Los valores representan el promedio de 3 experimentos independientes ( $n = 3$ )  $\pm$  DE. DE de orden muy bajo no mostradas en el gráfico ( $< 0,01$  para cada dato). Ecuación de la recta  $y = 0,0068x + 0,1403$ .  $r^2 = 0,97$ .



**Figura 13. Curva de ensayo de control de liberación para hidrogel/0 e hidrogel/AEO 0,5 y 1 %.** Los valores representan el promedio  $\pm$  DE para cada medición ( $n = 3$ ).

**Tabla 6. Tabla resumen de valores obtenidos para masas de discos de hidrogel y cálculo de concentración de timol (ppm y mM) y AEO (ppm).**

	Hidrogel/0	Hidrogel/AEO 0,5 %	Hidrogel/AEO 1 %
<b>Masa (g) 10 discos</b>	0,071 ± 0,006	0,066 ± 0,004	0,100 ± 0,008
<b>[timol] (ppm) 10 discos</b>	0	14,5	111,81
<b>Masa (g) 1 disco</b>	0,007 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,009 ± 0,001
<b>[timol] (ppm) 1 disco</b>	0	1,31	10,06
<b>[timol] (mM) 1 disco</b>	0	8.77	67.01
<b>[AEO] (ppm) 1 disco</b>	0	9,28	70,86

Los valores de masa de todas las columnas representan el promedio de 3 experimentos independientes ± DE.

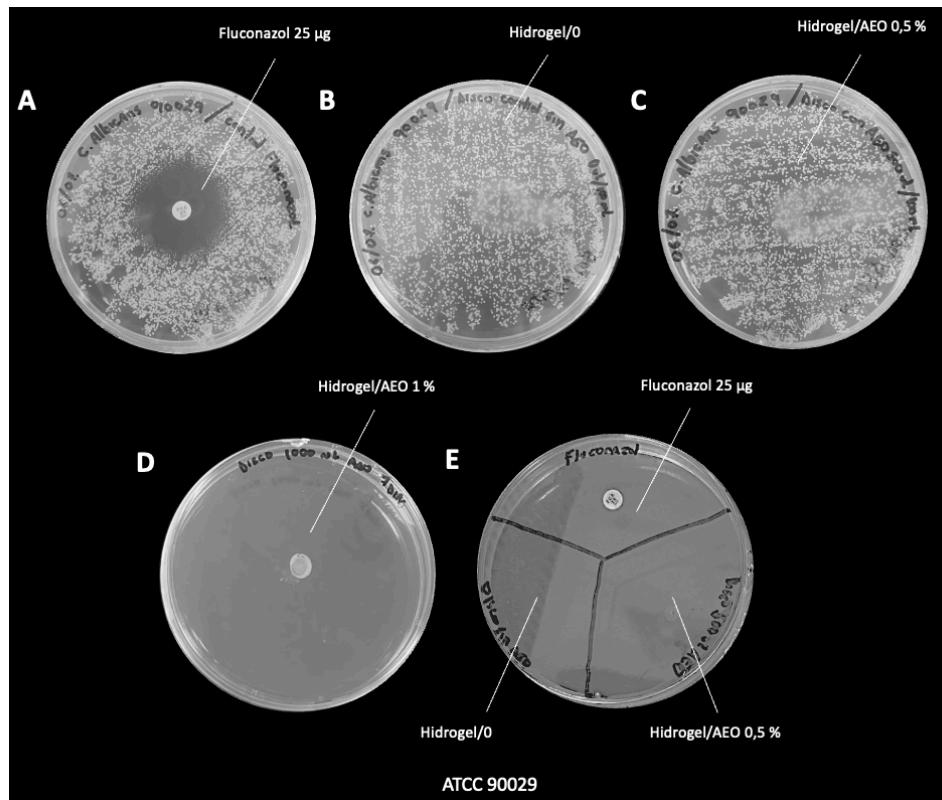
**6.8 Efecto *in vitro* del hidrogel/AEO sobre el crecimiento de *C. albicans* (ATCC 90029).** Una vez que determinamos la liberación de aceite esencial desde los hidrogeles, procedimos a evaluar el efecto antifúngico del hidrogel/AEO sobre *C. albicans* a través del ensayo de difusión en placas de agar según lo descrito en el método 5.4.2.

En un primer ensayo, luego de sembrar la cepa de *C. albicans*, se dispusieron de forma equidistante 3 discos de difusión en placas de agar *Sabureaud* cloranfenicol, conteniendo fluconazol (25 ug, control positivo), hidrogel/0 (control negativo) y finalmente hidrogel/AEO 0,5 % (**Figura 14E**). La figura 14A muestra que en una placa de agar sembrada sólo en presencia del disco estándar de fluconazol, se obtuvo un halo de inhibición para la cepa utilizada (**Figura 14A**). En el caso de los discos de hidrogel/0 e hidrogel/AEO 0,5 % no hubo un halo de inhibición (**Figura 14B y 14C**). Finalmente, utilizando un disco de hidrogel/AEO 1 %, se obtuvo una inhibición completa del crecimiento de *C. albicans* en la placa (**Figura 14D**).

Debido a que las placas que contenían hidrogel/AEO 0,5 %, fluconazol e hidrogel/0 (Figura 14E) y la placa con hidrogel/AEO 1 % (Figura 14D) generaron una inhibición completa en la placa, para expresar su efecto al ser una prueba cualitativa, se consideró el diámetro de la placa (88 mm) como el halo de inhibición obtenido (**Tabla 7**).

**6.9 Efecto *in vitro* del hidrogel/AEO sobre la adhesión de *C. albicans* (ATCC 90029) a una superficie abiótica.**

La adhesión de *C. albicans* corresponde a un factor de virulencia crítico que le permiten invadir tejidos y formar biopelículas. Por este motivo, se determinó el efecto de la formulación del hidrogel/AEO sobre la adhesión de *C. albicans* ATCC 20029 sobre una superficie abiótica, a través del método de cristal violeta, como se señala en la sección 5.4.3 en métodos.



**Figura 14. Efecto del hidrogel/AEO, en diferentes concentraciones, sobre el crecimiento de *C. albicans* ATCC 90029 *in vitro*.** **A.** Control positivo; halo de inhibición de fluconazol mayor a 19 mm, clasificado como susceptible. **B.** Control negativo; no hubo halo de inhibición en presencia de hidrogel/0. **C.** No hubo halo de inhibición en presencia de hidrogel/AEO 0,5 %. **D.** No hubo crecimiento de *C. albicans* en presencia de hidrogel/AEO 1 %. **E.** No hubo crecimiento de *C. albicans* en presencia de fluconazol junto a hidrogel/0 e hidrogel/AEO 0,5 %.

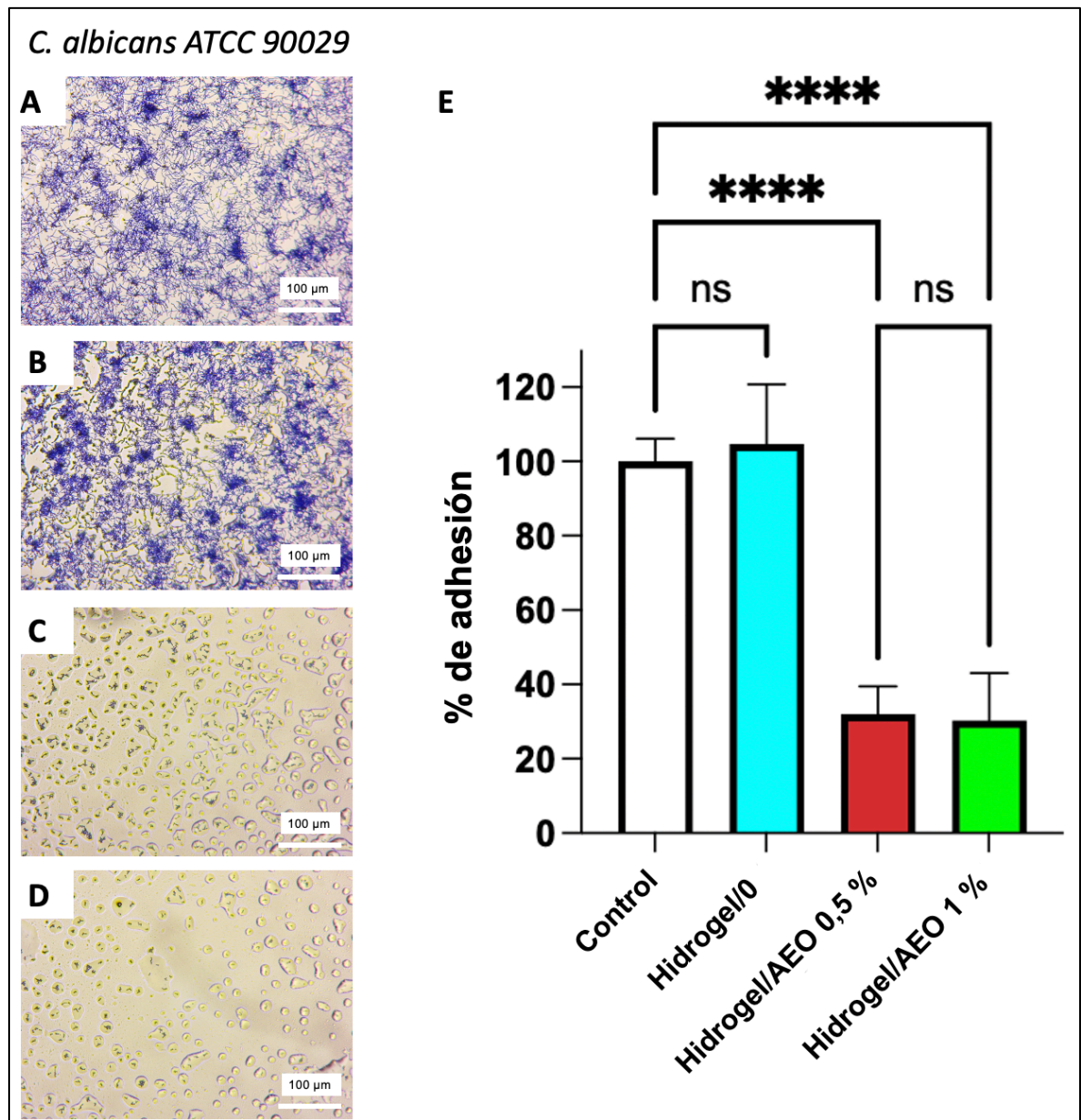
**Tabla 7. Halo de inhibición promedio de *C. albicans* ATCC 90029 para hidrogel/AEO a diferentes concentraciones.**

Muestra	Halo de inhibición (mm)
Fluconazol + hidrogel/AEO 0,5 % + hidrogel/0	88 ± 0
Fluconazol	31 ± 1,2
Hidrogel/0	0 ± 0
Hidrogel/AEO 0,5 %	0 ± 0
Hidrogel/AEO 1 %	88 ± 0

Los datos representan el promedio 3 experimentos (n = 3) ± DE.

La figura 15 muestra las imágenes obtenidas de las placas luego del periodo de adhesión en presencia y ausencia de los tratamientos, además de su cuantificación. Se puede observar que en el control sin tratamiento, se formó una capa de células con una alta densidad además de una alta presencia de células filamentosas (**Figura 15A**). Al tratar la muestra con hidrogel sin AEO, se obtuvo una adhesión de similares características al control (**Figura 15B**). Sin embargo, tanto en las muestras tratadas con hidrogel conteniendo 0,5 % AEO y 1 % AEO se identificó una menor densidad celular adherida a la placa, además de una ausencia evidente de células filamentosas. Otra observación importante es que las células adheridas estaban encapsuladas en gotas de aceite de ~ 10  $\mu\text{m}$  de diámetro con ausencia de células entre las gotas (**Figura 15C - D**).

En cuanto a la cuantificación del porcentaje de adhesión de las muestras tratadas con hidrogeles con respecto al control, se obtuvo que *C. albicans* en presencia de los hidrogeles que contienen 0,5 % AEO y 1 % AEO tuvieron una significativa disminución del porcentaje de adhesión en un 70 % y 72 % respectivamente al control ( $p < 0,0001$ ), sin diferencias estadísticamente significativas entre ambas. En cambio el hidrogel sin AEO promovió un incremento en el porcentaje de adhesión de un 16 % sin diferencias estadísticamente significativas respecto del control (**Figura 15E**).



**Figura 15. Efecto del hidrogel/AEO, en diferentes concentraciones, sobre la adhesión de *C. albicans* (ATCC 90029) *in vitro*.** **A.** Control positivo sin hidrogel **B.** Efecto de hidrogel/0. **C.** Efecto de hidrogel/AEO 0,5 %. **D.** Efecto de hidrogel/AEO 1 %. **E.** Cuantificación del porcentaje de adhesión. Barras representan el promedio  $\pm$  DE del porcentaje de adhesión (n = 3). ns = no significativo; \*\*\*\*p < 0,0001 con respecto al control (ANOVA de una vía, post test Tukey).



## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Obtención del hidrogel/aceite esencial de *O. vulgare*

En la búsqueda de alternativas terapéuticas para el control de crecimiento de especies fúngicas, se han estudiado los aceites esenciales de numerosas plantas. Como ya fue expuesto, los componentes de los aceites esenciales difieren aún entre una misma especie, según la ubicación geográfica, condiciones climáticas, estación del año en que se obtenga la muestra para realizar la extracción, entre otros (Bozovic, M. y cols., 2017). Se han identificado diversos componentes con propiedades antifúngicas de los aceites esenciales de los cuales destacan los terpenoides con grupos alcohol (-OH) en su fórmula química tales como timol y carvacrol (Santos, A. y cols., 2019).

En cuanto a la selección de la muestra vegetal, se decidió utilizar *O. vulgare*, del cual ya se han estudiado las propiedades antifúngicas de su aceite esencial, arrojando resultados prometedores debido que además presenta un potente efecto antibiopelícula sobre *C. albicans*. Así, al caracterizar la muestra vegetal utilizada para este estudio, se obtuvo que un 64 % de los componentes fueron terpenos oxigenados, cuyo componente en mayor porcentaje fue cis-sabineno hidrato (16,72 %), seguido de timol (14,2 %) (Cid-Chevecich, C. y cols., 2022). Estos resultados difieren de la caracterización de *O. vulgare* reportada por Giordani, R. y cols. (2004), donde obtuvieron para la misma especie un 81 % de la muestra corresponde a carvacrol y un 9,4 % a timol. La explicación de estos resultados está en concordancia con lo anteriormente expuesto, donde para ambas muestras sus componentes mayoritarios fueron terpenoides con fenoles alcohólicos; sin embargo, debido a que las muestras vegetales provienen de orígenes diferentes, es esperable que la composición también sea distinta.

Actualmente, las alternativas para formular un producto que utilice los aceites esenciales como fármaco para el tratamiento de infecciones orales causadas por *C. albicans* son limitadas. En este sentido los productos farmacéuticos para uso oral utilizados actualmente son principalmente emulsiones, encapsulación mediante ciclodextrinas, liposomas, nanopartículas poliméricas, sprays, entre otras (Juniatik, M. y cols., 2017; Oliveira-Filho, R. y cols., 2018; Lelis, C. y cols., 2021; Altay, Ö. y

cols., 2022). Sin embargo, surge la necesidad de desarrollar formulaciones que sinteticen un dispositivo físico cuyo objetivo sea como tratamiento o coadyuvante local para infecciones por *C. albicans* que sea de fácil administración y permita un efecto sostenido en el tiempo. De esta manera, existen estudios que guardan relación con el uso de formulaciones que integran hidrogeles con aceites esenciales como dispositivo para su utilización (Kavoosi, G. y cols., 2013; Scartazzini, L. y cols., 2019; Ahmad, M. y cols., 2012; Liakos, I. y cols., 2014; Tongnuanchan, P. y cols., 2014).

En esta línea, Kavoosi, G. y cols. 2013, evaluaron las propiedades mecánicas, físicas y antimicrobianas de hidrogeles de gelatina que contenían timol incorporado en forma de láminas. Estas láminas tenían la finalidad de ser utilizadas como andamio para el proceso de cicatrización de heridas. Para este propósito las láminas fueron preparadas con soluciones de gelatina al 10 % m/v con concentraciones de timol al 1; 2; 4 y 8 % m/v. Además se incorporó glicerol (25 % m/v) como plastificante y glutaraldehído (2 % m/m) como agente entrecruzador. Como resultado obtuvieron que las láminas tuvieron alta resistencia tensil y elongación, baja solubilidad en agua, baja hinchazón, baja adsorción de agua y baja permeabilidad al vapor de agua, pero al añadir timol estos valores disminuyeron significativamente; sin embargo, obtuvieron excelentes propiedades antioxidantes y antibacterianas (Kavoosi, G. y cols., 2013). Así mismo Scartazzini, L. y cols. (2019), formularon y caracterizaron hidrogeles con gelatina 4 % m/v y aceite esencial de *Mentha Arvensis* en concentraciones de 0; 0,06; 0,13; 0,25; 0,38 y 0,5 % m/m de gelatina. Además se incorporó glicerol (0,13 % m/m gelatina) como plastificante y Tween-80 (0,06 % m/m gelatina) como agente entrecruzador, obteniendo resultados similares al estudio previamente descrito, donde los hidrogeles al adicionar el aceite esencial tuvieron menores propiedades mecánicas y ópticas, entre ellas menor resistencia tensil, mayor elongación, mayor opacidad y menor transparencia (Scartazzini, L. y cols., 2019).

Un aspecto innovador de este trabajo fue utilizar los hidrogeles deshidratados, sin adición de plastificante, lo que se tradujo en mejorar sus propiedades mecánicas cualitativamente ya que los hidrogeles recién hechos sin plastificante no fueron manipulables; sin embargo, a lo largo del tiempo se observó que los hidrogeles pierden masa de forma lineal, disminuyendo en

aproximadamente un 15 % su masa cada 24 h hasta 168 h (7 días). De esta manera, se obtuvieron láminas firmes y secas con espesor inferior a 1 mm y que de igual manera se hidratan y liberan el AEO al medio. Esto podría ser una posible ventaja en la formulación, ya que disminuye la cantidad de componentes, asociado a un menor costo, simplicidad en la preparación, menor probabilidad de reacciones adversas y mejores propiedades organolépticas, una característica importante si el objetivo de esta preparación es ser estudiada a futuro en la cavidad oral.

En cuanto al estudio de propiedades físicas y estructurales de los hidrogeles, un análisis de relevancia es el estudio de la microestructura de la sección transversal de película de los hidrogeles. Esto es, debido a que nos permite estudiar si luego de la formulación del hidrogel, existe una encapsulación del aceite dentro de la matriz y si es así, observar de qué forma se realizó. De esta manera, en este trabajo se estudió la microestructura de los hidrogeles/0 e hidrogeles/AEO 0,5 y 1 % mediante microscopía electrónica de barrido.

Así, se observó que los hidrogeles muestran una estructura de disposición laminar; sin embargo, los hidrogeles en los cuales se encapsuló AEO, presentaron espacios que oscilaron entre 10 - 15  $\mu\text{m}$  de diámetro dentro de su estructura, en comparación a los hidrogeles sin AEO que muestran una estructura ordenada y compacta. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Scartazzini, L. y cols. (2019) donde prepararon hidrogeles en base a gelatina con inclusiones de aceite esencial de *M. arvensis* y realizaron el estudio de su sección transversal mediante microscopía electrónica de barrido. De esta manera, observaron espacios dentro de la estructura de los hidrogeles entre 5 - 18  $\mu\text{m}$  que interpretaron como aglomerados de aceite en forma de gotas, confirmando esto mediante microscopía laser de barrido confocal. De esta manera, postulan que a menor concentración de aceite esencial se obtienen estructuras menos rugosas y más compactas, sugiriendo que a menor concentración del aceite existe una mejor incorporación de este a la matriz de hidrogel (Scartazzini, L. y cols, 2019).

Por otro lado, el estudio de la transparencia del hidrogel se utilizó como método adicional para estudiar cualitativamente si luego de gelificar los hidrogeles hubo una incorporación del aceite a la preparación. Así, se obtuvo que la transparencia de los hidrogeles disminuye a medida que aumenta la concentración de AEO, por lo que se constata cualitativamente que existe una mayor carga de aceite en los hidrogeles

preparados con mayores concentraciones durante la formulación. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Scartazzini, L. y cols. (2019) y Ahmad, M. y cols. (2012), donde obtuvieron que al incorporar mayores concentraciones de aceites esenciales dentro de un hidrogel de gelatina, se redujo la transparencia. De esta manera, constatan que la transmisión de luz probablemente dependía de la distribución del aceite esencial en la matriz del hidrogel así como la interacción entre aceite esencial y gelatina, llevando a diferencias en la transmisión de la luz (Scartazzini, L. y cols., 2019; Ahmad, M. y cols., 2012).

El objetivo principal de utilizar los hidrogeles como una formulación que contenga aceites esenciales es permitir que estos puedan liberarse de manera sostenida y controlada en el tiempo a bajas concentraciones. Esto es una característica propia de hidrogeles que en presencia de agua se hinchan y aumentan su volumen, lo que les aporta la propiedad de absorber, retener y liberar bajo condiciones controladas algunas soluciones orgánicas a una velocidad determinada (Arredondo, A. y Londoño, M., 2009; Chopra, H. y cols., 2022). De esta manera, se puede obtener un efecto prolongado y con mínima toxicidad sobre el tejido de la mucosa oral. Existen limitados métodos para poder medir la liberación de aceites esenciales a partir de un hidrogel. Por ejemplo, Liakos, I. y cols. (2014) evaluaron a través de la disolución de un hidrogel de alginato en agua destilada y determinaron cualitativamente en base a la tinción de la solución la liberación de aceite esencial de *Matricaria chamomilla linnaeus* debido a su color característico obteniendo que existe una liberación inicial a los primeros segundos y que luego de 10 min existe una liberación total con la solubilización completa del hidrogel (Liakos, I. y cols., 2014).

En cuanto al estudio de control de liberación, en este trabajo se propuso como método la medición de la absorbancia del medio en el cual el hidrogel se solubiliza (agua destilada) en intervalos de tiempo seriados para conocer si existe una liberación controlada de AEO en el tiempo y de ser así cuantificar la cantidad de aceite entregada para cada disco. Se utilizó la longitud de onda de absorbancia de timol como marcador de referencia para medir la absorbancia de las muestras en este ensayo. Se seleccionó timol ya que es una molécula soluble en agua, siendo factible de preparar en solución y que además fue un componente mayoritario detectado para el *O. vulgare* utilizado en este estudio (14,2 %) (Cid-Chevecich, C.

y cols., 2022). Por otro lado, este compuesto es un fenol alcohólico con reconocidas propiedades antifúngicas y se encuentra contenido dentro de aceites esenciales de diferentes especies vegetales (Giordani, R. y cols., 2004).

El ensayo de control de liberación se realizó mediante la dilución de 10 discos de hidrogel de 6 mm de diámetro, ya que las concentraciones de timol que contienen los discos de hidrogel/AEO 0,5 y 1 % son muy bajas (8,7 y 67 mM respectivamente), por lo que la liberación de AEO desde 1 disco para las mediciones iniciales fue muy baja, siendo improbable que el equipo logre distinguirlo. Por otro lado, se decidió utilizar agua destilada para el ensayo debido a que esta no presenta una absorbancia detectable por el equipo en el rango de luz UV que altere las mediciones. Un inconveniente para este método fue que al utilizar como blanco únicamente agua destilada las absorbancias de las muestras sin AEO tuvieron valores positivos, siendo contrario a lo esperable. Ante esto se realizó un barrido al hidrogel sin AEO disuelto en agua destilada, arrojando absorbancia a 274 nm por lo que se asumió que existe un componente en el hidrogel que absorbe la luz a la misma longitud de onda que timol. Por este motivo se decidió utilizar hidrogel/0 completamente solubilizado en agua destilada como blanco para corregir la medición.

De esta manera, se obtuvieron curvas de liberación en el tiempo para los hidrogeles/0 e hidrogeles/AEO 0,5 y 1 %, donde los hidrogeles/0 tuvieron un comportamiento esperable al detectarse absorbancia  $< 0,1$  que coinciden con la ausencia de AEO para esta muestra y los hidrogeles/AEO 0,5 y 1% tuvieron un crecimiento no lineal constante con punto máximo de liberación entre 210 - 255 min. De esta manera se sugiere que dado el crecimiento constante no lineal de las curvas de dilución de hidrogeles/AEO, existe una liberación controlada de AEO al medio, que luego tiene un crecimiento exponencial debido a la disolución total del hidrogel, y finalmente se estabiliza. Un hallazgo fue que las curvas gráficamente fueron desplazadas a la izquierda a mayor concentración de AEO, se presume que este efecto es debido a que los hidrogeles a mayor concentración de AEO, comienzan a liberarlo antes en el tiempo. Dado esto, fue posible interpolar la concentración aproximada de AEO que contiene cada hidrogel en su momento de máxima liberación, obteniendo así que los hidrogeles/AEO en concentraciones 0,5 y 1 %

contienen aproximadamente 8,77 y 67,01 mM de timol respectivamente en 1 disco de 6 mm de diámetro.

## 7.2 Actividad antifúngica del hidrogel/AEO

En cuanto a la evidencia existente sobre la incorporación de aceites esenciales en armazones biopoliméricos como terapia antimicrobiana, Pérez, M. y cols. (2017) realizaron una revisión sistemática sobre la utilización de hidrogeles como andamio para reparación de heridas y con el efecto coadyuvante de aceites esenciales para favorecer la cicatrización y otorgar efecto antioxidante, antibacteriano y antiinflamatorio, encontrando resultados prometedores, especialmente en heridas crónicas, donde autores en esta revisión reportaban reparación de heridas mediada por efecto anti-candidiasis (Pérez, M. y cols., 2017). Por este motivo, como una manera de validar la potencial utilidad de un aceite esencial incorporado al hidrogel preparado en este estudio, es que evaluamos su actividad antifúngica sobre *C. albicans*. Además, resultados previos del laboratorio muestran que el aceite esencial de orégano posee efectos antifúngicos por lo que era esperable poder obtener resultados similares (Cid-Chevecich, C. y cols., 2022).

Debido a que no existe un método de referencia para evaluar la susceptibilidad a aceites esenciales, en este estudio realizamos un análisis cualitativo de la presencia de actividad antifúngica a través del ensayo de difusión de disco.

Al evaluar la actividad antifúngica de los hidrogeles por separado, sólo el hidrogel/AEO 1 % con 67 mM de timol incorporado mostró actividad antifúngica, inhibiendo el crecimiento de *C. albicans* en toda la placa de agar, mientras que el hidrogel/AEO 0,5 % con 8,77 mM de timol incorporado no mostró actividad antifúngica. Sin embargo, cuando se realizó el ensayo en una placa en presencia de un disco de fluconazol, se logró una inhibición casi completa de la placa. Esto sugiere que el aceite esencial podría estar actuando de manera sinérgica potenciando el efecto del fluconazol, ya que por sí solo no fue capaz de inhibir. Este resultado es similar a lo observado previamente en el laboratorio utilizando el aceite esencial directamente sobre discos de difusión de papel (Tesis de pregrado, Barragán, F., 2023, datos no publicados).

Respecto a los hidrogeles con 0,5 y 1 % de AEO utilizados, estos tuvieron un 3,55 y 5,46 % de humedad respectivamente, donde al aplicarlos sobre el agar se hidrataron y solubilizaron sin generar un halo de inhibición propiamente tal. En este sentido, este fenómeno al utilizar hidrogeles con aceites esenciales crearía una atmósfera de compuestos volátiles con efecto antifúngico sobre la placa, por lo que posiblemente el ensayo de difusión por disco no sería el óptimo para determinar el efecto antifúngico de la formulación.

Estos resultados difieren con los obtenidos por Scartazzini, L. y cols. (2019) donde para un ensayo de difusión por disco sobre especies *R. stolonifer* y *B. cinerea*, utilizaron discos de hidrogel en base a gelatina de 2 cm de diámetro obteniendo halos de inhibición de aproximadamente 2 cm para concentraciones de aceite esencial de *M. arvensis* de 0,38 y 0,5 % (Scartazzini, L. y cols., 2019). Estos resultados pueden estar dados por diferencias en la metodología, en primer lugar en cuanto a la formulación de los hidrogeles, ya que difiere en su composición, donde para este estudio no se incorporó plastificante y además se utilizó aceite esencial proveniente de una especie vegetal diferente. En segundo lugar, los hongos utilizados para los ensayos fueron de diferentes géneros, donde para este ensayo se utilizó *Candida*, por lo que los resultados no son comparables en cuanto a magnitud del efecto.

En esta misma línea, Liakos, I. y cols. (2014) realizaron ensayos de difusión por disco sobre *C. albicans*, utilizando discos de hidrogel en base a alginato de 1,5 cm de diámetro con aceites esenciales de *Matricaria chamomilla linnaeus*, *Cannella corteccia*, *Cymbopogon citratus*, entre otras, en concentraciones de 16; 50 y 66 % de aceite esencial. Obteniendo efectos variables, desde ausencia de efecto para todas las concentraciones en el caso de *Matricaria chamomilla linnaeus*, halos de inhibición de 18 mm en el caso de *Cannella corteccia* (66 % de aceite esencial) y una inhibición total de la placa en el caso de *Cymbopogon citratus* (66 % de aceite esencial) (Liakos, I. y cols., 2014).

De esta manera, en base a los resultados obtenidos por el ensayo de difusión por disco y los obtenidos por los autores ya mencionados, se puede constatar que existe un efecto antifúngico cuando se incorporan aceites esenciales en un armazón biopolimérico en forma de hidrogel, el cual varía según la formulación propiamente tal y las concentraciones cargadas de aceite esencial.

Así este ensayo demostró cualitativamente que: hidrogel/AEO 0,5 % es insuficiente para inhibir el crecimiento de colonias de *C. albicans*; sin embargo, cuando se administra en conjunto con fluconazol potencia su efecto logrando la inhibición completa de crecimiento en la placa. En cambio, el hidrogel/AEO 1 % inhibe completamente el crecimiento de *Candida*. En consecuencia, la concentración de 0,5 % sería una concentración subterapéutica según este ensayo, pero que aumentaría la susceptibilidad de *C. albicans* frente a fluconazol, lo cual estaría en línea con los antecedentes que muestran que el AEO potencia el efecto de otros antifúngicos (Cid-Chevecich, C. y cols., 2022). De todas maneras, se requieren estudios adicionales con los hidrogeles para poder corroborar si existe una sinergia a las concentraciones de AEO incorporadas.

En cuanto a la efectividad del hidrogel sobre la adhesión de *C. albicans*, se pueden comparar los resultados obtenidos por Cid-Chevecich, C. y cols. (2022), que estudiaron el efecto del AEO en un ensayo de adhesión en superficie abiótica. Los autores obtuvieron que el AEO inhibió la adhesión en la cepa ATCC 90029 aproximadamente en un 60 %. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en este estudio, donde los hidrogeles en ambas concentraciones lograron inhibir la adhesión en un 70 % aproximadamente, lo que nos indica que la incorporación del aceite esencial en el hidrogel no afecta su actividad biológica.

Al observar al microscopio las diferentes condiciones experimentales del ensayo de adhesión, se observó que las muestras a las que se adicionaron hidrogeles/AEO 0,5 y 1 % no había presencia de hifas verdaderas, en su mayoría fueron células no filamentosas con escasa presencia de pseudohifas. Además se observó que las levaduras estaban encapsuladas en gotas de aceite de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro aproximadamente, en cambio en el control con hidrogel/0 no tuvo diferencias significativas respecto del control sin hidrogel. En base a estas observaciones, se puede interpretar que los hidrogeles/AEO tienen un efecto en la morfogénesis, inhibiendo la filamentación de las células, que como se describió anteriormente tiene un rol clave en la adhesión a superficies bióticas/abióticas y en la formación de biopelículas. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Cid-Chevecich, C. y cols. (2022). donde obtuvieron que *C.albicans* ATCC 90029 en presencia de AEO disminuyeron en tamaño y en un 35 % su número de células con un efecto significativamente mayor que fluconazol o nistatina. Así mismo estudiaron



el efecto del AEO sobre la viabilidad de biofilms ya formados, obteniendo que tuvo un menor IC50 que nistatina ( $p < 0,05$ ), donde además un hallazgo fue que esta cepa no fue susceptible a fluconazol cuando el biofilm ya está formado. En base a estos resultados es necesario estudiar el efecto de los hidrogeles/AEO sobre la morfogénesis y formación de biopelículas, para determinar si esta formulación potenciaría el efecto en estos ensayos. Como se expuso en este estudio, es esperable que haya al menos, una concordancia con los resultados de estos autores.

Con el análisis de los resultados obtenidos, se determina que se acepta la hipótesis planteada, ya que se demostró que la mezcla de gelatina con aceite esencial de *O. vulgare* en forma de hidrogel es un agente antifúngico efectivo frente a *C. albicans in vitro*.

Esta investigación sienta la base para continuar el estudio de los hidrogeles/AEO sobre el control de infecciones causadas por *Candida*, siendo necesaria la futura investigación sobre sus efectos debido a las limitaciones de las metodologías empleadas. El ensayo sobre cepas de referencia de laboratorio de una sola especie, la limitación de las metodologías *in vitro* y ausencia de ensayos sobre células no patogénicas son ejemplos a considerar para futuros estudios.

Por último, cabe destacar la utilidad de contar con un hidrogel con encapsulación de aceites esenciales como un dispositivo que tiene potencial aplicación para tratamientos de infecciones por *C. albicans* en pacientes portadores de prótesis removibles acrílicas, como es el caso de la estomatitis subprotésica, donde este dispositivo sería de fácil administración con efecto sostenido en el tiempo. Esto permitiría aplicar el dispositivo como terapia y que no interferiría con el uso de las prótesis, lo que lo diferenciaría de las estrategias actuales como lo son los geles de administración tópica.

## 8. CONCLUSIONES

**8.1** El momento óptimo de utilización de los hidrogeles/AEO es de 7 días desde su gelificación, lo que permite obtener discos deshidratados, resistentes y manipulables para su uso.

**8.2** La formulación de hidrogeles/AEO en concentraciones de 0,5 y 1 % permite la liberación sostenida y controlada de 9,28 y 70,86 ppm de AEO respectivamente durante 255 minutos aproximadamente.

**8.3** Los hidrogeles/AEO 1 % tienen actividad antifúngica sobre el crecimiento *C. albicans* ATCC 90029, inhibiendo completamente su crecimiento *in vitro*.

**8.4** Los hidrogeles/AEO 0,5 y 1 % inhiben la adhesión en un 70 y 72 % respectivamente de *C. albicans* ATCC 90029 *in vitro*.

## 9. REFERENCIAS

Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T., & Agustini, T. W. (2012). Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the skin of Unicorn Leatherjacket incorporated with Essential Oils. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.003>

Altay, Ö., Köprüalan, Ö., İlter, I., Koç, M., Ertekin, F. K., & Jafari, S. M. (2022). Spray drying encapsulation of essential oils; process efficiency, formulation strategies, and applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1–19. Advance online publication.

Arcila-Lozano, C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., & González de Mejía, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111. Recuperado en 26 de septiembre de 2023, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222004000100015&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000100015&lng=es&tlng=es).

Arnold, T. M., Dotson, E., Sarosi, G. A., & Hage, C. A. (2010). Traditional and emerging antifungal therapies. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 7(3), 222–228. <https://doi.org/10.1513/pats.200906-048AL>.

Arredondo, A., & Londoño, M. (2009). Hidrogeles: Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos. *Revista Ingeniería Biomédica*, 3(5), 83-94. Retrieved August 02, 2023, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1909-97622009000100013&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-97622009000100013&lng=en&tlng=es).

Barragán Valdebenito. (2022). Caracterización de la actividad antifúngica y antibiopelícula del aceite esencial de *Laureliopsis philippiana*, *Mentha suaveolens* y *Nothofagus antarctica* sobre *Candida albicans*. Universidad de Chile.

Blankenship, J. R., & Mitchell, A. P. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current opinion in microbiology*, 9(6), 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.003>

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

Chopra, H., Singh, I., Kumar, S., Bhattacharya, T., Rahman, M. H., Akter, R., & Kabir, M. T. (2022). A Comprehensive Review on Hydrogels. *Current drug delivery*, 19(6), 658–675. <https://doi.org/10.2174/1567201818666210601155558>

Cid-Chevecich, C., Müller-Sepúlveda, A., Jara, J. A., López-Muñoz, R., Santander, R., Budini, M., Escobar, A., Quijada, R., Criollo, A., Díaz-Dosque, M., & Molina-Berríos, A. (2022). *Origanum vulgare* L. essential oil inhibits virulence patterns of *Candida* spp. and potentiates the effects of fluconazole and nystatin in vitro. *BMC complementary medicine and therapies*, 22(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03518-z>

Clinical and Laboratory standards institute (CLSI). (2009). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeast; Approved guideline. Segunda Edición.

Espinel-Ingroff, A. (2007). Standardized disk diffusion method for yeasts. *Clinical Microbiology Newsletter*, 29(13), 97–100. <https://doi.org/10.1016/j.clinmicnews.2007.06.001>

Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L., & Portugal, H. (2004). Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy research : PTR*, 18(12), 990–995. <https://doi.org/10.1002/ptr.1594>

Gleiznys, A., Zdanavičienė, E., & Žilinskas, J. (2015). *Candida albicans* importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija*, 17(2), 54–66.

Guandalini Cunha B., Duque, C., Sampaio Caiaffa, K., Massunari, L., Araguê Catanoze, I., Dos Santos, D., de Oliveira, S. and Guiotti, A., 2020. Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. *Archives of Oral Biology*, 109, p. 104577.

Gulati, M., Lohse, M. B., Ennis, C. L., Gonzalez, R. E., Perry, A. M., Bapat, P., Arevalo, A. V., Rodriguez, D. L., & Nobile, C. J. 2018. In Vitro Culturing and Screening of *Candida albicans* Biofilms. *Current Protocols in Microbiology*, 50(1), p.e60.

ISP. (2006, Diciembre 27). *Amfotericina B Polvo Liofilizado Para Solución inyectable* 50 mg. ISPCH. [https://www.ispch.cl/sites/default/files/5\\_agencia\\_reguladora/folletos/doc/AMFOTE\\_RICINA-B .pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/5_agencia_reguladora/folletos/doc/AMFOTE_RICINA-B .pdf)

Juniatik, M., Hida, K., Wulandari, F., Pangestuti, N., Munawaroh, N. (2017). Formulation of nanoemulsion mouthwash combination of lemongrass oil (*Cymbopogon citratus*) and kaffir lime oil (*Citrus hystrix*) for anticandidiasis against *Candida albicans* ATCC 10231. "Traditional Medicine Journal, vol. 22, no. 1, 2017, pp. 7-15. <https://doi.org/10.22146/tradmedj.24255>

Kavoosi, G., Dadfar, S. M., & Purfard, A. M. (2013). Mechanical, physical, antioxidant, and antimicrobial properties of gelatin films incorporated with thymol for potential use as nano wound dressing. *Journal of food science*, 78(2), E244–E250. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12015>

Lebeaux, D., Ghigo, J. M., & Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of

recalcitrance toward antibiotics. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*, 78(3), 510–543. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>

Lelis, C., de Carvalho, A., Conte Junior, C. (2021). A Systematic Review on Nanoencapsulation Natural Antimicrobials in Foods: In Vitro versus In Situ Evaluation, Mechanisms of Action and Implications on Physical-Chemical Quality. *Int J Mol Sci*. 2021 Nov 8;22(21):12055. doi: 10.3390/ijms222112055.

Lewis, M. A. O., & Williams, D. W. (2017). Diagnosis and management of oral candidosis. *British dental journal*, 223(9), 675–681. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.886>

Liakos, I., Rizzello, L., Scurr, D. J., Pompa, P. P., Bayer, I. S., & Athanassiou, A. (2014). All-natural composite wound dressing films of essential oils encapsulated in sodium alginate with antimicrobial properties. *International journal of pharmaceutics*, 463(2), 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.10.046>

Lopes, J. P., & Lionakis, M. S. (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence*, 13(1), 89-121. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2019950>

Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D., & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature reviews. Microbiology*, 16(1), 19–31. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.107>

Mba, I. E., & Nweze, E. I. (2020). Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 39(10), 1797–1819. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03912-w>

MINSAL. (2010). Guía Clínica: Salud Oral Integral Para Adultos De 60 Años. Gobierno de Chile. <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7221747c2c9484b7e04001011f0141a4.pdf>

Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2017). Chemistry of essential oils and factors influencing their constituents. En *Soft Chemistry and Food Fermentation* (pp. 379– 419). Elsevier

Muzyka, B. C., & Epifanio, R. N. (2013). Update on oral fungal infections. *Dental clinics of North America*, 57(4), 561–581. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2013.07.002>

Nett, J. E., & Andes, D. R. (2016). Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infectious disease clinics of North America*, 30(1), 51–83. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.012>

Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annual review of microbiology*, 69, 71–92. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>

Olayemi, R.F. (2017). The Role of Monoterpenoids and Sesquiterpenoids as defense Chemicals in Plants- a Review. *Nigerian Research Journal of Chemical Sciences*, Vol. 3, 1-15.

Oliveira-Filho, R. D., E Silva, A. R. A., de Azevedo Moreira, R., & Nogueira, N. A. P. (2018). Biological Activities and Pharmacological Applications of Cyclodextrins Complexed with Essential Oils and Their Volatile Components: A Systematic Review. *Current pharmaceutical design*, 24(33), 3951–3963. <https://doi.org/10.2174/1381612824666181120093634>

Oliveira JdA, da Silva ICG, Trindade LA, Lima EO, Carlo HL, Cavalcanti AL, et al. Safety and Tolerability of Essential Oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume Leaves with Action on Oral Candidosis and Its Effect on the Physical Properties of the Acrylic Resin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014;2014:325670.

Otero Rey, E., Peñamaría Mallón, M., Rodríguez Piñón, M., Martín Biedma, B. and Blanco Carrión, A., 2015. Candidiasis oral en el paciente mayor. *Avances en Odontoestomatología*, 31(3), pp.135-148.

Pal, M. (2018). Morbidity and mortality due to fungal infections. *Journal of Applied Microbiology and Biochemistry*, 01(01). <https://doi.org/10.21767/2576-1412.100002>.

Palmeira-de-Oliveira, A., Salgueiro, L., Palmeira-de-Oliveira, R., Martinez-de-Oliveira, J., Pina-Vaz, C., Queiroz, J. A., & Rodrigues, A. G. (2009). Anti-Candida activity of essential oils. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 9(11), 1292–1305. <https://doi.org/10.2174/138955709789878150>

Pardi, G., Cardozo, E. (2002). Algunas consideraciones sobre Candida Albicans como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontológica Venezolana*, 40(1), 9-17. Recuperado en 09 de agosto de 2023, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S000163652002000100003&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000163652002000100003&lng=es&tlng=es).

Pauli, A. (2006). Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. *ChemInform*, 37(24). <https://doi.org/10.1002/chin.200624270>.

Pérez-Recalde, M., Ruiz Arias, I. E., & Hermida, É. B. (2018). Could essential oils enhance biopolymers performance for wound healing? A systematic review. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 38, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.09.024>

Santos, A., Polidoro, A., Cardoso, C., Mota, J., Jacques, R., Caramão, E. (2019). Analysis of the Seasonal Variation in Chemical Profile of Piper glabratum Kunth Essential Oils Using GC×GC/qMS and Their Antioxidant and Antifungal Activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2019;30:2691-701.



Scartazzini, L., Tosati, J., Cortez, D., Rossi, M., Flores, S., Hubinger, M., Di Luccio, M. and Monteiro, A. (2019). Gelatin edible coatings with mint essential oil (*Mentha arvensis*): film characterization and antifungal properties. *Journal of Food Science and Technology*, 56(9), pp.4045-4056.

Shapiro, R. S., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2011). Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. *Microbiology and molecular biology reviews* : *MMBR*, 75(2), 213–267.  
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00045-10>

Sheehan, D. J., Brown, S. D., Pfaller, M. A., Warnock, D. W., Rex, FRCPath. J. H., Chaturvedi, F. V., Espinel-Ingroff, A., Ghannoum, M. A., Moore, L. S., Odds, F. C., Rinaldi, RCPATH. M. G., & Walsh, T. J. (2004). Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline. NCCLS Document MA44-A. In *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Vol. 24, Issue 15).

Sigma-Aldrich. (2022). *Ficha de Datos de Seguridad de timol Versión 8.2* (índice nro 604-032-00-1). <https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/sds/sigma/t0501>  
 Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*, 12(7), 317–324.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.008>.

Telles, D. R, Karki, N., & Marshall, M. W. Oral fungal infections. (2017). *Dental Clinics of North America*, 61 (2), 319-349.

Tongnuanchan, P., Benjakul, S., & Prodpran, T. (2014). Structural, morphological and thermal behaviour characterisations of fish gelatin film incorporated with basil and citronella essential oils as affected by surfactants. *Food Hydrocolloids*, 41, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.03.015>

Who.int. (2022). Salud bucodental. [online] Available at: <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>>[Accessed 19 March 2022]