

Universidad de Chile.
Facultad de Odontología
Escuela de Graduados



“EFECTO CITOTÓXICO DE LA FORMULACIÓN DE MICROCÁPSULAS DE
ALGINATO QUE CONTIENEN ACEITE ESENCIAL DE *ORIGANUM VULGARE* EN
LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS”

Bárbara Cecilia Valenzuela Faunes

Tesis para optar el grado de Magíster en Ciencias Odontológicas

Director de Tesis:

Dr. José Jara Sandoval.

Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas (ICOD).

Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Dr. Mario Díaz-Dosque

Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas (ICOD).

Facultad de Odontología, Universidad de Chile

Santiago, Chile 2023

Universidad de Chile.
Facultad de Odontología
Escuela de Graduados



“EFECTO CITOTÓXICO DE LA FORMULACIÓN DE MICROCÁPSULAS DE ALGINATO QUE CONTIENEN ACEITE ESENCIAL DE *ORIGANUM VULGARE* EN LÍNEAS CELULARES DE CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS”

Bárbara Cecilia Valenzuela Faunes

Tesis para optar el grado de Magíster en Ciencias Odontológicas

Director de Tesis:

Dr. José Jara Sandoval.

Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas (ICOD).

Facultad de Odontología, Universidad de Chile

Dr. Mario Díaz-Dosque

Instituto de Investigación en Ciencias Odontológicas (ICOD).

Facultad de Odontología, Universidad de Chile

Santiago, Chile 2023

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
ODONTOLÓGICAS

Se informa al Consejo de la Escuela de Graduados de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que la Tesis de Magíster en Ciencias Odontológicas presentada por la candidata

Bárbara Cecilia Valenzuela Faunes

ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas, en examen rendido el día 8 de noviembre de 2023.

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS



Dr. Alfredo Criollo C.



Dr. Marcelo Kögan B



Dr. Cristian Covarrubias G.

(Presidente Comisión de Examen)

Agradecimientos:

Agradezco profundamente a mis tutores Dr. José Jara Sandoval y Dr. Mario Díaz Dosque, por la paciencia, ya que no fue un camino fácil. Además, quisiera agradecer a aquellos que me ayudaron en el desarrollo de este trabajo.

A mi familia, Jonathan y amigos que estuvieron entregando su ánimo en situaciones de dificultad y momentos de alegría.

¡GRACIAS!

1. Índice.	
1. Índice.....	6
2. Introducción	16
3. Marco teórico.	19
3.1 Cáncer Oral de cabeza y cuello.	19
3.2 El Carcinoma oral de células escamosas (COCE).	19
3.4 Aceites Esenciales	21
3.5 Aceite esencial de Orégano (AEO)	22
3.6 Emulsiones.	24
3.7 Emulsiones Pickering.	25
3.8 Carbonato de calcio.	25
3.9 Alginato de Sodio.	26
4. Hipótesis	28
5. Objetivo general y objetivos específicos.	28
5.1 Objetivo General.	28
5.2 Objetivos Específicos.	28
6. Materiales y métodos.	29
6.1 Recolección vegetal y extracción del aceite esencial:	29
6.2 Reactivos:	29
6.3 Síntesis de partículas Carbonato de Calcio:	30

6.4	Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).....	30
6.5	Síntesis de emulsión Pickering:	31
6.6	Caracterización EP y EP+ALG; Potencial Z (pZ), índice de poli dispersión y microscopía.	32
6.7	Ensayo de liberación y eficiencia de encapsulación	33
6.8	Líneas y cultivos celulares.	33
6.9	Ensayo de viabilidad celular MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-bromuro de difeniltetrazolio).....	34
6.10	Ensayo Caspasa -3.....	34
6.11	Ensayo de citotoxicidad lactato deshidrogenasa (LDH)	35
6.12	Análisis Estadístico.	35
7.	Resultados	36
7.1	Síntesis de nanopartículas de Carbonato de Calcio.	36
7.2	Caracterizar las propiedades físicas y químicas del AE de <i>Origanum vulgare</i> . 39	
7.3	Sintetizar y caracterizar las EP y EP+ALG.....	40
7.4	Perfil de liberación <i>in vitro</i> de A.E.O de EP+ALG.....	45
7.5	Eficiencia de encapsulación (EE%).....	47
7.6	Viabilidad celular	48
7.7	Actividad Caspasa 3	54

7.8	Actividad lactato deshidrogenasa.....	56
8.	Discusión	58
9.	Conclusión.....	65
10.	Resúmenes presentados en Congresos	66
10.1	Resumen para I Congreso Virtual de la Universidad de Chile 2020.	66
10.2	Resumen para Congreso Internacional de Sociedad de Patología bucomaxilofacial de Chile 2021.	68
10.3	Resumen para 3er Congreso Anual ICOD 2022.....	69
10.4	Resumen para XXXIV Reunión Anual IADR 2022, división Chile.....	70
11.	Bibliografía.....	72

Índice de figuras.

Figura 1	Esquema de emulsión pickering con alginato	27
Figura 2	Esquema representativo del protocolo metodológico de EP+ALG	32
Figura 3	Caracterización de CaCO ₃ en SEM y FTIR	28
Figura 4	Caracterización de Emulsión Pickering en SEM	41
Figura 5	Tamaño Emulsión Pickering	42
Figura 6	Caracterización y análisis microscópico EP+ALG	44
Figura 7	Curva de calibración Timol	45
Figura 8	Perfil de liberación de AEO.	47
Figura 9	Curvas de concentración del efecto en la viabilidad celular en línea celular Scc-25 tratadas con concentraciones crecientes de AEO y EP+ALG	51
Figura 10	Curvas de concentración del efecto en la viabilidad celular en línea celular Cal 27 tratadas con concentraciones crecientes de AEO y EP+ALG	52
Figura 11	Curvas de concentración del efecto en la viabilidad celular en línea celular Tuija tratadas con concentraciones crecientes de AEO y EP+ALG	53
Figura 12	Actividad Caspasa-3 en Scc-25 y Cal 27	55
Figura 13	Actividad LDH en Scc-25 y Cal 27	57

Índice de tablas.

- Tabla 1 Screening de CaCO₃ a diferentes tiempos en DLS, tamaño, potencial Z, PDI.
- Tabla 2 CaCO₃ a diferentes diluciones en DLS, tamaño, potencial Z, PDI.
- Tabla 3 Compuestos principales detectados en aceite esencial de Origanum Vulgare
- Tabla 4 Caracterización de emulsión Pickering (EP) en DLS, tamaño, potencial Z y PDI.
- Tabla 5 Caracterización de EP+ALG en DLS en diferentes tiempos, tamaño, potencial Z, PD (n=3).
- Tabla 6 Liberación de A.E.O (µg/µL) en medio PBS(n=3) y DMEM (n=3) a diferentes tiempos.
- Tabla 7 Citotoxicidad de los tratamientos de A.E.O y EP+ALG sobre líneas celulares Scc-25, Cal 27 y Tuija. IC₅₀= Concentración que resulta en la citotoxicidad del 50% después de las 24 y 48 h.

Abreviaciones

µL: Microlitros

µg: Microgramos

µm: Micrómetros

°C: Grados Celsius

AEO: Aceite Esencial de Orégano

Alg: Alginato

ATCC: American Type Culture Collection

EP+ALG: Microcápsula de alginato con AEO.

d: Días

EDX: Energía dispersiva de rayos X

EE%: Eficiencia de encapsulación

EP: Emulsión Pickering

FO: Fase oleosa

FTIR: Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier

gL-1: Gramos/Litro

M: Molar

Mg: Miligramos

Min: Minutos

mL: Mililitros

mM: Milimolar

mm: Milímetros

nm: Nanómetros

Np: Nanopartículas

O/W: Aceite en agua

PDI: Índice de polidispersidad

p/p: peso-peso

p/v: peso-volumen

rpm: Revoluciones por minuto

SEM: Microscopía electrónica de barrido

TEM: Microscopía de transmisión electrónica

W/O: Agua en aceite

Resumen

Palabras clave: Carcinoma oral de células escamosas, emulsión pickering, *origanum vulgare*, liberación controlada, aceite esencial, microcápsula de alginato.

El carcinoma oral de células escamosas es una de las neoplasias más frecuentes en el mundo y con mal pronóstico. Hasta el momento las terapias convencionales presentan falta de eficacia debido a la multi-resistencia a fármacos, además de una serie de efectos adversos que afectan la calidad de vida del paciente. Es por esto que una alternativa es el uso de productos naturales como los aceites esenciales como tratamiento coadyuvante, ya que el esencial *Origanum vulgare* (AEO) ha demostrado tener actividad citotóxica en diversos modelos celulares. Una forma de mejorar su eficiencia y controlar la liberación es micro encapsularlo a través de una emulsión de alginato, y utilizar como precursor una emulsión *Pickering*, cuya característica es estar estabilizada por partículas sólidas. El objetivo de este estudio es sintetizar, caracterizar y evaluar el efecto farmacológico de una microcápsula de alginato con un precursor de emulsión *Pickering* de AEO en células tumorales de carcinoma oral de células escamosas. Para esto, se realizó la síntesis y la caracterización de las microcápsulas de alginato y emulsión *Pickering* a través de dispersión de luz dinámica, microscopía electrónica de transmisión y barrido, posteriormente se evaluó su efecto sobre la viabilidad celular, la selectividad y el tipo de muerte celular inducida.

Las microcápsulas de alginato cargadas con AEO presentaron tamaños promedio de 1900 nm, potencial Z de -63 y PDI de 0,6. Éstas demostraron ser

estables en el tiempo, además, su eficiencia de encapsulación de un 80%, adicionalmente el AEO logró liberarse en un 96% a las 24 h. Se obtuvieron valores de IC_{50} de 2,7 $\mu\text{g/mL}$ (AEO) y de 1,7 $\mu\text{g/mL}$ (AEO encapsulado) en SCC-25. Por otra parte, se obtuvo valores de IC_{50} de 0,97 $\mu\text{g/mL}$ (AEO) y 1,92 $\mu\text{g/mL}$ (AEO encapsulado) en Cal -27 a las 48 h, observándose diferencias significativas entre ambos valores de IC_{50} . En ambas líneas celulares tumorales el tratamiento de AEO encapsulado indujo la muerte celular por apoptosis y necrosis.

El AEO, a pesar de no tener un aumento de la potencia farmacológica, no es tóxico en la línea no tumoral estudiada en esta investigación. Finalmente, este tipo de formulación es una forma promisorio de administración de sustancias lipofílicas como AE, por lo que podría ser una posible alternativa coadyuvante en el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello.

Abstract

Key words: Oral squamous cell carcinoma, pickering emulsion, *origanum vulgare*, controlled release, essential oil, alginate microcapsule.

Oral squamous cell carcinoma is one of the most frequent neoplasms in the world and has a poor prognosis. So far, conventional therapies have been ineffective due to multi-drug resistance, in addition to a series of adverse effects that affect the patient's quality of life. This is why an alternative is the use of natural products such as essential oils as an adjuvant treatment, as the essential *Origanum vulgare* (AEO) has been shown to have cytotoxic activity in various cellular models. One way to improve its efficiency and control its release is to microencapsulate it through an alginate emulsion, and to use as a precursor a Pickering emulsion, whose characteristic is to be stabilized by solid particles. The aim of this study is to synthesize, characterize and evaluate the pharmacological effect of an alginate microcapsule with an AEO Pickering emulsion precursor on oral squamous cell carcinoma tumor cells.

For this purpose, alginate and Pickering emulsion microcapsules were synthesized and characterized by dynamic light scattering, transmission and scanning electron microscopy, and their effect on cell viability, selectivity and the type of cell death induced was evaluated.

The AEO-loaded alginate microcapsules presented average sizes of 1900 nm, Z-potential of -63 and PDI of 0.6. They proved to be stable over time, with an encapsulation efficiency of 80%, and the AEO was released 96% after 24 h. IC₅₀ values of 2.7 µg/mL (AEO) and 1.7 µg/mL (encapsulated AEO) were obtained in SCC-25. On the other hand, IC₅₀ values of 0.97 µg/mL (AEO) and

1.92 µg/mL (encapsulated AEO) were obtained in Cal-27 at 48 h, showing statistically significant differences between the two IC₅₀ values. In both tumor cell lines, encapsulated AEO treatment induced cell death by apoptosis and necrosis.

AEO, despite not having an increase in pharmacological potency, is not toxic in the non-tumor line studied in this research. Finally, this type of formulation is a promising way of administering lipophilic substances such as AEO, which could be a possible adjuvant alternative in the treatment of head and neck cancer.

2. Introducción

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) representa el 90% de todos los casos de cáncer oral (CO) ⁽¹⁾, esta patología junto al cáncer orofaríngeo es la sexta neoplasia maligna más frecuente en todo el mundo ^{(2),(3)}. Dentro de las terapias convencionales, se incluye la resección quirúrgica, combinada con quimioterapia y/o radioterapia ^(4,5), pero estas pueden llegar a ser refractarias. Además, asociado al tratamiento farmacológico, se pueden observar consecuencias fisiológicas y deterioro funcional, lo cual impacta de manera importante la calidad de vida del afectado ⁽⁶⁾. Además, en la administración de fármacos se ha reportado resistencia a éstos, siendo un problema clínico común en el tratamiento de varios carcinomas ⁽⁷⁾. Se ha descrito la resistencia a los fármacos quimioterapéuticos, lo cual está dado por la farmacorresistencia que puede estar presente en las células cancerosas, o que pueden adquirir durante el tratamiento quimioterapéutico. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevas alternativas para tratar esta patología mortal.

La medicina herbaria ha sido utilizada exitosamente, a lo largo de la historia humana en la práctica de la medicina tradicional ⁽⁸⁾. Un ejemplo es lo que ha reportado Arulmozhi et al., quien obtuvo eficacia terapéutica en una línea celular humana derivada del CO al encapsular en escala nanométrica compuestos de origen vegetal.

En el último tiempo, la literatura ha puesto atención en el uso de Aceites Esenciales (AE), estos presentan efecto farmacológico en varias patologías, debido a sus diversas actividades biológicas ^{(9),(10),(11),(12-14)} debido a un número de compuestos fenólicos y terpenos presentes ⁽¹⁵⁾, siendo una fuente

prometedora en farmacología para el manejo y la prevención de patologías orales.

Uno de los A.E que ha suscitado mayor interés científico es el A.E de orégano (*Origanum vulgare*) (A.E.O), pues entre sus componentes principales se encuentran, el carvacrol ⁽¹³⁾, el timol ⁽¹⁶⁾ y el 4-terpineol ⁽¹⁷⁾, que han sido foco en investigaciones para probar su capacidad antitumoral en diversas líneas celulares de cáncer ^{(13), (18),(19), (20)}, así como en el cáncer oral de células escamosas (COCE) ^{(21), (22)}. Si bien, las propiedades biológicas de los A.E no son cuestionadas, su uso práctico está limitado debido a su volatilidad, corta vida media, la susceptibilidad a sufrir reacciones de oxidación, isomerización, y polimerización ⁽²³⁾; por lo tanto, una alternativa para optimizar su actividad es incorporarlas en vehículos tales como las emulsiones (E), ya que son ampliamente usadas en la administración de fármacos, debido a su tamaño subcelular, biocompatibilidad, su relativa estabilidad, y su habilidad de solubilizar compuestos hidrofóbicos ⁽²⁴⁾. Las E están compensadas por la incorporación de surfactantes, que cumple la función de disminuir la tensión superficial entre las dos fases inmiscibles y así mejorar la estabilidad ⁽²⁵⁾, pero estas moléculas activas podrían estar limitando la actividad de los AE ^{(26), (27)}. Además, los surfactantes causan irritación de la mucosa, dañando membranas celulares y produciendo otras complicaciones ⁽²⁸⁾.

Para evitar el uso de surfactantes, y favorecer la eficacia de los AE, surgen las emulsiones Pickering (EP), las cuales utilizan partículas sólidas ⁽²⁹⁾ en reemplazo de los tensoactivos. Este sistema tiene la ventaja de que posee una

alta resistencia a la deformación comparado a las emulsiones convencionales, debido a la adsorción de las partículas sólidas en la interfase entre los dos líquidos inmiscibles ⁽³⁰⁾. Las partículas sólidas, otorgan algunas características, tales como; reducir la posibilidad de coalescencia y aportan mayor estabilidad a las emulsiones. Si bien fueron descubiertas hace más de un siglo por Ramsden ⁽³¹⁾ y Pickering ⁽²⁹⁾ no recibían atención por las limitadas opciones de disponibilidad de materiales, pero hoy los avances han permitido el desarrollo de nuevos materiales como nano partículas magnéticas ⁽³²⁾, ciclodextrina ⁽³³⁾, quitosano ⁽³⁴⁾, entre otros, los cuales son utilizados en esta nueva tecnología. Dentro de ellos, el carbonato de calcio (CaCO₃) ha sido descrito como emulsionante de Pickering, especialmente en la industria farmacéutica y alimentaria, ya que ha sido utilizado en aplicaciones de ingeniería de tejidos y en la administración de medicamentos contra el cáncer ⁽³⁵⁾. La razón de su uso es debido a su bajo costo y su gran disponibilidad, estas partículas pueden conferir propiedades funcionales como neutralización, por lo tanto, son candidatos potenciales para la administración de fármacos debido a su naturaleza porosa ⁽³⁵⁾.

En este contexto, los sistemas de suministro basados en emulsiones se utilizan cada vez más para encapsular polímeros y ⁽³⁶⁾ compuestos bioactivos lipofílicos, por lo que investigadores han puesto atención en la síntesis y aplicación de las EP para el desarrollo de nuevas tecnologías, donde han examinado el análisis físico-químico de las emulsiones y su potencial antimicrobiano ^{(27), (37)} y , además se ha evaluado la liberación de componentes bioactivos a través de este tipo de emulsiones sobre la actividad antitumoral en diversas líneas celulares ^{(38), (39), (40)}.

3. Marco teórico.

3.1 Cáncer Oral de cabeza y cuello.

El Cáncer oral es catalogado como un problema de salud pública, esta patología es la sexta neoplasia maligna a nivel mundial ⁽⁴¹⁾, la cual se han reportado en su mayoría en el Asia del Este y sur ⁽⁴²⁾, presentándose con mayor frecuencia en los hombres con una incidencia de 4.8 por cada 100.000 habitantes para el año 2020; estimándose un aumento del 40% en la incidencia en el año 2040. En cuanto a la mortalidad, en hombres es de 3.2 por cada 100.000 hombres y en mujeres de 1.4 por cada 100.000 mujeres ⁽⁴³⁾. En Chile, se ha documentado que en el año 2012 hubo una tasa de incidencia de 1,1 por cada 100.000 habitantes, en donde hubo una mayor frecuencia en hombres ⁽⁴⁴⁾

3.2 El carcinoma oral de células escamosas (COCE).

El COCE representa el 90% de todos los tipos de cáncer oral ⁽⁴⁵⁾, el cual puede ubicarse en labios, encía, 2/3 anteriores de la lengua, mucosa bucal, piso de la boca, paladar duro y trígono retromolar ⁽⁴⁶⁾, siendo más común en 2/3 anteriores de la lengua y el piso de boca ⁽⁴⁷⁾. A nivel nacional la tasa de mortalidad reportada por el Departamento de Estadísticas e Información de Salud (DEIS) para el cáncer oral y orofaríngeo para ambos sexos para el año 2015 fue de 1 por 1000 habitantes, siendo Aysén, Arica y Parinacota y Antofagasta las que presentaron mayores tasas de mortalidad (2.3, 1,58 y 1.45 por 1000 habitantes respectivamente) ⁽⁴⁶⁾.

La etapa clínica y patológica al momento del diagnóstico es uno de los factores más importantes para el desarrollo de su pronóstico. Esta enfermedad mortal

puede originarse debido a numerosos factores de riesgo, como el hábito tabáquico, dieta inadecuada, y alcoholismo ⁽⁴⁸⁾. Debido a un diagnóstico tardío el 50% (estadío II y IV) de los pacientes logra sobrevivir luego de 5 años y en muchos casos son refractarios a los tratamientos convencionales ⁽⁴³⁾. En Chile los diagnósticos se encuentran en estadíos avanzados (III y IV) con compromiso local, regional y sistémico, la tasa de mortalidad en el periodo 2002 -2010 de 1,1 y 1,25 por cada 100.000 habitantes ⁽⁴⁹⁾, a pesar de las terapias utilizadas, la sobrevida se estima en un 56% a 46% a los 5 -10 años respectivamente una vez diagnosticado ⁽⁵⁰⁾.

3.3 Tratamiento convencional en Cáncer de cabeza y cuello.

Uno de los tratamientos de primera elección y catalogado como *gold estándar* es la resección quirúrgica ⁽⁴⁶⁾, en donde se elimina cierta parte anatómica de la región afectada por la patología, esta decisión va determinada por el estadio de la enfermedad. Cuando el diagnóstico está en las primeras etapas se intervienen con cirugía, mientras que en una etapa avanzada se recomienda el tratamiento multidisciplinario, el cual incluye cirugía, radioterapia o radioterapia y quimioterapia combinadas ⁽⁵¹⁾. En el cáncer de cabeza y cuello los tratamientos con quimioterapéuticos no se ha evidenciado un beneficio como monoterapia ^{(52) (53)}, sin embargo, existe evidencia de su eficacia como adyuvante posterior a la cirugía ⁽⁴⁵⁾. En el caso del tratamiento quirúrgico hay consecuencias permanentes y alteraciones fisiológicas debilitantes, mientras que en la radio y quimioterapia producen efectos que comprometen el bienestar y la calidad de vida de los pacientes, en el caso del cisplatino se ha documentado que produce náuseas, vómitos, ototoxicidad e incluso toxicidad renal ⁽⁵⁴⁾. Además, su utilización ha generado que las células tumorales tengan

resistencia a los efectos citotóxicos del fármaco y puedan seguir con la proliferación y desarrollando metástasis. La evidencia de resistencia a los fármacos junto a la severidad de los efectos adversos hace necesario la búsqueda de nuevos tratamientos coadyuvantes que disminuyan estos factores. Es por esta razón que se han evaluado nuevas alternativas basados en productos naturales como los Aceites Esenciales (AE)^{(54), (55)}, en donde se ha estudiado su efecto en cánceres de colon, mama⁽¹³⁾, melanoma⁽²⁰⁾ y cáncer oral⁽²²⁾.

3.1 Aceites Esenciales

Los productos naturales como los A.E son líquidos oleosos aromáticos y volátiles obtenidos de plantas⁽²³⁾. Han sido reconocidos como sustancias seguras (G R AS -Generalmente reconocidas como seguras) por la FDA (Administración de drogas y comidas americana (US) y EPA (agencia de protección del medio ambiente)⁽²³⁾. En los últimos años ha habido un gran interés en el estudio de los A.E, ya que han sido utilizados en extenso en la medicina tradicional llegando a tener aplicación en la biomedicina. Los AE son mezclas complejas que pueden contener entre 20 y 60 compuestos de diferentes estructuras químicas en concentraciones muy diferentes. Normalmente, sus propiedades son atribuidas a dos o tres componentes mayoritarios, los cuales determinan su actividad biológica. Estos cubren un amplio rango de propiedades, tales como antioxidantes, antimicrobianas, antitumorales, antiinflamatorios y antivirales, debido a un número de compuestos fenólicos y terpenos, entre ellos monoterpenos (timol y carvacrol) y sesquiterpenos⁽¹¹⁾.

La mayoría de los A.E son seguros ⁽⁵⁴⁾ y además no se ha descrito desarrollo de resistencia microbiana ⁽²⁷⁾. Por su parte, el aceite esencial de Orégano (A.E.O) también conocido como *Origanum Vulgare* se ha estudiado con respecto a sus propiedades, las cuales se establecen con relación a su composición de monoterpenos y monoterpenoides, si bien depende de la extracción, origen y tipo de planta ⁽⁵⁶⁾; estas especies de orégano son ricos en carvacrol (47.9%) y timol ⁽¹³⁾, y se ha reportado su potencial en contra células cancerosas de melanoma, mama, hígado y colon ^{(13), (17), (18) (19), (20)}.

Debido a sus características físicas y químicas, estos presentan reacciones de conversión o degradación química, como la oxidación, isomerización, polimerización, lo cual hace que sean volátiles, dependiendo principalmente de parámetros ambientales como la temperatura, la luz y oxígeno atmosférico ⁽⁵⁷⁾. Además, los AE al ser compuestos lipofílicos y volátiles, lo que hace que los éstos sean difíciles de manejar y utilizar ⁽⁵⁸⁾. En esta dirección, las tecnologías de encapsulación y nano encapsulación, entre otras, representan uno de los mayores desafíos, para transportar los AE; esto mejoraría bioactividad de los OE ya que permiten la preservación de la actividad, una penetración más profunda en los tejidos y una más fácil absorción, obteniendo control y la modulación de la liberación de los ingredientes activos en el sitio objetivo ⁽²⁹⁾.

3.2 Aceite esencial de Orégano (AEO)

La especie de orégano conocido como *O. vulgare* pertenece a la familia de las *Lamiaceae*. Es una planta perenne y nativa de la región euro-asiática y mediterránea. Los componentes abundantes en el AE extraído por arrastre de vapor son monoterpenoides y monoterpenos, como carvacrol y timol

(dependiendo de la localización geográfica). Los polifenoles y taninos varían considerablemente dependiendo del tipo y origen de la planta ⁽⁵⁾. Este alto contenido de ácidos fenólicos y flavonoides ^{(33), (35)}, es la razón del potencial antimicrobiano, fungicida, insecticida y antioxidante de este aceite esencial y del extracto del orégano, lo cual ha suscitado un gran interés farmacéutico e industrial ⁽³⁶⁾. La literatura ha demostrado que los componentes de los AE del orégano, como el carvacrol y el timol poseen propiedades antioxidantes y pueden actuar como potentes compuestos antitumorales y antimelanogénicos ⁽¹⁸⁾. Los antioxidantes naturales pueden proteger el cuerpo humano de los radicales libres y podrían retrasar el progreso de muchas enfermedades crónicas ⁽³⁶⁾. La oxidación de los lípidos se asocia con el daño en la membrana celular, el envejecimiento, las enfermedades cardíacas y el cáncer en los organismos vivos ⁽³⁶⁾. La modulación de los efectos carcinógenos y mutagénicos por inhibidores de origen vegetal ha sido de crucial importancia para el resultado final de algunos efectos biológicos, en especial para el cáncer ⁽¹⁷⁾.

Dentro de las líneas de cáncer oral, se destaca el carvacrol, pues este induce citotoxicidad y apoptosis a través de la vía de caspasa-3 y especies reactivas al oxígeno (ROS) en concentraciones dependientes. En líneas como Tca 8113, SCC-25 se reportó que se inhibe la proliferación a través de la regulación negativa de expresión de CDK4 y la regulación positiva de expresión de p21 resultando en una disminución significativa de las células en fase S ⁽²²⁾. En el caso del timol, otro de los componentes principales de los aceites esenciales, demostró ser citotóxico en líneas celulares como Cal-27, SCC-4, en donde se

evidenció que el mecanismo anti cancerígeno involucra disfunción mitocondrial, y generación de ROS, culminando en la apoptosis⁽⁷⁾.

Sin embargo, el uso de estos aceites, al igual que otros, el AEO podría evaporarse o descomponerse fácilmente durante el procesamiento de alimentos, formulación de medicamentos y la preparación de películas antimicrobianas, debido a su volatilidad, exposición directa al calor, presión, luz u oxígeno. Con el fin de superar la susceptibilidad y mejorar estabilidad de AEO durante el procesamiento y almacenamiento, se han desarrollado diversos métodos para su vehiculización o encapsulación, uno de ellos son las emulsiones.

3.3 Emulsiones.

Una forma de vehiculizar los A.E, es a través de las emulsiones, éstas son un ejemplo de coloides metaestables, que consisten en dos líquidos inmiscibles entre sí ⁽⁵⁹⁾, en donde uno es dispersado en el otro, en presencia de agentes activos en la interfase aceite-agua. Las emulsiones son utilizadas ampliamente debido a su capacidad para transportar activos inestables en agua, otra de sus ventajas es que mejora la biodisponibilidad de aceites y puede lograr liberación controlada del principio activo deseado.

Las emulsiones suelen estabilizarse con tensoactivos sintéticos, que deben añadirse a una concentración mínima, ya que se pueden alterar la función de la barrera epitelial y en consecuencia causar irritación ⁽⁶⁰⁾, dañando las membranas celulares y con un uso prolongado de estos pueden introducirse en el torrente sanguíneo y causar otros efectos adversos ⁽²⁸⁾. Algunos

tensoactivos pueden ser intrínsecamente tóxicos o alterar la farmacocinética de los fármacos coadministrados.

Para evitar el uso de surfactantes y evaluar la viabilidad de los A.E, una alternativa son las emulsiones de Pickering ⁽²⁹⁾, las cuales son estabilizadas por partículas sólidas por medio de un mecanismo de adsorción en la interfase Aceite -Agua, causando una disminución significativa de la tensión en la superficie interfacial ⁽¹²⁾, siendo la alta resistencia a la coalescencia ⁽¹¹⁾ el mayor beneficio en la estabilización por medio de estas partículas.

3.4 Emulsiones Pickering.

Las emulsiones Pickering son emulsiones estabilizadas por partículas sólidas en lugar de emulsionantes clásicos. Se han considerado una estrategia interesante para incorporar fármacos en formulaciones farmacéuticas. Estas emulsiones recibieron el nombre, debido a quien las describió en 1907 ⁽²⁹⁾ ⁽³¹⁾, sin embargo, los orígenes de la estabilización se exploraron más allá de los trabajos citados. En 1860 y 1877 William Haynes y los hermanos Bessel publicaron una patente informando el fenómeno de estabilización ⁽⁶¹⁾.

Dado lo anterior, es que algunas partículas biológicamente inertes y no tóxicas, como las de celulosa, quitosano ⁽³⁹⁾, sílica ⁽³⁷⁾, carbonato de calcio ⁽⁶²⁾, entre otras, pueden ser usadas para desarrollar nuevas posibilidades de emulsiones de Pickering de base biológica.

3.5 Carbonato de calcio.

Dentro de los materiales inorgánicos, el carbonato de calcio (CaCO_3) ha sido ampliamente investigado y se ha descrito su utilidad en la estabilización de las

emulsiones Pickering, particularmente en la industria alimentaria, médica y farmacéutica ⁽⁶³⁾; debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, bajo costo, y su respuesta activa frente a cambios de pH, ya que en virtud de su naturaleza es soluble en ambiente ácidos, por lo que puede añadir propiedades funcionales a la emulsión Pickering, tras convertir las partículas de CaCO_3 en iones calcio [5, 6]. El CaCO_3 se encuentra en tres formas, aragonita, calcita y vaterita, dentro de estas, calcita es la más estable termodinámicamente en condiciones estándares, cada una de ellas presenta una morfología característica, donde la aragonita es de forma alargada, la vaterita esférica y calcita romboédrica ⁽⁶⁴⁾.

3.6 Alginato de Sodio.

El alginato de sodio (ALG) es un polímero biodegradable que ha sido utilizado ampliamente como un candidato para la construcción de varios sistemas de liberación de fármacos. Éste se puede entrecruzar con cationes multivalentes como el Zn^{+2} , Al^{+3} y Ca^{+2} en una solución acuosa ⁽⁶⁵⁾. Se ha observado que el hidrogel Ca-ALG posee buenas propiedades, al no ser tóxico, es biocompatible y biodegradable. Además, según varias publicaciones reportan que el ALG al ser agregado estabiliza la emulsión, debido a las propiedades de carga, y gelificación ⁽⁶⁶⁾. Sin embargo, aquellos que solo están formados por alginato presentan inestabilidad física y una estructura porosa, por lo que liberaría rápidamente los compuestos biológicamente activos ⁽⁶⁷⁾.

En este trabajo se combinan los conceptos de gelificación ionotrópica mediante la reticulación iónica de biopolímeros polianiónicos, alginato, en la interfase de una emulsión Pickering estabilizada con CaCO_3 , la cual fue utilizada como

tratamiento en dos líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas. Además, este proceso en primera instancia cuenta con la emulsión de una fase oleosa con una dispersión de CaCO_3 , luego una vez incorporadas las nanopartículas de CaCO_3 en la interfaz aceite/agua, se agrega un biopolímero polianiónico (alginato) a la emulsión (figura 1). Posteriormente se reduce el pH de la emulsión para disolver las nanopartículas de CaCO_3 , en donde serán liberados los iones Ca^{+2} lo cual desencadenará que las cadenas del biopolímero se entrecrucen en la periferia formando una interfase continua envolviendo el aceite.

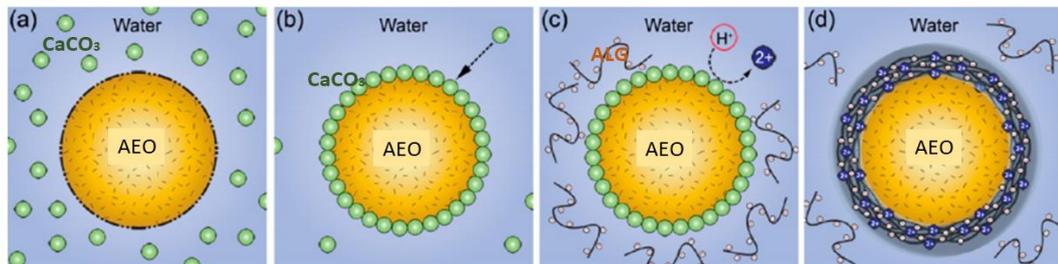


Figura 1: Esquema de emulsión pickering con alginato. Modificado de ilustración de Leong et al, 2015.

En vista de lo anterior es que actualmente no existen estudios con respecto a las emulsiones *Pickering* aplicadas al territorio buco maxilo facial en donde se vea potenciado el uso de A.E junto a partículas que tienen acción similar a estos aceites. Además, esto podría traer un beneficio con una amplia aplicación siendo un medio sostenible, seguro (no tóxico) y accesible al tratamiento coadyuvante de esta patología.

Considerando todos los antecedentes anteriormente expuestos es que este trabajo de investigación responderá a la siguiente pregunta de investigación.

Pregunta de investigación:

¿Las emulsiones Pickering podrán potenciar el efecto farmacológico del aceite esencial de *Origanum vulgare* en células tumorales de carcinoma oral de células escamosas?

4. Hipótesis

“Las microcápsulas de alginato potencian el efecto citotóxico del aceite esencial de *Origanum vulgare* en células tumorales de carcinoma oral de células escamosas”.

5. Objetivo general y objetivos específicos.

5.1 Objetivo General.

Evaluar el efecto sobre la viabilidad celular de las microcápsulas de alginato de aceite esencial de *Origanum vulgare* en células tumorales de carcinoma oral de células escamosas.

5.2 Objetivos Específicos.

5.2.1 Estudiar la síntesis y caracterización de las microcápsulas de alginato cargadas con Aceite esencial de *Origanum vulgare*.

5.2.2 Evaluar el efecto citotóxico de las emulsiones de Pickering cargadas con Aceite esencial de *Origanum vulgare*, estabilizadas con partículas de carbonato de calcio sobre líneas celulares de COCE.

5.2.3 Evaluar el tipo de muerte celular por el cual las emulsiones de Pickering inducen el efecto citotóxico en las líneas celulares de COCE.

6. Materiales y métodos.

6.1 Recolección vegetal y extracción del aceite esencial:

Origanum vulgare fue colectado durante la floración primaveral en Chicauma, Lampa, Región Metropolitana, Chile (33°14'23"S, 70°54'27"W). El espécimen fue identificado por la taxónoma Alicia Marticorena (MSc) en el Herbario CONC, Universidad de Concepción, Chile (número de registro del herbario CONC 191040) (68). El aceite esencial se extrajo de 300 g de hojas frescas por arrastre de vapor durante 3 h, con un rendimiento promedio de 2,5 mL por ciclo de extracción. La densidad del aceite esencial fue de 0,920 g/mL, calculada como la relación entre la masa de 1 mL de aceite esencial y la masa de 1 mL de agua destilada a 20 °C. El aceite esencial recogido se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

6.2 Reactivos:

Carbonato de sodio, (Na_2CO_3 , Merck)), hidróxido de sodio (NaOH), nitrato de sodio (NaNO_3), nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, timol (#090M0156V- Sigma-Aldrich®), alginato (#051M0054V- Sigma-Aldrich®), ácido acético (CH_3COOH). medio de cultivo eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa (DMEM high glucose,#D7777 Sigma-Aldrich®), Suero fetal Bovino (FBS del inglés Fetal Bovine Serum, #04-127-1^a, Biological Industries®), solución de penicilina-estreptomicina (#03-031-1B, Biological Industries®), bicarbonato de sodio (#S5761, Sigma-Aldrich®), dimetilsulfóxido (DMSO,#276855, Sigma-Aldrich®), ácido clorhídrico (HCl, #AC0065, Winkler®), Tampón fosfato (PBS al 10X, #16505, Merck®), tripsina EDTA solución A (#03-050-1B, Biological

Industries®), kit de ensayo MTT (#M6494, Thermo Fisher Scientific®), solución azul de tripán (#25-900-CI, Corning®), kit de ensayo caspasa -3 (ab39401, ABCAM), kit de ensayo de citotoxicidad de LDH CyQUANT™ (#16270972, Invitrogen™ C20301).

6.3 Síntesis de partículas Carbonato de Calcio:

Para la síntesis de CaCO_3 , se realizan dos soluciones, en donde la solución 1 (60 mL de agua milliq) comprende una mezcla de Na_2CO_3 0,1 M, NaOH 0,2M, y NaNO_3 0,18M, y la solución 2 (60 mL de agua milliq) se agregó $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,1 M. La solución 2 se depositó en una jeringa de 60 mL y a una velocidad de 0,5 mL /min se agregó a la solución 1, en agitación a 600 rpm a una temperatura constante de 25° ⁽⁶⁹⁾. Una vez finalizada la reacción, se filtró con papel filtro (diámetro de poro 11 μm) al vacío y se mantuvo en una estufa por 24 h a 60°C.

6.4 Análisis del aceite esencial por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

El AEO se diluyó con diclorometano y se analizó 1 μL de la muestra utilizando un GC-MS/MS, Thermo Scientific (GC: modelo Trace 1300 y MS: modelo TSQ8000Evo) que funcionaba en modo EI a 70 eV, equipado con un inyector sin división (250 °C). La temperatura de la línea de transferencia era de 250 °C. Se utilizó helio como gas portador a una velocidad de 1,2 mL/min, y la columna capilar empleada fue una Rtx-5 ms (60 m x 0,25 mm i.d., espesor de película 0,25 μm). El programa de temperatura fue de 40 °C (5 min) a 300 °C (5 min) a una velocidad de 5 °C/min. La composición química del aceite se identificó comparando sus espectros con una biblioteca del NIST14 y se

confirmó contrastando los índices de retención con datos publicados en otros estudios.

6.5 Síntesis de emulsión Pickering:

Se utilizó el método descrito por Leong et al ⁽⁷⁰⁾. Se agregan 3 mL de A.E.O, el cual fue emulsificado en la dispersión de nanopartículas de CaCO₃ (5%p/v), mediante un homogeneizador Omni "Tissue Master 125" a 6390 rpm por 30 min. La emulsión Pickering (EP) resultante se mantuvo reposando a temperatura ambiente, sin luz por 24 horas para que las fases se separen. Luego de 24 h, se tomaron 50 µL de la fase separada de la emulsión de Pickering O/W, dispersada en 1 mL de una solución polianiónica biopolimérica de alginato 2.5% p/v bajo agitación mecánica por 15 minutos. Luego, se adiciona ácido acético 1M gota a gota (~ 25 µL) sobre la EP hasta un pH 4, para disolver las partículas de CaCO₃ e iniciar la gelación ionotrópica en la periferia de las gotas de aceite. El proceso de gelificación ionotrópica continuó por 60 min antes de diluir la dispersión en 20 mL de agua desionizada. Se almacenaron en agua ultrapura para la posterior caracterización de EP+ALG.

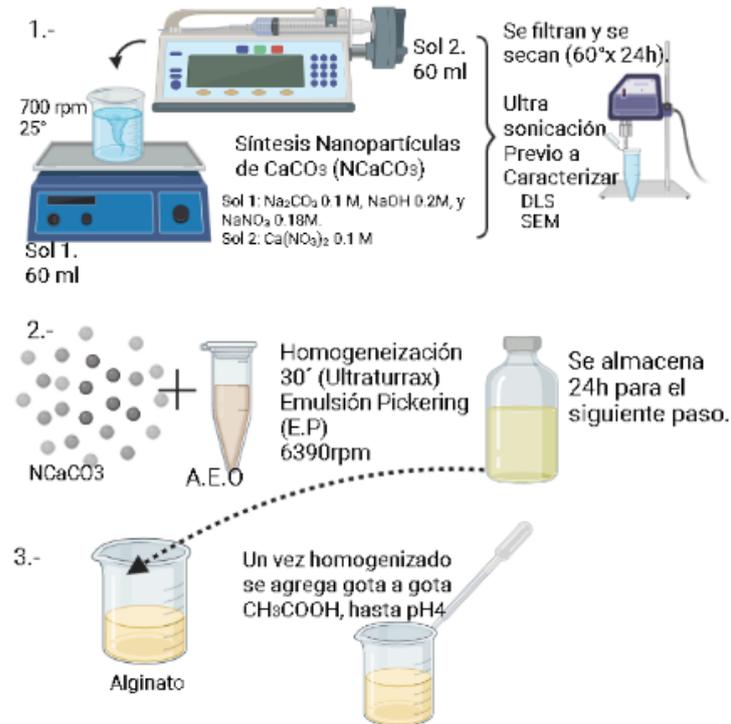


Figura 2. Esquema representativo del protocolo metodológico de EP+ALG.

6.6 Caracterización EP y EP+ALG; Potencial Z (pZ), índice de poli dispersión y microscopía.

El tamaño medio y pZ de las partículas y emulsión formadas se midieron mediante dispersión de luz dinámica (DLS) utilizando Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern instruments, UK). La muestra se diluyó hasta 100 veces con agua desionizada, los resultados se presentarán como la media de tres lecturas consecutivas. Se realizó además análisis de las muestras de nanopartículas a través de electrónica de barrido y de las emulsiones EP y EP+ALG a través de microscopía electrónica de transmisión.

6.7 Ensayo de liberación y eficiencia de encapsulación

El perfil de liberación de A.E.O se realizó en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) y Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco alto en glucosa (DMEM), que se utilizó como medio de liberación del fármaco para simular el entorno de crecimiento celular. En primer lugar, se introdujeron 5 ml de suspensión de EP+ALG en una bolsa de diálisis (34 kDa). A continuación, esta bolsa de diálisis (en duplicado) se sumergió en 60 mL de tampón PBS (pH=7,4) y DMEM (pH= 7,2) se colocó en un baño de agitación (37 °C, 200 rpm), realizado en tres ensayos de forma independiente. A intervalos predeterminados, se retiró 1 ml de tampón PBS del medio y se sustituyó por una cantidad igual de PBS o DMEM fresco. Finalmente, se utilizó un espectrofotómetro UV-vis para medir la absorbancia de la solución liberada a 275 nm y determinar la cantidad de AEO liberada.

Para determinar la eficiencia de encapsulación (EE%) se tomó como referencia la siguiente fórmula⁽⁷¹⁾:

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \left(\frac{\text{Aceite total} - \text{Aceite superficie}}{\text{Aceite total}} \right) \times 100\%$$

6.8 Líneas y cultivos celulares.

Las líneas celulares Cal 27 (ATCC® CRL-2095™), SCC-25 (ATCC® CRL-1628™), son células de carcinoma escamoso de lengua humana y la línea celular no tumoral, queratinocitos orales (donados por Prof. Dr. Wilfredo González -Arriaga, Universidad de Valparaíso- Universidad de los Andes). Fueron mantenidas en DMEM alto en glucosa (Gibco, Carlsbad, CA, USA).

Todos los medios fueron suplementados con 1% de solución penicilina-estreptomicina y FBS al 10% y 5% respectivamente. Todas las líneas celulares fueron mantenidas en ambiente de 37° C y 5% CO₂.

6.9 Ensayo de viabilidad celular MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-ilo) -2,5-bromuro de difeniltetrazolio).

La citotoxicidad de EP+ALG se midió a través de la determinación de la viabilidad celular, lo que permitió determinar la potencia, efectividad y selectividad de estos. El efecto en la viabilidad celular se evaluó mediante método colorimétrico basado en la reducción de sal tetrazolio (MTT) ⁽⁷²⁾. Fueron cultivadas 20.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y luego incubadas durante 24 horas. Se realizaron tres ensayos de forma independiente en triplicado, tanto con el A.E.O y EP+ALG. Cada pocillo fue incubado con concentraciones crecientes de con las respectivas concentraciones crecientes durante 48 h. Luego se descartó el sobrenadante y se incubaron con 100 µL por pocillo de MTT 0,5 µg/ml durante 2 h. Los cristales de formazán formados fueron disueltos con 40 µL de DMSO e incubando durante 15 min a 37°C con agitación. La absorbancia fue medida mediante un lector ELISA (BioRad, Hércules, CA) a 570 nm. Bajo estas condiciones, la absorbancia es directamente proporcional al número de células viables en cada pocillo.

6.10 Ensayo Caspasa -3.

Se sembraron 4x10⁶ células en placas de 60 mm las cuales fueron tratadas con las concentraciones máximas, IC₅₀, mínimas del tratamiento, más el control positivo y negativo. Posteriormente se realiza lisis celular con buffer de

lisis celular y se incuban las células por 10 min en hielo, se centrifugaron a 10.000 g por 1 minuto, se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo. Para el procedimiento de detección se utilizó una placa de 96 pocillos, en donde se agregan 50 µL de cada muestra a un pocillo, se adicionan 50 µL de la mezcla de los reactivos de reacción de buffer 2x y DTT a las muestras y finalmente se agregan 5 µL de DEVD-p-NA, se deja a 37°C por 120 min y se realizó la lectura a 405 nm en un lector de placas.

6.11 Ensayo de citotoxicidad lactato deshidrogenasa (LDH)

Se sembraron 1×10^5 células en una placa de 12 pocillos, se adiciona el tratamiento y se esperan 48 horas. Luego, se toman 50 µL del medio (sobrenadante) y se deja en una placa de 96 pocillos. Las células pegadas se lavan con PBS y se adiciona tritón 0,01%, luego del lisado se toman 50 µL para dejarlo en la placa de 96 pocillos. Se agregan 50 µL de la mezcla de sustrato a las muestras sobrenadantes y lisadas. En oscuridad se incuban y se agita por 15 min, y se mide en el lector de placas a 490 nm ⁽⁷³⁾ en Invitrogen™ Ensayo de citotoxicidad de LDH CyQUANT™.

6.12 Análisis Estadístico.

Para todos los experimentos, la significancia estadística se estableció con un valor de $p < 0,05$. Los resultados se representan con sus respectivos promedios y desviación estándar (\pm DE) de al menos tres experimentos independientes, cada uno realizado por triplicado. Todos los análisis estadísticos se determinaron a través del software GraphPad Prism (V6.0). Los datos se evaluaron a través de un análisis de varianza unidireccional (ANOVA)

(con la prueba posterior de Tukey post-test) la cual se realizó para comparar los grupos experimentales y con sus controles cuando correspondía.

7. Resultados

7.1 Síntesis de nanopartículas de Carbonato de Calcio.

Una vez realizada la síntesis de nanopartículas, se realizó el análisis en el equipo de dispersión de la luz dinámica (DLS) Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern instruments, UK). En primera instancia se realizó un *screening*, para evaluar el tiempo necesario de utilización del ultrasonicador, con el objetivo de obtener el menor valor en relación con su tamaño. Para lo cual, se masaron 0,02 g de CaCO₃ en 1 mL de agua Milli-Q (agua ultrapura), luego se realizaron diluciones en 1/10, 1/50 y 1/100, a diferentes tiempos de ultrasonificación (30, 60, 120, 180 segundos) (ver tabla 1).

CaCO ₃	Tamaño	Potencial	Z	PDI
1/10 (n=3)	(promedio/ μm)	(promedio)/mV		(prom)
180 seg	2,9 \pm 0,29	-10,5 \pm 0,32		0,235 \pm 0,12
120 seg	0,67 \pm 0,15	-15,6 \pm 0,11		0,59 \pm 0,08
60 seg	1,05 \pm 0,14	-15,7 \pm 0,503		0,54 \pm 0,06
30 seg	2,3 \pm 1,6	-11,9 \pm 2,39		0,86 \pm 0,17

Tabla 1. Screening de CaCO₃ a diferentes tiempos de ultrasonificación. Análisis en DLS, tamaño, potencial Z y PDI. Medias y DE \pm .

CaCO ₃	Tamaño	PotencialZ	PDI
(120s)	(promedio)/ μm	(promedio)/mV	(prom)
1/100	0,32 \pm 2,88	-29 \pm 0,57	0,329 \pm 0,05
1/50	0,37 \pm 0,07	-41,6 \pm 2,5	0,352 \pm 0,04
1/10	0,71 \pm 0,05	-24,2 \pm 0,6	0,545 \pm 0,04

Tabla 2: CaCO₃ a diferentes diluciones en DLS, tamaño, potencial Z, PDI. Medias \pm y DE.

Posteriormente se realizaron mediciones a diferentes disoluciones para evaluar diferencias, obteniéndose menores tamaños (ver tabla 2). Para

determinar su estabilidad de la síntesis de estas nanopartículas se determinó el índice de polidispersión (PDI), el cual indica la heterogeneidad del tamaño en el medio (74). En estos resultados se refleja la heterogeneidad de la distribución del tamaño (tabla 2), observándose una forma que coincide con el polimorfo de Calcita corroborado por FTIR, en donde marca a la señal de 713 cm^{-1} , la cual es característica del enlace C-O en el cristal de calcita. Cabe mencionar que la banda de 1410 cm^{-1} corresponde a la vibración de estiramiento asimétrico entre C-O y el peak 873 cm^{-1} se atribuye a la vibración de flexión fuera del plano del enlace C-O (Figura 3).

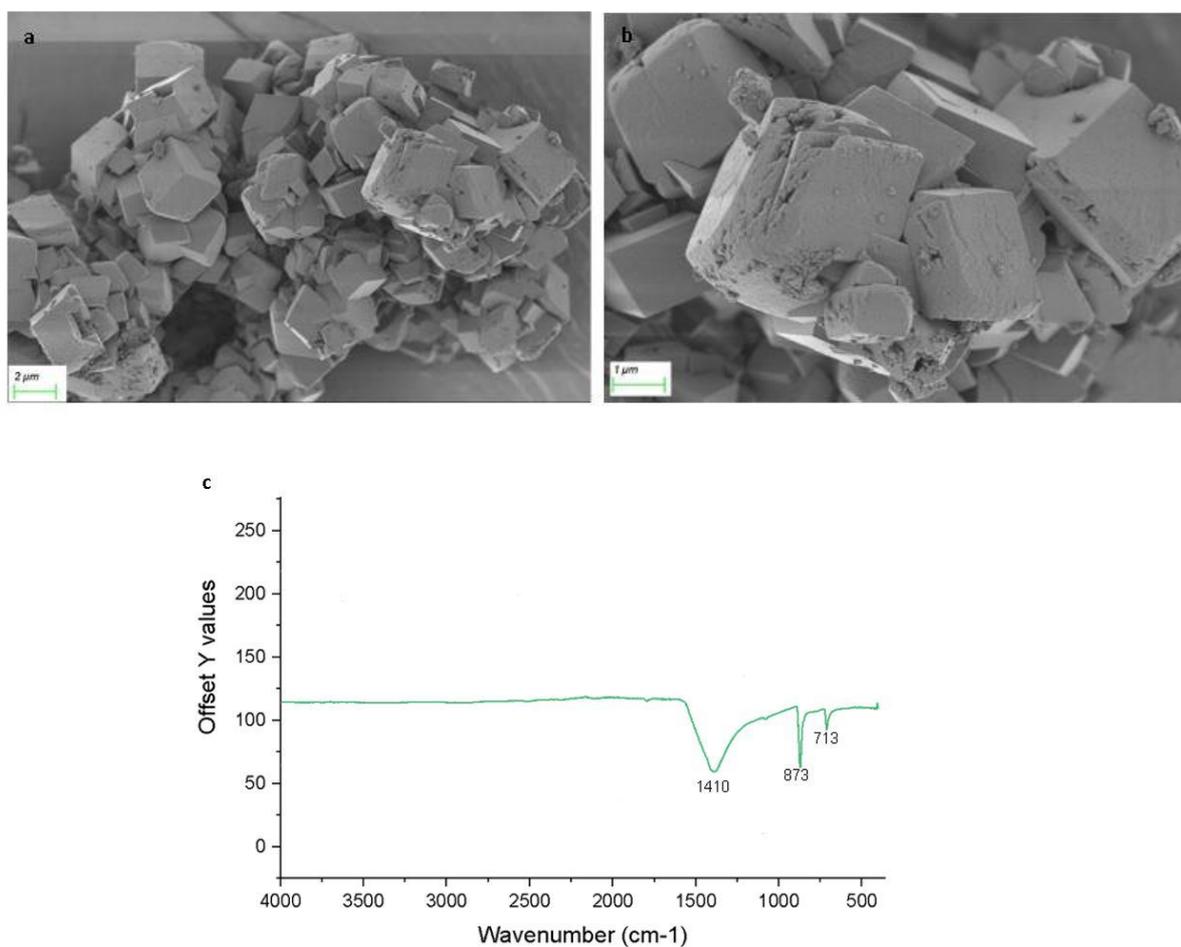


Figura 3: (a y b). SEM Carbonato de Calcio (CaCO₃). Escala dentro de la imagen SEM (c). FTIR CaCO₃

7.2 Caracterizar las propiedades físicas y químicas del AE de *Origanum vulgare*.

El análisis de A.E.O fue realizado por cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS) a través del equipo de GC-MS, Thermo Scientifics (modelo Trace 1300 y modelo TSQ8000 Evo), operando el modo EI a 70 eV. La temperatura de la línea de transferencia fue de 250 °C. Se utilizó helio como gas portador a una velocidad de 1,2 ml/min y la columna capilar utilizada fue una Rtx-5ms (60m x 0,25 mm y espesor de película 0,25µm). El programa de temperatura fue de 40°C (5 min) a 300°C (5 min) a una velocidad de 5°C/min. Los principales componentes detectados fueron timol (14,2%), carvacrol (2,64%), cis- sabineno (16,7%) y 4-terpineol (13,6%).

N°	Compuesto	RIa	% área	Identificación
1	sabineno	991,2	2,84	MS, RIb
2	α-terpinoleno	1037,5	5,02	MS, RIc
3	p-imene	1045,8	2,20	MS, RIb
4	γ-terpineno	1080,3	11,66	MS, RIb
5	4-tiujanol	1089,2	3,01	MS, RIb,

6	hidrato de cis-sabineno	1124,0	16,72	MS, RIb
7	4-terpineol	1205,5	13,57	MS, RIb, Co-I
8	α -terpineol	1218,3	3,13	MS, RIb, Co-I
9	metil carvacrol	1269,9	3,17	MS, RIb
10	acetato de linalilo	1277,1	3,99	MS, RIb
11	timol	1314,5	14,20	MS, RIb
12	carvacrol	1324,0	2,64	MS, RIb
13	cariofileno	1465,2	3,56	MS, RIb

Tabla 3: Compuestos principales detectados en aceite esencial de *Origanum Vulgare*. (RIa: índice de retención, MS: detector de masas, RI: infarrojo, Co-I: columna).

Cada vez que fue extraído, se midió su densidad, la cual en promedio se obtuvo $900 \pm 0,461 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

7.3 Sintetizar y caracterizar las EP y EP+ALG.

Una vez realizada las emulsiones, se realizó el análisis por dispersión de la luz dinámica (DLS), de las emulsiones Pickering, obteniendo los resultados descritos en la tabla 4 en donde se realizaron mediciones en diferentes tiempos, a las 24 h y a los 7 días.

Emulsión Pickering	Tamaño (promedio/ μm)	Potencial Z (promedio)/mV	PDI (prom)
E.P 1 d	$1,9 \pm 0,11$	$-48,8 \pm 6,2$	$1 \pm 0,01$
E.P 7 d	$6,8 \pm 0,26^*$	$-35,9 \pm 1,2$	$0,316 \pm 0,29$

Tabla 4: Caracterización de emulsión Pickering (EP) en DLS, prom \pm /DE y tamaño, potencial Z y PDI.

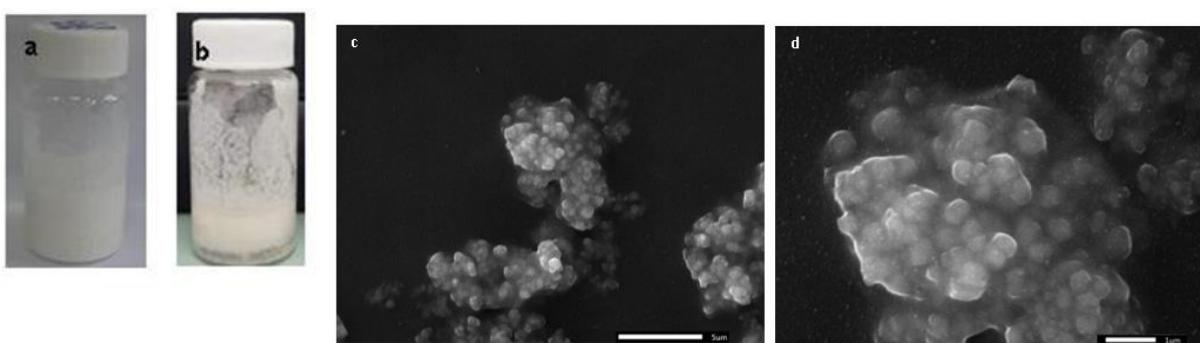


Figura 4: Emulsión Pickering (EP). (a) y (b) EP 5% AEO, (c) y (d) Caracterización en SEM de EP. Escalas dentro de la imagen.

Posterior a la síntesis de la EP, ésta es agregada a una solución de alginato. Las abundantes partículas de CaCO_3 de la E.P se convierten en el reservorio de iones calcio para posteriormente llevar a cabo el entrecruzamiento con las cadenas de alginato de sodio (EP+ALG) (70). Una vez completada esta etapa se analizaron en DLS a diferentes tiempos (ver tabla 5); dentro de los resultados se puede evidenciar que los valores cambian a lo largo del tiempo. Se realizaron mediciones al día 1, a los 7, 14 y 30 días de realizada la síntesis. Los valores del día 1 corresponden a un tamaño de $2,6 \mu\text{m}$, pZ de -63mV y un

PDI de 1. A los 7 días resultaron con un tamaño de 3 μm , pZ de -36 y PDI de 0,69, a los 14 días el tamaño varía a 690 nm, pZ -39 y PDI 0,94 y a los 30 días se observó un tamaño de 607 nm, pZ de -44 y PDI de 0,65. Con respecto a estos resultados, se puede decir que existen diferencias significativas entre el día 1 y los días 14 y 30. En cuanto a los otros parámetros, el pZ y PDI no presentan diferencias.

En las imágenes obtenidas en TEM se pueden observar diferentes mediciones con relación a los diámetros de las gotas de las emulsiones, lo que coincide con la tabla 5.

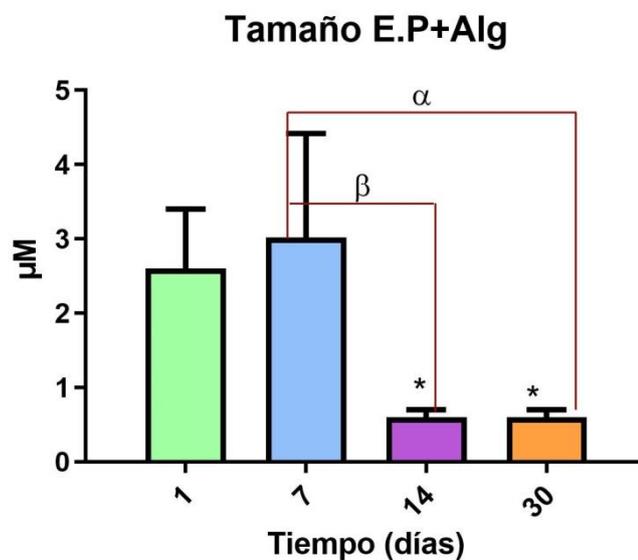


Figura 5: Tamaño de Emulsión EP+ALG. Resultados en media, \pm DE, * $p \leq 0,05$ vs tiempo 1h. α y β ; $p \leq 0,05$ vs tiempo 7 h (n=3).

EP+ALG	Potencial Z (prom)/mV	PDI(prom)
1 d	-63,93 \pm 2,14	1 \pm 0,001
7 d	-36,7 \pm 2,46	0,696 \pm 0,33
14 d	-39,9 \pm 5, 37	0,94 \pm 0,05
30 d	-44 \pm 7	0,6525 \pm 0,01

Tabla 5: Caracterización de EP+ALG en DLS en diferentes tiempos, tamaño, potencial Z, PDI(n=3).

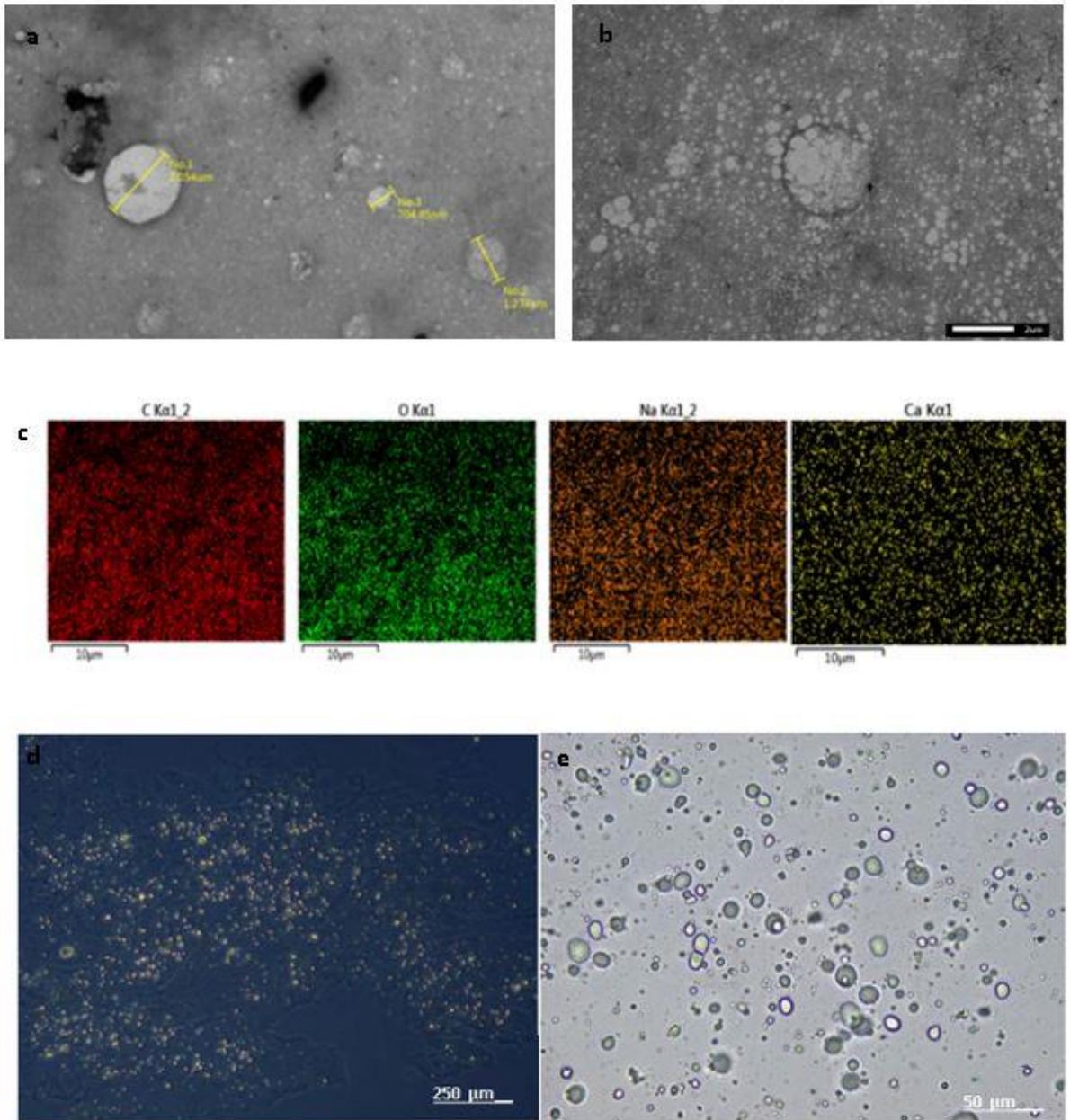


Figura 6: Análisis de EP+ALG. (a) y (b) Emulsiones EP + Alg en Pickering en TEM. (x7.500), (c) Mapeo elemental EDX de EP+ALG, (d) y (e) Microscopía óptica de Contraste de campo oscuro de EP+ALG (10x) y campo claro (40x)

7.4 Perfil de liberación *in vitro* de A.E.O de EP+ALG.

En primera instancia, con el objetivo de estandarizar la cantidad de aceite de orégano a encapsular, se realizó una curva de calibración de timol (figura 7), ya que se tomó como referencia para realizar las mediciones del AEO. Posteriormente se realizó un barrido del AEO en el equipo de espectro UV/VIS a través de un espectrofotómetro (Jasco V-550 UV/VIS) en donde se identificó un pico en la longitud de onda de 275 nm, correspondiente a timol. En relación con este resultado se realiza curva de calibración de A.E.O con soluciones de PBS y DMEM; la cual se toma como referencia para realizar experimento de liberación.

Curva de calibración de Timol.

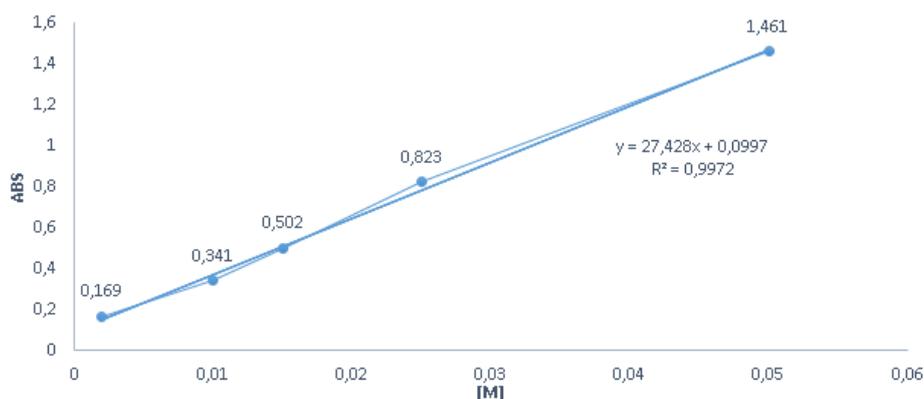


Figura 7: Curva de calibración de Timol realizado UV-vis a concentraciones ascendentes.

Medio	0,25 h(a)	0,5 h(b)	1 h(c)	3 h(d)	8h(e)	10 h(f)	24 h(g)
PBS	0,07±0,03f	0,17± 0,05f	0,29±0,07	0,42±0,11	0,52±0,16 a	0,70± 0,19	0,95±0,27 abcde
DMEM	0,10± 0,01	0,39± 0,29f	0,65±0,37	0,96±0,45	1,29± 0,52 a	1,64± 0,52	1,91± 0,54 abc

Tabla 6: Liberación de A.E.O ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en medio PBS(n=3) y DMEM (n=3) a diferentes tiempos.

Resultados representados en medias \pm DE letras $p < 0,05$

En la tabla 6 se puede observar el valor de A.E.O ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) liberado en ambos medios a diferentes tiempos en un rango de 0,25-24 h, se realizó en medio de tampón fosfato pH=7,4 (PBS) como en el medio de cultivo celular (DMEM), este último utilizado en las líneas celulares. En el caso de la liberación en el medio de PBS se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las 24 h con todos los tiempos, excepto a las 10 h. A diferencia de la liberación en DMEM, solo se encontraron diferencias significativas entre las 24 h y a los 15, 30 y 60 min de la liberación, además se observó una diferencia significativa entre los 30 min y las 10 h.

Entre ambos perfiles no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) (ver gráfico 5), como se puede observar en ambos casos presentan un aumento de liberación máximo entre las 8 y 10 horas, siendo significativo, el cual permanece constante entre las 24 h y 48 h.

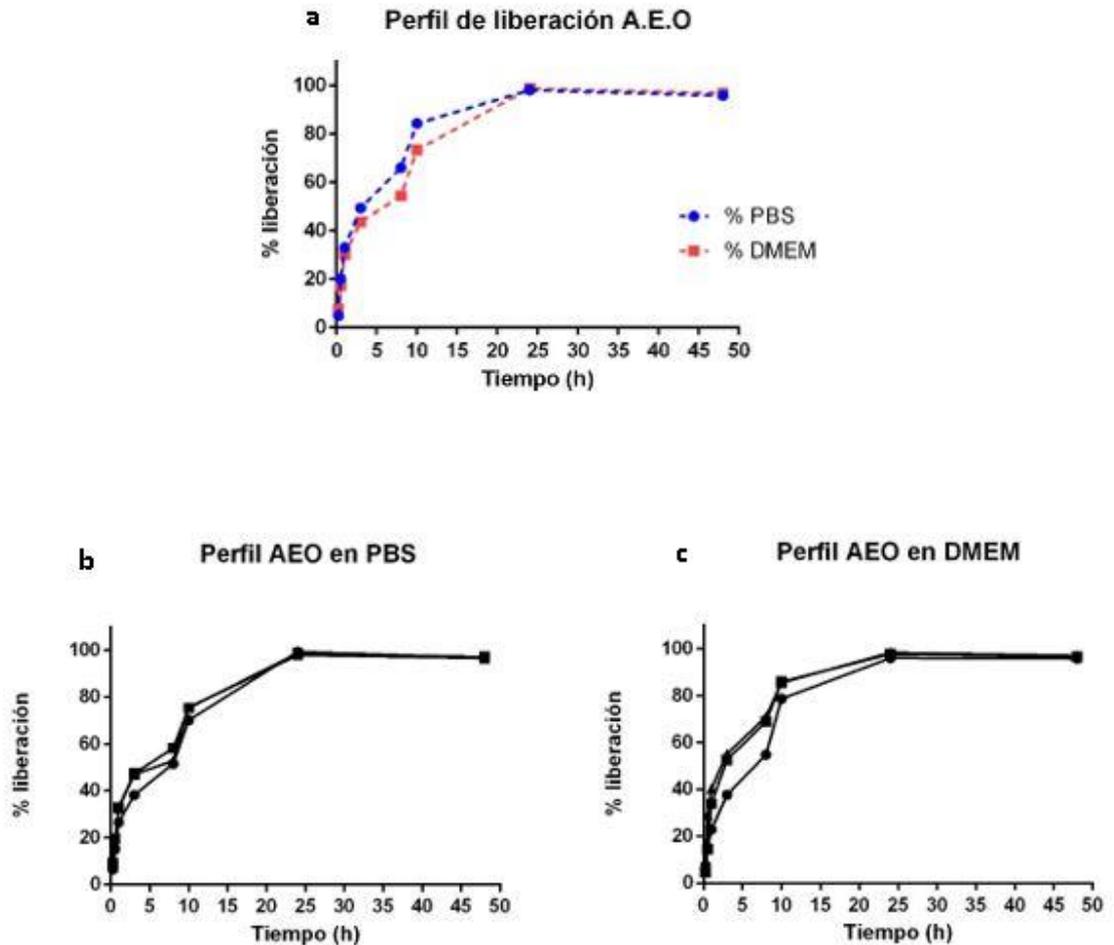


Figura 8: (a) Liberación (%) de A.E.O en medio PBS y DMEM. (n=3), (b) PBS y (c) DMEM. A diferentes tiempos en un rango de (0,25 a 24 h)

7.5 Eficiencia de encapsulación (EE%)

La eficiencia de encapsulación fue definida como el contenido de AEO encapsulado en el Ca/ALG y se calculó según la siguiente fórmula ⁽⁷¹⁾:

$$Eficiencia\ de\ encapsulación\ (\%) = \frac{Aceite\ total - Aceite\ superficie}{Aceite\ total} \times 100$$

Para el AEO libre, se calculó a partir del sobrenadante después de centrifugar a 2800 rpm durante 3 min la cual fue analizada por espectrofotometría a 275

nm. Se realizó un promedio de las muestras (n=6) y se obtuvo una EE% de $80\% \pm 5,5$. Esto fue verificado al momento del término de la diálisis, en donde se tomó lo restante de la bolsa de diálisis, y se midió de forma antes mencionada. Luego de evaluar diferencias en los tiempos en que se midió el perfil de liberación se determinó que en las mediciones de 15 y 30 min se estaba midiendo el aceite superficial.

7.6 Viabilidad celular

Se evaluó la citotoxicidad de AEO y EP+ALG en 8 concentraciones, en el caso del AEO en un rango de 0,5 - 4 μ g/mL y de EP+ALG en un rango de 0,75-2,5 μ g/mL durante 24 y 48 h mediante curvas dosis-respuesta semilogarítmicas en las tres líneas celulares representadas en las figuras 5, 6 y 7.

Las figuras 8a, 8b, 8c, 8d representan la disminución de la viabilidad de la línea celular Scc-25 tras la incubación con AEO y EP+ALG por 24 y 48h, a medida que aumentaba la concentración de la emulsión administrada se producía disminución de la viabilidad. Al estimar la concentración inhibitoria del 50% de la viabilidad (IC₅₀) no se distinguió un aumento de la potencia a medida que se aumentaba el tiempo de exposición de las células a los tratamientos, sin embargo, se puede destacar que a las 48 h la potencia farmacológica de EP+ALG es mayor que el AEO.

Las figuras 9a, 9b, 9c y 9d representan la disminución de la viabilidad celular en la línea celular Cal-27 tratada con AEO y EP+ALG. En ambos tratamientos se observó una reducción de la viabilidad celular conforme al aumento de las concentraciones estudiadas. Además, se reportó un aumento de la potencia en la medida en que se aumentaba el tiempo de exposición.

La figura 7 representa la viabilidad celular en la línea celular tuija, queratinocitos orales, tratada con AEO y EP+ALG con un tiempo de exposición de 48 h. En relación, a estos resultados podemos inferir que al ser tratadas con AEO solo existe un 20% de células vivas, en cambio con EP+ALG existe una disminución de la viabilidad celular en forma gradual a medida que aumenta la concentración.

Los resultados demuestran que EP+ALG genera un efecto citotóxico en ambas líneas celulares tumorales dosis dependientes; la viabilidad celular disminuyó conforme al aumento de la concentración de EP+ALG, sin embargo, hubo aumento de la potencia sólo en Cal-27 entre ambos tiempos. Por otro lado, se encontró una eficacia del 100% en la línea celular Scc-25 a las 48 h con el tratamiento de EP+ALG, a diferencia de la línea celular Cal-27 con un 84%.

Los valores IC_{50} obtenidos de las curvas dosis-respuesta, son resumidos en la tabla 7. Se puede observar en estos resultados que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), en el caso de la línea celular Scc-25, entre el IC_{50} del tratamiento de AEO y EP+ALG a las 48 h, por lo que se evidencia un aumento de la potencia farmacológica del AEO encapsulado. En la línea celular Cal-27 existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre IC_{50} del tratamiento de AEO a las 48 h con el tratamiento de EP+ALG en ambos tiempos estudiados, es decir a las 24 y 48 h, sin embargo, no existe una potencia farmacológica de AEO en este resultado.

En cuanto a la línea celular tuija, se puede mencionar que hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0,05$), lo cual evidencia que el AEO al estar en el sistema EP+ALG demuestra ser menos citotóxico (Figura 10), ya

que hay solo un 20% de viabilidad celular al tratarlas con AEO. No se demostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de IC_{50} de las líneas celulares tumorales y la no tumoral a las 48 h. Para comparar los IC_{50} entre las líneas celulares tumorales y la no tumoral se realizó a través del índice de selectividad, calculado a partir del cociente de los IC_{50} de la línea celular no tumoral y célula tumoral. En relación a este resultado se puede mencionar que el AEO presenta baja selectividad, ya que el índice de selectividad en línea celular Scc-25 fue de 1,15 y en Cal-27 fue de 1,06, los cuales no fueron significativos.

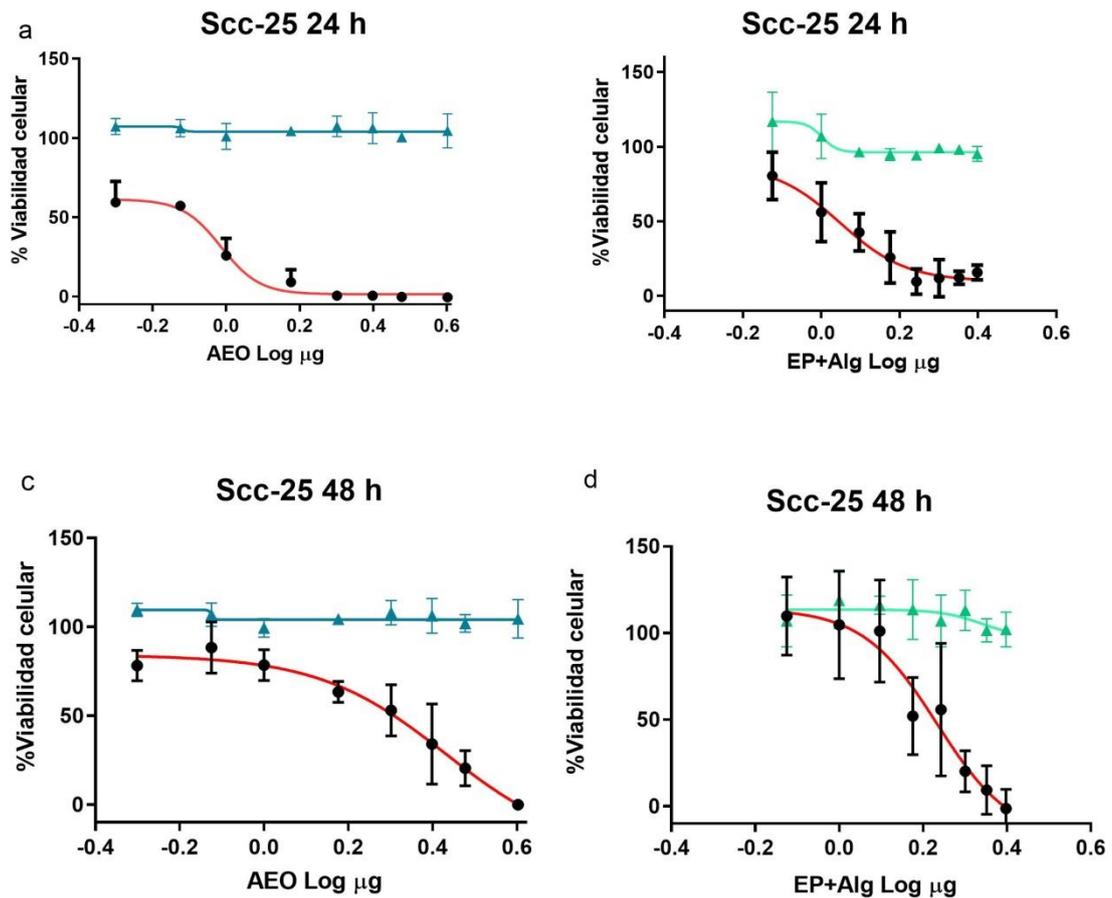


Figura 9: Curvas de concentración del efecto en la viabilidad celular en línea celular Scc-25 tratadas con concentraciones crecientes de AEO (a) y (c) control negativo de DMSO, y EP+ALG (b) y (d) control negativo de EP+ALG sin AEO, durante 24 y 48 h. Los valores representan las medias y DE \pm de al menos tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó por triplicado.

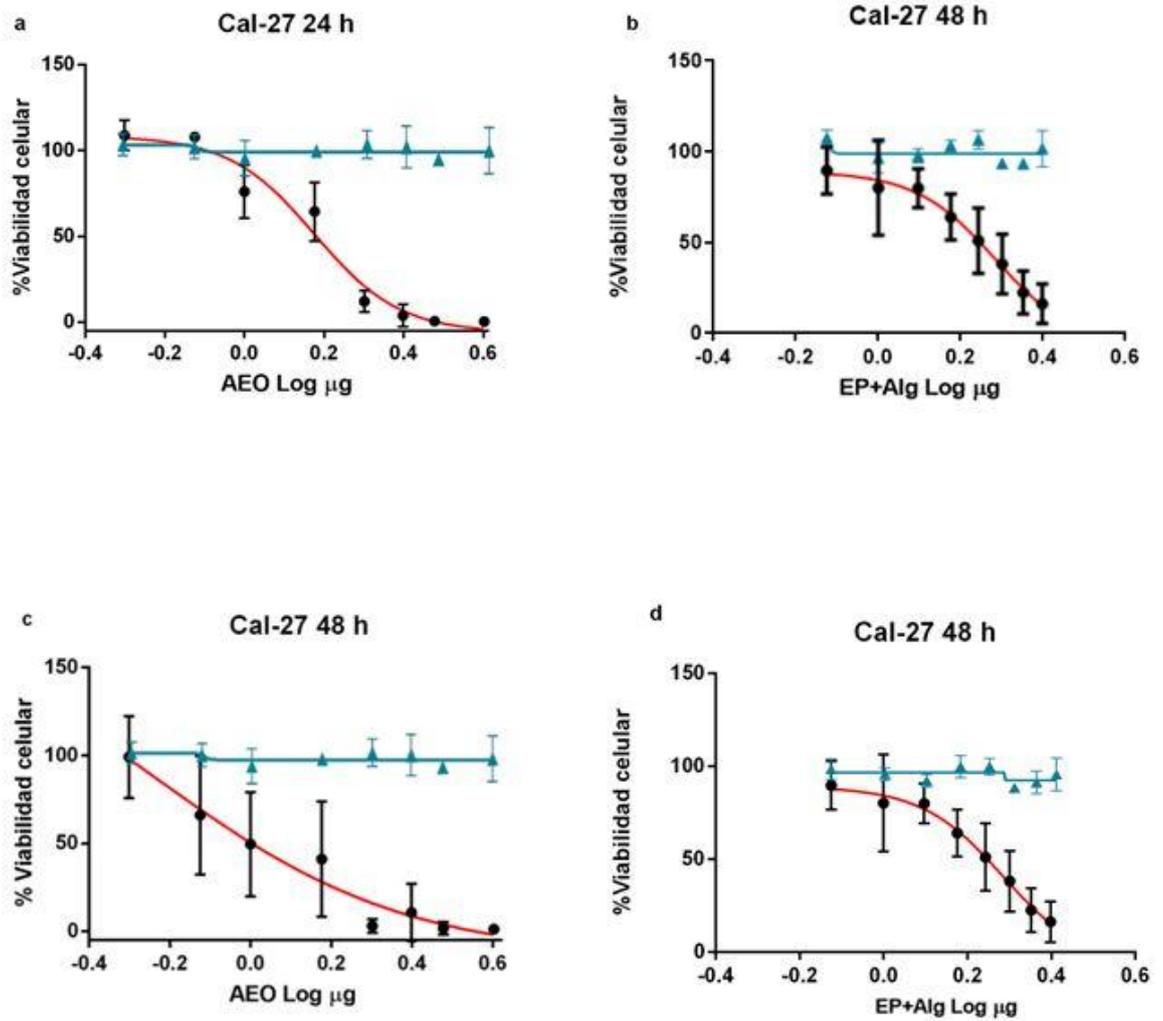


Figura 10: Curvas de concentración del efecto en la viabilidad celular en línea celular Cal-27 tratadas con concentraciones crecientes de AEO (a) y (c) con control negativo de DMSO, y EP+ALG (b) y (d) con control negativo de EP+ALG sin AEO, durante 24 y 48 h. Los valores representan las medias y DE \pm de al menos tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó por triplicado.

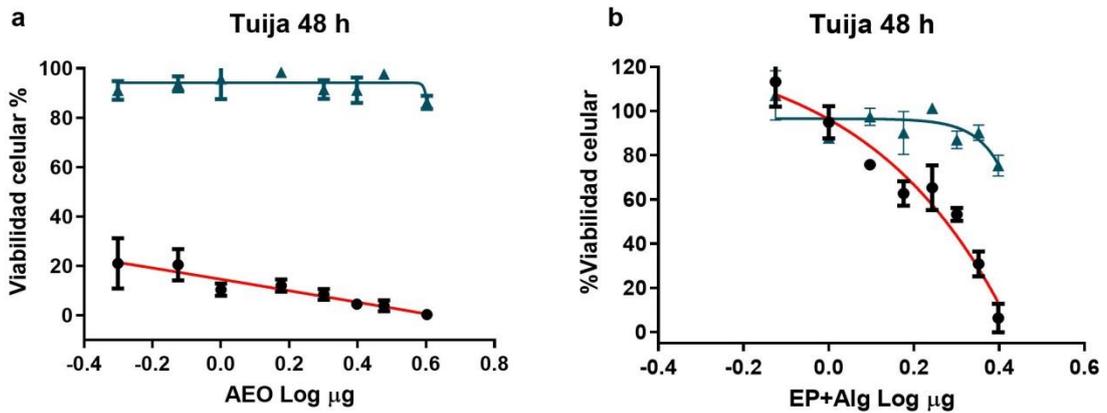


Figura 21: Curvas de concentración del efecto en la viabilidad celular en línea celular queratinocitos (Tuija) tratadas con concentraciones crecientes de AEO (a), y EP+ALG (b), durante 48 h. Los valores representan las medias y DE \pm de al menos tres experimentos independientes. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Tratamiento	24h		48h		
	Scc-25	Cal 27	Scc-25	Cal 27	Tuija
A.E.O (μg)	1,03 \pm 0,09a	1,49 \pm 0,05	2,7 \pm 0,16	0,97 \pm 0,33	<0,75
EP+ALG (μg)	1,12 \pm 0,06a	2,07 \pm 0,02b	1,7 \pm 0,53a	1,92 \pm 0,51b	2,21 \pm 0,45

Tabla 7: Citotoxicidad de los tratamientos de A.E.O y EP+ALG sobre líneas celulares Scc-25, Cal 27 y Tuija. IC₅₀= Concentración que resulta en la citotoxicidad del 50% después de las 24 y 48 h. Los valores representan los valores promedios \pm desviación estándar de al menos tres experimentos independientes. Cada experimento fue realizado en triplicado. p<0,05 a: Diferencias entre línea celular scc-25 b: Diferencias entre línea celular cal-27

7.7 Actividad Caspasa 3

Luego de evaluar la actividad citotóxica, se determinó si esta inhibición celular implica activación de mediadores apoptóticos. Para ello, realizamos un ensayo colorimétrico que determinó el nivel de activación de caspasa 3 con el kit de Caspasa -3 (ab39401) ABCAM, un efector de la apoptosis, en las células tratadas con EP+ALG. Utilizamos 3 concentraciones, la máxima (2,5 µg/mL), el IC50 determinado por cada línea celular, en el caso de Cal-27 1,9 µg/mL y 1,7 µg/mL en Scc-25, y la mínima (0,75 µg/mL), más dos controles, un control negativo, el sistema de emulsión sin AEO y un control positivo, estaurosporina 10 µM.

En la figura 11a y 11b, se pueden observar los resultados de las líneas celulares Scc-25 y Cal-27 respectivamente, de acuerdo a éstos se encontraron diferencias en la actividad de caspasa 3 en la línea celular Scc-25 entre el control negativo (sistema sin AEO) y las tres concentraciones evaluadas ($p < 0,05$). En relación a la línea celular Cal-27 se presentaron diferencias entre el control negativo y los tratamientos de 1,9 ($p < 0,05$) y 2,5 µg/mL ($p < 0,001$). Además, al realizar la prueba post hoc, se reportaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos, específicamente entre la concentración menor (0,75 µg/mL), y los dos tratamientos de mayor concentración (1,9 µg/mL y 2,5 µg/mL).

Se puede inferir que existe actividad apoptótica en ambas líneas celulares, siendo esta mayor en la línea celular Cal-27.

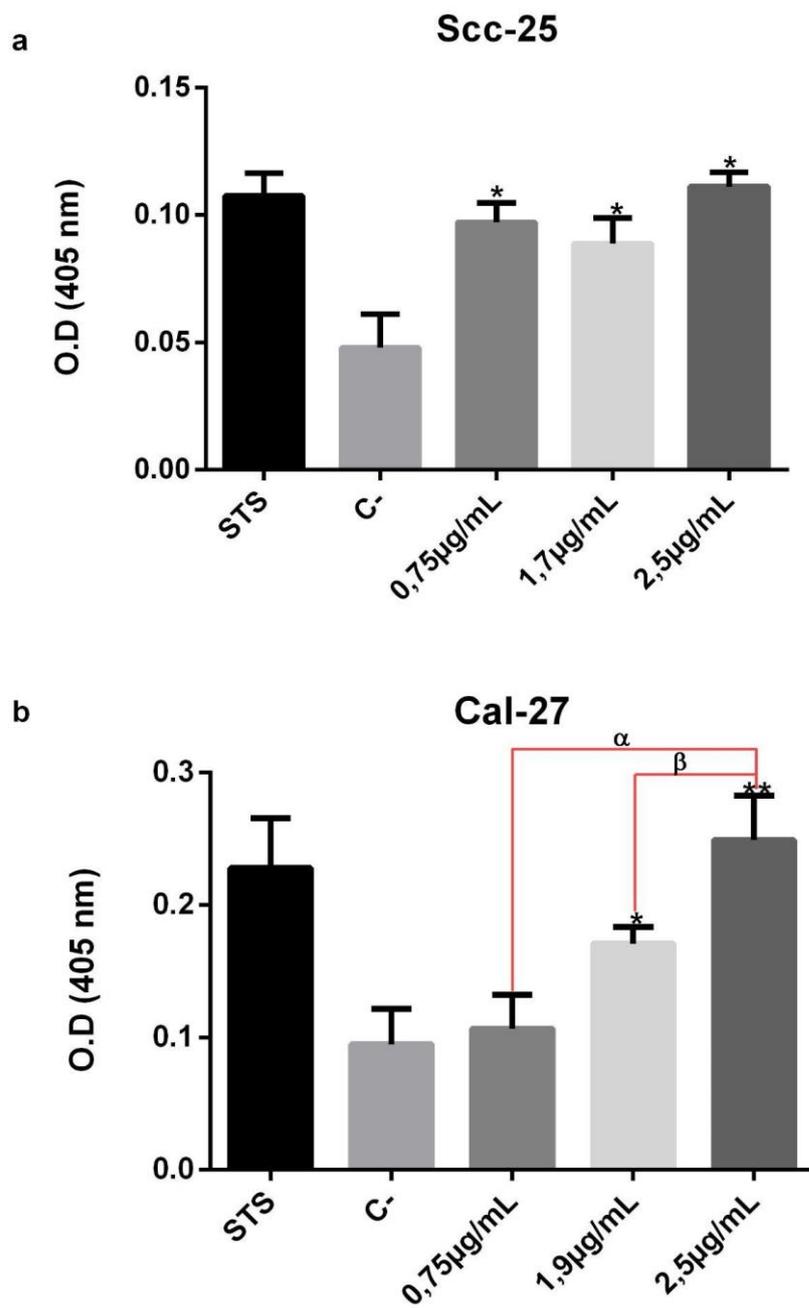


Figura 12: Actividad de caspasa-3. Medición de actividad de caspasa-3 en línea celular Scc25 y Cal-27 a las 48 h con EP+ALG en tres concentraciones (2,5 µg/mL, 1,9 µg/mL y 0,75 µg/mL) las cuales se compararon con el grupo control. Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces. * p<0.05 en relación con el control negativo. ** p<0,001, C positivo: estaurosporina 10 uM C negativo: emulsión sin AEO.

7.8 Actividad lactato deshidrogenasa

Dado que se evaluó la actividad apoptótica previamente, se determinó estudiar si el efecto de EP+ALG presentaba actividad LDH, a través de un ensayo colorimétrico. Este ensayo consiste en medir la actividad enzimática de la liberación de LDH; la cual se traduce en la liberación al medio de cultivo celular de las células muertas. Un análisis cuantitativo de la actividad de LDH determina el porcentaje de células muertas.

Se realizó tratamiento a las mismas concentraciones señaladas en el ensayo anterior; concentración máxima (2,5 $\mu\text{g/mL}$), el IC₅₀ determinado por cada línea celular, en el caso de Cal-27 1,9 $\mu\text{g/mL}$ y 1,7 $\mu\text{g/mL}$ en Scc-25, y la mínima (0,75 $\mu\text{g/mL}$). En la figura 12a y 12b muestran que en ambas líneas celulares hay actividad de LDH, por lo tanto, hay necrosis celular. En el caso de la línea celular Scc-25 existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el control negativo y las tres concentraciones evaluadas (Figura 12). En cambio, en la línea celular Cal 27, se observan diferencias significativas entre el control negativo y los tratamientos de mayor concentración e IC₅₀. Además, podemos decir que la actividad de LDH fue discretamente mayor en Cal-27 que en Scc-25.

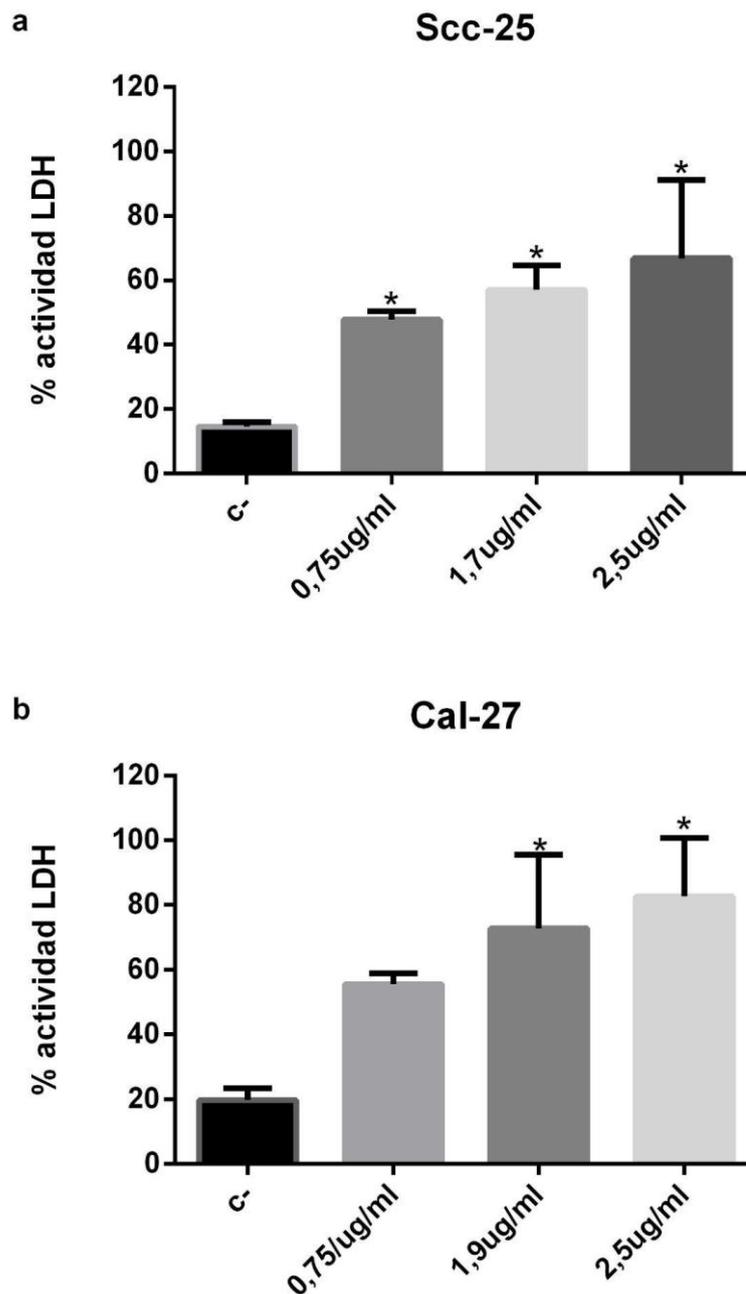


Figura 33: Actividad Lactato Deshidrogenasa Scc-25 y Cal-27. Las células fueron tratadas con EP+ALG en tres concentraciones (2,5 µg/mL, 1,9 µg/mL y 0,75 µg/mL) por 48 h. La actividad de LDH basal y total fueron determinadas en células sin tratar con tritón X-100 al 0,01%. La liberación se calculó como $[(\text{LDH sobrenadante} / \text{LDH total}) \times 100 (\%)]$. Todos los datos son presentados como medias D.E. Los valores fueron obtenidos por tres experimentos por separado. $p < 0,05$ ** diferencias en comparación a control negativo (emulsión sin AEO).

8. Discusión

En el presente estudio, se evaluó la citotoxicidad del aceite esencial *O. vulgare* en una microcápsula de Alginato, utilizando la emulsión Pickering con partículas de CaCO_3 como precursor, en dos líneas celulares de cáncer oral de células escamosas.

En la literatura se ha descrito el uso de los AEO en diferentes aspectos farmacológicos, lo que incluyen efectos antimicrobiano, antioxidantes y antitumorales ⁽⁷⁵⁾. Debido a que el AEO presenta características que limitan sus usos terapéuticos, tales como elevada volatilidad, escasa estabilidad, solubilidad en agua y biodisponibilidad, es que hemos estudiado la formulación de emulsiones Pickering como un precursor para la síntesis de microcápsulas para potenciar las propiedades antes mencionadas, además de mejorar la eficacia y estabilidad del AEO.

En este estudio determinó que el AEO tiene una composición particular a lo publicado anteriormente ⁽⁷⁶⁾, ⁽⁷⁷⁾, debido a que nuestra materia prima fue cosechada durante la temporada de primavera en la región de Chicauma, Lampa, Región Metropolitana, Chile, esto hace que este sea un aceite único en su composición, lo cual está dado por las diferentes condiciones ambientales y/o geográficas, tales como composición de la tierra del cultivo, el tipo de cultivo agrícola, exposición solar, momento de la cosecha, entre otras variables ⁽⁷⁸⁾, ⁽⁷⁹⁾ ⁽⁸⁰⁾. De acuerdo a nuestros resultados, el AEO presenta una mayor cantidad de 4-terpineol (13,5%), timol (14,2%) y cis-sabineno (16%).

Además, coincidentemente con lo descrito previamente con nuestros resultados, otros autores han obtenido que el timol está presente en un mayor porcentaje en comparación al carvacrol ⁽⁸¹⁾ ⁽⁸²⁾.

La estabilización del precursor Pickering se basa en reemplazar el tensoactivo por partículas sólidas, ya que se ha descrito que este surfactante puede causar irritación por contacto, y se han considerado que podrían alterar la farmacocinética del fármaco coadministrado. Estas partículas sólidas se adsorben de forma irreversible en la interfase de los líquidos inmiscibles, logrando la estabilidad de las emulsiones. En este estudio se utilizaron partículas de CaCO₃, en el precursor Pickering, éstas presentan diferentes propiedades, una de ellas es que son de fácil adquisición, baja toxicidad, biodegradables y, además, son biocompatibles, se caracterizan por poseer una estructura con una elevada área superficial, lo cual permite ser eficaz para administración de fármacos. En nuestros resultados, al realizar el análisis por DLS, obtuvimos partículas de CaCO₃ un tamaño promedio de 328 nm, siendo similar a reportes previos ⁽⁷⁰⁾, ⁽⁶⁹⁾. Por otro lado, el análisis con TEM y SEM arrojaron tamaños entre 75 y 300 nm con morfología cúbica, esta diferencia es debido a las condiciones de estos métodos, lo cual está dado por el equilibrio hidrostático en el caso del método por DLS. El polimorfo observado es característico de calcita, lo cual fue corroborado por FTIR, con las señales de 1401 cm⁻¹, 873 cm⁻¹ y 713 cm⁻¹. Esta última señal da cuenta de la vibración de deformación en el plano de enlace de C-O del cristal de calcita ⁽⁸³⁾.

En cuanto al pZ, el valor obtenido es de -29 mV en promedio, lo cual concuerda con reportes anteriores ⁽⁸⁴⁾. Este parámetro está relacionado con la predicción

de la estabilidad electrostática y carga eléctrica de la superficie de las partículas ⁽⁸⁵⁾. Esto se confirma con evidencia publicada anteriormente, en donde se afirma que son estables debido a una mayor carga negativa de las partículas (-25 a -60), lo que conlleva repelerse entre sí con mayor intensidad permitiendo que permanezcan en suspensión durante más tiempo ^{(86) (87)}.

Los resultados del precursor Pickering, entre partículas de CaCO₃ y el AEO, muestran que el tamaño promedio inicial es de 1900 nm, pZ de -48mV y un valor de PDI 1 a un día de la síntesis. A los 7 días estos valores cambian a un tamaño de 6867 nm, pZ de -35,9 mV y con un PDI de 0,3, esto conlleva que después de 7 días este precursor ha incrementado su tamaño promedio, se vuelve más estable y hay una disminución de la dispersión del tamaño, logrando ser homogénea, por lo tanto, hay una reorganización de éste por un fenómeno de fluoculación.

Estos valores cambian al momento de incorporar Alg, ya que al analizarlos a las 24 h de su síntesis presenta un tamaño de 2,6 µm, pZ de -63mV y un PDI de 1. Además, estos valores varían a lo largo del tiempo, al ser analizados a los 30 días el tamaño disminuye a 0,6 µm, Pz disminuye a -44 (30 días) y el valor de PDI varía a 0,6. Esto concuerda, con lo reportado previamente en donde se ha documentado que disminuye el tamaño a medida que se agrega ALG, lo cual puede ser explicado por la interacción electrostática entre el ALG y el bioactivo ⁽⁸⁸⁾, lo cual se refleja con estos resultados al comparar el tamaño de EP con EP+ALG. Además reportes previos^{(36) (70)} obtienen diámetros de 85 a 280 µm, mucho mayores en comparación a los obtenidos en este estudio. El cambio del valor del pZ se debe principalmente a que el ALG es un polisacárido

aniónico electronegativo, por lo tanto, el sistema se vuelve más negativo en presencia de Alg. Esto se correlacionó en nuestro estudio, ya que en las mediciones de EP el pZ (-48 mV) demostró ser inferior en comparación al pZ de EP+ALG (-63 mV). En el caso del PDI, cambia desde 1 a 0,6, lo que significa que el sistema tiene una dispersión más homogénea ⁽⁸⁷⁾, de esta forma lo que obtenemos es que sea de forma uniforme, con una disminución de la variabilidad del tamaño dado por el valor de PDI. Estos resultados se explican por un fenómeno que está relacionado con un fenómeno que presenta el Alg, el ovillo estadístico, ya que las cadenas poliméricas se reordenan soluciones concentradas a diluidas⁽⁸⁹⁾.

El perfil de liberación de EP+ALG, se realizó en dos medios, DMEM y PBS, debido a que uno de ellos es el medio de cultivo para las células tumorales, de esta forma para simular las condiciones de los ensayos celulares y el otro es un medio tampón con un pH neutro. En ambos medios, el perfil de liberación fue de forma gradual, lo cual se condice con estudios previos ^{(76), (90)}.

En ambos perfiles de liberación hubo una liberación continua entre las 8 y 10 horas, que llega a su máximo a las 24 h y esta se mantiene constante hasta las 48 h. Existe evidencia de que al utilizar de forma individual el Alg el fármaco se libera de forma expedita, por lo que se concluye que al utilizar el CaCO₃ aporta mayor estabilidad y de esta forma el bioactivo se liberaría de forma controlada ^{(91), (92)}. No se ha reportado la liberación del AEO en una micro encapsulación con CaCO₃ y Alg, por lo tanto, estos resultados demuestran una posible formulación en que el AEO pueda ser un potencial coadyuvante a la terapia del COCE.

La EE% fue de un 80%, diferente a lo logrado en estudios previos ⁽⁹³⁾, en los cuales este valor fue de un 35 a 45% de EE% de otros componentes bioactivos con CaCO₃ y Alginato ⁽⁹³⁾. Por lo tanto, este método podría presentar una mayor eficiencia respecto a reportes previos. Se ha evaluado la encapsulación del AEO en otros métodos de encapsulación ^{(94) (95)} en donde utilizaron quitosano y CaCO₃, en donde lograron obtener valores de EE% similares (84% y 69%) a los nuestros. En vista de estos datos, podemos concluir que este método es una formulación eficiente para encapsular bioactivos.

Anteriormente no se ha evaluado la actividad citotóxica del AEO encapsulado en líneas celulares de cáncer oral de células escamosas. Según nuestros resultados, el efecto citotóxico de EP+ALG se pudo evidenciar en ambas líneas celulares tumorales y esto se puede atribuir a los principales constituyentes (timol, carvacrol, 4-terpineol), así como también a sus componentes minoritarios. Además, a partir de los valores de IC₅₀ se puede concluir que en ambas líneas estudiadas se necesitó de una menor concentración del AEO encapsulado que del AEO. En comparación a otros reportes en la literatura en donde solo demostraban tener efecto con componentes individuales del aceite; Dai et al 2016 ⁽⁹⁶⁾, demostró que al tratar células Scc-25 con timol, obtuvo un IC₅₀ de 60 µM, en nuestro estudio utilizamos el aceite esencial encapsulado en la EP+ALG, por lo que, si lo comparamos con respecto a la cantidad de timol en nuestra emulsión, obtenemos 1,73x10⁻⁶ µM, siendo más potente. Por ende, podemos concluir que al encapsular el AEO total, presenta una mayor potencia farmacológica en comparación a los componentes de forma individual. Por su parte De la Chapa et al 2018 ⁽²²⁾, reporta un IC₅₀ de 350 µM al evaluar la

citotoxicidad de timol en células Cal-27, al contrario de nuestros resultados demuestran que este efecto se logra a $1,8 \times 10^{-6} \mu\text{M}$.

Con respecto a los IC_{50} se evidenció que solo en la línea celular de Scc-25 se obtuvo una mayor potencia (a las 48 h) del AEO al estar encapsulado (EP+ALG), a diferencia del AEO solo. Este resultado se corroboró con la medición de muestras del medio celular, en donde el cultivo celular se trató con el AEO, y se pudo observar una disminución de la absorbancia a las 48 h (Abs= 0.1). Además, como factores que influyen en cómo incide el efecto del AEO, se puede mencionar las condiciones ambientales como la temperatura, lo cual podría verse afectado la actividad citotóxica. Sin embargo, se evidenció un perfil de eficacia claramente distinto entre el AEO y el AEO encapsulado sobre las células no tumorales, indicándonos un efecto menos citotóxico sobre este tipo de células.

En términos del tipo de muerte celular a evaluar, observada como efecto de AE, el mecanismo de apoptosis consiste parte en la liberación de factores de iniciación de apoptosis mitocondrial al citosol, activando proteínas tales como caspasa 9 y 3, entre otras ⁽⁹⁷⁾. Para confirmar este mecanismo, en este estudio se seleccionó la medición de la actividad de caspasa 3 como mediador, ésta es una las responsables de la escisión de proteínas de citoesqueleto y proteínas nucleares, lo que conduce a cambios morfológicos y bioquímicos de las células apoptóticas, en esta investigación se evidenció actividad apoptótica.

Se ha reportado previamente que extractos de AEO encapsulado indujeron un aumento de la expresión caspasa-3 de 1,41 veces en comparación a su control ⁽⁹⁵⁾ en otros tipos de cánceres ⁽⁹⁸⁾, así como el timol ⁽⁹⁹⁾ ⁽¹⁰⁰⁾ de forma individual

ha demostrado inhibir la proliferación celular e inducir la apoptosis en varios tipos de neoplasias malignas ⁽¹⁰¹⁾. En el caso del COCE no existe literatura en que se haya evaluado el AEO y su potencial apoptótico, sin embargo, se ha demostrado que el timol tiene un rol en la activación de la apoptosis y se confirmó que es inducido a través de la vía apoptótica intrínseca ⁽¹⁰⁰⁾.

Entre las líneas celulares, se observó una mayor actividad de la caspasa-3 en la línea celular Cal-27 a diferencia de Scc-25, al compararlo con otras líneas celulares de otros carcinomas se puede dilucidar que el mecanismo de acción de este aceite esencial no ha sido estudiado de forma extensa, a diferencia de sus principales componentes como el timol o el carvacrol.

A diferencia de la apoptosis, la necrosis consiste en una forma de muerte celular rápida que es inducida por una noxa que daña la membrana celular ⁽¹⁰²⁾. Generando respuestas inflamatorias locales, y lisis celular, en consecuencia, esto se puede medir por la presencia del contenido citoplasmático en el medio extracelular, por ejemplo, midiendo la actividad de enzimas como la LDH. Por lo tanto, se evaluó el efecto de la EP+ALG a través de un ensayo de actividad de LDH en las líneas celulares tumorales estudiadas. Los resultados obtenidos mostraron que en ambas líneas celulares hay actividad de LDH, siendo mayor en la línea celular Cal-27. En la literatura no se encuentran estudios similares en donde se haya evaluado el efecto del AEO en estas líneas celulares, pero si podemos realizar una comparación con respecto al efecto del timol en otras neoplasias ⁽¹⁰³⁾.

Proyecciones y limitaciones.

Proyecciones.

Es primera vez que se conceptualiza, sintetiza y se realizan evaluaciones biológicas en líneas celulares de carcinoma oral de emulsiones de AEO encapsuladas mediante micropartículas de alginato utilizando emulsiones de pickering estabilizadas con partículas de CaCO_3 , lo cual representa el inicio de una nueva forma de administración de los AEO. Este tipo de encapsulación ha tenido un incremento en la utilización con diferentes bioactivos en la última década, y tal como el presente estudio se ha demostrado que es eficiente tanto la encapsulación como en la liberación prolongada, obteniendo un mayor tiempo de liberación del bioactivo.

Respecto a las limitaciones de este estudio, para evaluar con mayor precisión la estabilidad de las emulsiones, se deben realizar pruebas con otras condiciones, tales como cambios de temperatura, cambios de pH y concentración de CaCO_3 y ALG. Como también ensayos que den luces de las propiedades antitumorales y mecanismos moleculares de implicados.

9. Conclusión

El presente trabajo demuestra que es posible sintetizar EP+ALG utilizando CaCO_3 y AEO. Además, son estables en función del tiempo, presentan una liberación controlada, obteniendo la liberación total del AEO entre las 8 y 10 h, con una eficiencia de encapsulación del 80%.

LA EP+ALG evidenció tener efecto citotóxico en líneas celulares tumorales de COCE, a pesar de no tener un aumento de la potencia farmacológica, no es tóxico en la línea no tumoral estudiada en esta investigación. Finalmente presentó actividad apoptótica y necrosis en líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas.

Se puede concluir que este tipo de formulación es una forma promisoría de administración de sustancias lipofílicas como AE, por lo que podría ser una posible alternativa de coadyuvante en el tratamiento de cáncer oral de células escamosas. Sin embargo, se requiere del estudio de otros parámetros, tales como ambientes con cambios de pH, y/o temperatura, así como otras metodologías para evidenciar el rol del AEO en el proceso de muerte celular.

Con la protección intelectual y el desarrollo necesario se podría obtener un producto coadyuvante con una gran eficiencia de encapsulación aportando positivamente en los tratamientos de los CA de cabeza y cuello, lo cual tiene una gran significancia social.

10. Resúmenes presentados en Congresos

10.1 Resumen para I Congreso Virtual de la Universidad de Chile 2020.

“Aceites esenciales para el manejo de enfermedades orales, una revisión de la literatura”.

Introducción: Los productos naturales de origen vegetal se han utilizado a lo largo de la historia de la humanidad en la medicina tradicional, por lo que hoy nuevos productos farmacéuticos basados en productos naturales bioactivos están tomando protagonismo en los cuidados médicos y dentales. Estos componentes oleosos volátiles, llamados aceites esenciales presentan diversas actividades como antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorio, antiviral, antifúngica y anticancerígena.

Objetivo: Analizar la literatura en relación con la actividad de aceites esenciales de lavanda y orégano frente a lesiones de mucosa oral.

Metodología: Se realizó búsqueda en Pubmed, Scopus y Science Direct, usando términos “lavandula”, “lavender oil”, “origanum vulgare”, “oregano”. “mouth diseases”, “oral candidiasis”, “oral cancer”. Filtros: 10 años de antigüedad. Se incluyeron trabajos originales, estudios clínicos, revisiones de literatura, casos y controles

Resultados: De 50 artículos, se excluyeron 39 artículos, ya que utilizaban 1 componente activo del aceite esencial, estudiaban otro tipo de cáncer o no cumplían con los criterios de inclusión. De los 11 artículos 9 son estudios experimentales in vitro y dos son experimentales in vitro e in vivo. Todos concuerdan que estos aceites esenciales presentan actividad antifúngica y anticancerígena, dos de los estudios utilizaron estos aceites como coadyuvantes para mejorar el desarrollo del fármaco frente a Candidiasis oral.

Discusión: Si bien los autores señalan el potencial de estos aceites esenciales, se debe poner énfasis en el método de extracción, ya que puede variar si se

realiza con solventes acuosos o alcohólicos. Además, la variación geográfica es un factor a considerar cuando se precisa evaluar un extracto vegetal.

Conclusión (es): La aplicación de aceites esenciales ha ganado popularidad durante el último decenio. Muchos investigadores en el campo de la odontología y la farmacología han dedicado tiempo y recursos a la evaluación de productos naturales, descubriendo sus compuestos bioactivos y aplicándolos en diversos aspectos del mantenimiento de la salud bucal.

10.2 Resumen para Congreso Internacional de Sociedad de Patología bucomaxilofacial de Chile 2021.

Introducción: El carcinoma oral de células escamosas es una de las neoplasias más frecuentes en el mundo. Hoy las terapias convencionales presentan falta de eficacia debido a la multi-resistencia a fármacos, además de una serie de efectos adversos que afectan la calidad de vida del paciente. Es por esto que se propone el uso de productos naturales como los aceites esenciales como tratamiento coadyuvante. El aceite esencial *Origanum vulgare* (A.E.O) ha demostrado tener actividad citotóxica en diversos modelos celulares.

Objetivo: Evaluar in vitro el efecto citotóxico de aceite esencial de *Origanum vulgare* en células tumorales de carcinoma oral de células escamosas (SCC-25).

Metodología: El A.E.O se obtuvo a través de arrastre de vapor, el cual fue analizado por espectrofotometría UV-Visible. Se realizó viabilidad celular de SCC-25 y queratinocitos orales, a través de MTT, en donde las células fueron tratadas en concentraciones crecientes durante 24, 48 y 72 horas.

Resultados: Uno de los mayores componentes del A.E.O es el carvacrol e induce una alta citotoxicidad en las células SCC-25, a diferencia en las células de queratinocitos orales, donde no se observó dicho efecto.

Conclusión: El A.E.O tiene propiedades potenciales citotóxicas y antiproliferativas en las células de SCC-25 y se podría utilizar como una alternativa farmacéutica en el futuro en tratamientos de cáncer oral.

10.3 Resumen para 3er Congreso Anual ICOD 2022.

“Síntesis, caracterización y efecto citotóxico de nanoemulsión Pickering de *Origanum vulgare* en líneas celulares de carcinoma oral de células escamosas”

Introducción: El carcinoma oral de células escamosas es una de las neoplasias más frecuentes en el mundo. Las terapias convencionales presentan falta de eficacia debido a la multirresistencia, además presentan diversos efectos adversos que afectan la calidad de vida del paciente. Se ha propuesto usar productos naturales derivado de aceites esenciales (AE) como tratamiento coadyuvante. El aceite esencial de *Origanum vulgare* (AEO) ha demostrado actividad citotóxica en modelos celulares. Una de las formas de mejorar la actividad biológica es a través de la formulación de emulsiones Pickering (EP) con AE, cuya característica es estar estabilizada por partículas sólidas.

Objetivo general: Evaluar el efecto farmacológico de nEP de aceite esencial de *Origanum vulgare* en células tumorales de carcinoma oral de células escamosas.

Metodología: Se realizó obtención de AEO por arrastre de vapor, caracterizado por cromatografía de gases. La caracterización de EP fue realizada a través de

dispersión dinámica de luz. Se evaluó viabilidad celular de la línea celular SCC-25 a las 48 hrs, a través de ensayo de reducción de MTT. Los resultados se analizaron con software Graphpad prism 6.0.

Resultados: Se obtuvieron nanopartículas de CaCO₃ de tamaño de 305±2,88 nm en promedio, potencial Z -29 ±0,57mV y PDI 0.3. La EP presenta tamaños de 1900 ±112 μm, potencial Z de -48,8 ±6,2 mV y PDI =1. Los componentes mayoritarios del AEO: timol, carvacrol, y cis-sabineno. El IC₅₀ con AEO fue de 2,7 μg, y en la Ep fue de 4,6 μg

Discusión: La nEP se ha descrito como una forma liberación controlada de AE en el tiempo. Se observa que los parámetros estudiados de nuestra nanoemulsión son estables. Inhibe el crecimiento de células cancerosas manteniendo el efecto del AEO.

Conclusión: Las nEP de AEO presentan actividad citotóxica en células de SCC-25. Podría ser una nueva estrategia en el tratamiento a largo plazo de células cancerosas.

10.4 Resumen para XXXIV Reunión Anual IADR 2022, división Chile.

"Cytotoxic effect of Pickering emulsion on oral squamous cell carcinoma."

Introduction: Oral squamous cell carcinoma is one of the most frequent neoplasms in the world. Conventional therapies have lack efficacy due to multidrug resistance, and also present various adverse effects that affect the patient's quality of life. The use of natural products derived from essential oils (EO) has been proposed as an adjuvant treatment. Origanum vulgare essential oil (OEO) has demonstrated cytotoxic activity in cellular models. One of the

ways to improve the biological activity is through the formulation of Pickering emulsions (PE) with AE, whose characteristic is to be stabilized by solid particles. General objective: To evaluate the pharmacological effect of EP of *Origanum vulgare* essential oil on oral squamous cell carcinoma tumor cells.

Methodology: OEO was obtained by vapor entrainment, characterized by gas chromatography. Characterization of EP was performed by dynamic light scattering and scanning electron microscopy (SEM). Cell viability of two cell lines, SCC-25 and CAL-27 was evaluated at 48 hr, through MTT reduction assay. The results were analyzed with Graphpad prism 6.0 software.

Results: The PE presents sizes of $1900 \pm 112 \mu\text{m}$, Z potential of $-48.8 \pm 6.2 \text{ mV}$ and PDI =1. The major components of OEO: thymol, carvacrol, and cis-sabinene. The IC₅₀ for SCC-25 with OEO was 2.7 μg , and in PE it was 1.5 μg . In the case of CAL-27 the IC₅₀ with PE was 1.44 μg ($p \leq 0,05$.)

Conclusion: PE has been described as a controlled release form of OEO over time. It is observed that the studied parameters of our emulsion are stable. It inhibits the growth of cancer cells while maintaining the effect of OEO. Therefore, OEO present cytotoxic activity in SCC-25 and CAL-27 cells

11. Bibliografia.

1. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309-16.
2. Farquhar DR, Divaris K, Mazul AL, Weissler MC, Zevallos JP, Olshan AF. Poor oral health affects survival in head and neck cancer. *Oral Oncology.* 2017;73:111-7.

3. Figures CFa. Vol.: American Cancer Society.
2015 [Available from: <https://www.cancer.org/research/Available> from: cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2016.html.
4. Abati S, Bramati C, Bondi S, Lissoni A, Trimarchi M. Oral Cancer and Precancer: A Narrative Review on the Relevance of Early Diagnosis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020;17(24):9160.
5. Furness S, Glenny AM, Worthington HV, Pavitt S, Oliver R, Clarkson JE, et al. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010(9):Cd006386.
6. Tubtimsri S, Limmatvapirat C, Limsirichaikul S, Akkaramongkolporn P, Inoue Y, Limmatvapirat S. Fabrication and characterization of spearmint oil loaded nanoemulsions as cytotoxic agents against oral cancer cell. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018;13(5):425-37.
7. Fekrazad R, Afzali M, Pasban-Aliabadi H, Esmaeili-Mahani S, Aminizadeh M, Mostafavi A. Cytotoxic Effect of *Thymus caramanicus* Jalas on Human Oral Epidermoid Carcinoma KB Cells. *Brazilian Dental Journal*. 2017;28:72-7.
8. Dias DA, Urban S, Roessner U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. 2012;2(2):303-36.
9. Hickl J, Argyropoulou A, Sakavitsi ME, Halabalaki M, Al-Ahmad A, Hellwig E, et al. Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLoS One*. 2018;13(12):e0207574.
10. Gursoy UK, Gursoy M, Gursoy OV, Cakmakci L, Könönen E, Uitto VJ. Anti-biofilm properties of *Satureja hortensis* L. essential oil against periodontal pathogens. *Anaerobe*. 2009;15(4):164-7.
11. Pan W, Zhang G. Linalool monoterpene exerts potent antitumor effects in OECM 1 human oral cancer cells by inducing sub-G1 cell cycle arrest, loss of mitochondrial membrane potential and inhibition of PI3K/AKT biochemical pathway. *J buon*. 2019;24(1):323-8.
12. Chang WL, Cheng FC, Wang SP, Chou ST, Shih Y. *Cinnamomum cassia* essential oil and its major constituent cinnamaldehyde induced cell cycle arrest and

apoptosis in human oral squamous cell carcinoma HSC-3 cells. *Environ Toxicol.* 2017;32(2):456-68.

13. Spyridopoulou K, Fitsiou E, Bouloukosta E, Tiptiri-Kourpeti A, Vamvakias M, Oreopoulou A, et al. Extraction, Chemical Composition, and Anticancer Potential of *Origanum onites* L. Essential Oil. *Molecules.* 2019;24(14).

14. Zhao Y, Chen R, Wang Y, Qing C, Wang W, Yang Y. In Vitro and In Vivo Efficacy Studies of Lavender *angustifolia* Essential Oil and Its Active Constituents on the Proliferation of Human Prostate Cancer. *Integrative Cancer Therapies.* 2017;16(2):215-26.

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

16. Shamseddine L, Chidiac JJ. Composition's effect of *Origanum Syriacum* essential oils in the antimicrobial activities for the treatment of denture stomatitis. *Odontology.* 2021;109(2):327-35.

17. Begnini K, Nedel F, Lund R, Carvalho PH, Rodrigues M, Beira F, et al. Composition and Antiproliferative Effect of Essential Oil of *Origanum vulgare* Against Tumor Cell Lines. *Journal of medicinal food.* 2014;17.

18. Arunasree KM. Anti-proliferative effects of carvacrol on a human metastatic breast cancer cell line, MDA-MB 231. *Phytomedicine.* 2010;17(8-9):581-8.

19. Khan F, Khan I, Farooqui A, Ansari IA. Carvacrol Induces Reactive Oxygen Species (ROS)-mediated Apoptosis Along with Cell Cycle Arrest at G(0)/G(1) in Human Prostate Cancer Cells. *Nutr Cancer.* 2017;69(7):1075-87.

20. Nanni V, Di Marco G, Sacchetti G, Canini A, Gismondi A. Oregano Phytocomplex Induces Programmed Cell Death in Melanoma Lines via Mitochondria and DNA Damage. *Foods.* 2020;9(10).

21. Liang WZ, Chou CT, Lu T, Chi CC, Tseng LL, Pan CC, et al. The mechanism of carvacrol-evoked $[Ca^{2+}]_i$ rises and non- Ca^{2+} -triggered cell death in OC2 human oral cancer cells. *Toxicology.* 2013;303:152-61.

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

23. Pavoni L, Perinelli DR, Bonacucina G, Cespi M, Palmieri GF. An Overview of Micro- and Nanoemulsions as Vehicles for Essential Oils: Formulation, Preparation and Stability. *Nanomaterials*. 2020;10(1).
24. Li YF, Sun HW, Gao R, Liu KY, Zhang HQ, Fu QH, et al. Inhibited biofilm formation and improved antibacterial activity of a novel nanoemulsion against cariogenic *Streptococcus mutans* in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:447-62.
25. Sakamoto K, Lochhead RY, Maibach HI, Yamashita Y, Yamashita Y, Miyahara R, et al. . Emulsion and Emulsification Technology. *Cosmet. Sci. Technol.* . 2017 p. 489–506.
26. Gołębiowski M, Dawgul M, Kamysz W, Boguś MI, Wieloch W, Włóka E, et al. Antimicrobial activity of alcohols from *Musca domestica*. *Journal of Experimental Biology*. 2012;215(19):3419-28.
27. Das S, Horváth B, Šafranko S, Jokić S, Széchenyi A, Kőszegi T. Antimicrobial Activity of Chamomile Essential Oil: Effect of Different Formulations. *Molecules*. 2019;24(23):4321.
28. Mehling A, Kleber M, Hensen H. Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants. *Food Chem Toxicol*. 2007;45(5):747-58.
29. Pickering SU. CXCVI.-Emulsions. *J Chem Soc, Trans*. 1907;91(The Royal Society of Chemistry):2001-21.
30. Cunha AG, Mougel JB, Cathala B, Berglund LA, Capron I. Preparation of double Pickering emulsions stabilized by chemically tailored nanocelluloses. *Langmuir*. 2014;30(31):9327-35.
31. Ramsden W, Gotch F. Separation of solids in the surface-layers of solutions and 'suspensions' (observations on surface-membranes, bubbles, emulsions, and mechanical coagulation).—Preliminary account. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1904;72(477-486):156-64.
32. Lin Z, Zhang Z, Li Y, Deng Y. Magnetic nano-Fe₃O₄ stabilized Pickering emulsion liquid membrane for selective extraction and separation. *Chemical Engineering Journal*. 2016;288:305-11.

33. Leclercq L, Tessier J, Douyère G, Nardello-Rataj V, Schmitzer AR. Phytochemical- and Cyclodextrin-Based Pickering Emulsions: Natural Potentiators of Antibacterial, Antifungal, and Antibiofilm Activity. *Langmuir*. 2020;36(16):4317-23.
34. Shah BR, Li Y, Jin W, An Y, He L, Li Z, et al. Preparation and optimization of Pickering emulsion stabilized by chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for curcumin encapsulation. *Food Hydrocolloids*. 2016;52:369-77.
35. Sharma S, Verma A, Teja BV, Pandey G, Mittapelly N, Trivedi R, et al. An insight into functionalized calcium based inorganic nanomaterials in biomedicine: Trends and transitions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015;133:120-39.
36. Marquis M, Alix V, Capron I, Cuenot S, Zykwincka A. Microfluidic Encapsulation of Pickering Oil Microdroplets into Alginate Microgels for Lipophilic Compound Delivery. *ACS Biomater Sci Eng*. 2016;2(4):535-43.
37. Horváth B, Balázs VL, Varga A, Böszörményi A, Kocsis B, Horváth G, et al. Preparation, characterisation and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on *Streptococcus mutans* biofilm treatment. *Scientific Reports*. 2019;9(1):16611.
38. Asabuwa Ngwabebhoh F, Ilkar Erdagi S, Yildiz U. Pickering emulsions stabilized nanocellulosic-based nanoparticles for coumarin and curcumin nanoencapsulations: In vitro release, anticancer and antimicrobial activities. *Carbohydrate Polymers*. 2018;201:317-28.
39. Ilkar Erdagi S, Ngwabebhoh FA, Yildiz U. Pickering stabilized nanocellulose-alginate: A diosgenin-mediated delivery of quinalizarin as a potent cyto-inhibitor in human lung/breast cancer cell lines. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;109:110621.
40. Shang X, Liu Q, Qin T, Xu X, Sun H, Liu M, et al. Fabrication of cRGD-modified reduction-sensitive nanocapsule via Pickering emulsion route to facilitate tumor-targeted delivery. *International journal of nanomedicine*. 2019;14:3361-73.
41. Dhanuthai K, Rojanawatsirivej S, Thosaporn W, Kintarak S, Subarnbhesaj A, Darling M, et al. Oral cancer: A multicenter study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018;23(1):e23-e9.
42. Sarode G, Maniyar N, Sarode SC, Jafer M, Patil S, Awan KH. Epidemiologic aspects of oral cancer. *Disease-a-Month*. 2020;66(12):100988.

43. GLOBOCAN. GLOBOCAN Cancer Tomorrow (iarc.fr) [Estimated number of new cases from 2020 to 40, Both sexes, age [0-85+]]. Available from: Cancer Tomorrow (iarc.fr).
44. Candia J, Fernández A, Somarriva C, Horna-Campos O. Mortalidad por cáncer oral en Chile, 2002-2012. *Revista médica de Chile*. 2018;146:487-93.
45. Wong T, Wiesenfeld D. Oral Cancer. *Aust Dent J*. 2018;63 Suppl 1:S91-s9.
46. Santelices Ch MJ, Cárcamo IM, Brenner AC, Montes FR. [Oral cancer: Review of the Chilean literature]. *Rev Med Chil*. 2016;144(6):758-66.
47. Ettinger KS, Ganry L, Fernandes RP. Oral Cavity Cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2019;31(1):13-29.
48. Inchingolo F, Santacroce L, Ballini A, Topi S, Dipalma G, Haxhirexha K, et al. Oral Cancer: A Historical Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(9).
49. Ramirez V, Vásquez-Rozas P, Ramírez-Eyraud P. Mortalidad por cáncer oral y faríngeo en Chile, años 2002-2010. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*. 2015;8:133-8.
50. BÓRQUEZ M P, CAPDEVILLE F F, MADRID M A, VELOSO O M, CÁRCAMO P M. Sobrevida global y por estadios de 137 pacientes con cáncer intraoral: Experiencia del Instituto Nacional del Cáncer. *Revista chilena de cirugía*. 2011;63:351-5.
51. Yang Y, Chen D, Liu H, Yang K. Increased expression of lncRNA CASC9 promotes tumor progression by suppressing autophagy-mediated cell apoptosis via the AKT/mTOR pathway in oral squamous cell carcinoma. *Cell Death & Disease*. 2019;10(2):41.
52. Pignon JP, le Maître A, Maillard E, Bourhis J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol*. 2009;92(1):4-14.
53. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:364-78.

54. Ramsey JT, Shropshire BC, Nagy TR, Chambers KD, Li Y, Korach KS. Essential Oils and Health. *Yale J Biol Med.* 2020;93(2):291-305.
55. Blowman K, Magalhães M, Lemos MFL, Cabral C, Pires IM. Anticancer Properties of Essential Oils and Other Natural Products. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2018;2018:3149362.
56. Weber MT, Hannig M, Pötschke S, Höhne F, Hannig C. Application of Plant Extracts for the Prevention of Dental Erosion: An in situ/in vitro Study. *Caries Res.* 2015;49(5):477-87.
57. Turek C, Stintzing FC. Stability of Essential Oils: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.* 2013;12(1):40-53.
58. Pavoni L, Pavela R, Cespi M, Bonacucina G, Maggi F, Zeni V, et al. Green Micro- and Nanoemulsions for Managing Parasites, Vectors and Pests. *Nanomaterials (Basel).* 2019;9(9).
59. Fernando Leal-Calderon VS, Jerome Bibette. *Emulsion Science Basic Principles.* Edition. S, editor2007. Capítulo 1, pág 5 p.
60. Bouyer E, Mekhloufi G, Rosilio V, Grossiord JL, Agnely F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? *Int J Pharm.* 2012;436(1-2):359-78.
61. 2014 BSTPoPSABI. *The Phenomenon of Pickering Stabilization: A Basic Introduction.* 2014.
62. Marto J, Nunes A, Martins AM, Carvalheira J, Prazeres P, Gonçalves L, et al. Pickering Emulsions Stabilized by Calcium Carbonate Particles: A New Topical Formulation. *Cosmetics.* 2020;7(3):62.
63. Guo X, Li X, Chan L, Huang W, Chen T. Edible CaCO₃ nanoparticles stabilized Pickering emulsion as calcium-fortified formulation. *J Nanobiotechnology.* 2021;19(1):67.
64. Ferreira AM, Vikulina AS, Volodkin D. CaCO₃ crystals as versatile carriers for controlled delivery of antimicrobials. *Journal of Controlled Release.* 2020;328:470-89.

65. Jana S, Das A, Nayak AK, Sen KK, Basu SK. Aceclofenac-loaded unsaturated esterified alginate/gellan gum microspheres: in vitro and in vivo assessment. *Int J Biol Macromol.* 57. Netherlands: © 2013 Elsevier B.V; 2013. p. 129-37.
66. Yan J, Liang X, Ma C, McClements DJ, Liu X, Liu F. Design and characterization of double-cross-linked emulsion gels using mixed biopolymers: Zein and sodium alginate. *Food Hydrocolloids.* 2021;113:106473.
67. Zheng W, Zhang H, Wang J, Yan L, Liu C, Zheng L. Pickering emulsion hydrogel based on alginate-gellan gum with carboxymethyl chitosan as a pH-responsive controlled release delivery system. *Int J Biol Macromol.* 216. Netherlands: © 2022 Elsevier B.V; 2022. p. 850-9.
68. Cid-Chevecich C, Müller A, Jara J, Lopez-Muñoz R, Santander R, Budini M, et al. *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.* 2022;22.
69. Babou-Kammoe R, Hamoudi S, Larachi F, Belkacemi K. Synthesis of CaCO₃ nanoparticles by controlled precipitation of saturated carbonate and calcium nitrate aqueous solutions. *The Canadian Journal of Chemical Engineering.* 2012;90(1):26-33.
70. Leong J-Y, Tey B-T, Tan C-P, Chan E-S. Nozzleless Fabrication of Oil-Core Biopolymeric Microcapsules by the Interfacial Gelation of Pickering Emulsion Templates. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2015;7(30):16169-76.
71. Xu W, Zhu D, Li Z, Luo D, Hang L, Jing J, et al. Controlled release of lysozyme based core/shells structured alginate beads with CaCO₃ microparticles using Pickering emulsion template and in situ gelation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2019;183:110410.
72. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. (0022-1759 (Print)).
73. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(6).
74. Low LE, Siva SP, Ho YK, Chan ES, Tey BT. Recent advances of characterization techniques for the formation, physical properties and stability of Pickering emulsion. *Advances in Colloid and Interface Science.* 2020;277:102117.

75. Perumalsamy H, Shanmugam R, Kim JR, Anandapadmanaban G, Huq MA, Dua K, et al. Nanoemulsion and Encapsulation Strategy of Hydrophobic Oregano Essential Oil Increased Human Prostate Cancer Cell Death via Apoptosis by Attenuating Lipid Metabolism. *Bioinorg Chem Appl.* 2022;2022:9569226.
76. Laothaweerungsawat N, Neimkhum W, Anuchapreeda S, Sirithunyalug J, Chaiyana W. Transdermal delivery enhancement of carvacrol from *Origanum vulgare* L. essential oil by microemulsion. *International Journal of Pharmaceutics.* 2020;579:119052.
77. Fitsiou E, Anestopoulos I, Chlichlia K, Galanis A, Kourkoutas I, Panayiotidis MI, et al. Antioxidant and Antiproliferative Properties of the Essential Oils of *Satureja thymbra* and *Satureja parnassica* and their Major Constituents. *Anticancer Res.* 36. Greece: Copyright© 2016 International Institute of Anticancer Research (Dr. John G. Delinassios); 2016. p. 5757-63.
78. Morshedloo MR, Salami SA, Nazeri V, Maggi F, Craker L. Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. *Industrial Crops and Products.* 2018;119:183-90.
79. Khan M, Khan ST, Mousa AA, Mahmood A, Alkhathlan HZ. Chemical diversity in leaf and stem essential oils of *Origanum vulgare* L. and their effects on microbicidal activities. *AMB Express.* 2019;9(1):176.
80. Benbrahim C, Barka MS, Basile A, Maresca V, Flamini G, Sorbo S, et al. Chemical Composition and Biological Activities of Oregano and Lavender Essential Oils. *Applied Sciences.* 2021;11:5688.
81. Shafiee-Hajiabad M, Hardt M, Honermeier B. Comparative investigation about the trichome morphology of Common oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare*) and Greek oregano (*Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum*). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants.* 2014;1.
82. Béjaoui A, Chaabane H, Jemli M, Boulila A, Boussaid M. Essential oil composition and antibacterial activity of *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* Desf. at different phenological stages. *J Med Food.* 2013;16(12):1115-20.
83. Vagenas NV, Gatsouli A, Kontoyannis CG. Quantitative analysis of synthetic calcium carbonate polymorphs using FT-IR spectroscopy. *Talanta.* 2003;59(4):831-6.
84. Elbaz NM, Owen A, Rannard S, McDonald TO. Controlled synthesis of calcium carbonate nanoparticles and stimuli-responsive multi-layered nanocapsules for oral drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics.* 2020;574:118866.

85. Huang X, Dong K, Liu L, Luo X, Yang R, Song H, et al. Physicochemical and structural characteristics of nano eggshell calcium prepared by wet ball milling. *LWT*. 2020;131:109721.
86. Gómez-Alvarez LM, Segura-Sánchez F, Zapata JE. Combinación de alta cizalla y ultrasonido para la obtención de nanopartículas de carbonato de calcio a partir de cáscara de huevo. *Información tecnológica*. 2022;33:91-106.
87. Zhou Y, Sun S, Bei W, Zahi MR, Yuan Q, Liang H. Preparation and antimicrobial activity of oregano essential oil Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;112:7-13.
88. Chen Z, Cui B, Guo X, Zhou B, Wang S, Pei Y, et al. Fabrication and characterization of Pickering emulsions stabilized by desalted duck egg white nanogels and sodium alginate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2022;102(3):949-56.
89. Manning GS. A comparison of Manning's polyelectrolyte theory with the cylindrical Gouy model. *Comments. The Journal of Physical Chemistry*. 1978. p. (21): p. 2349-51.
90. Avram Ş, Bora L, Vlaia LL, Muş AM, Olteanu GE, Olariu I, et al. Cutaneous Polymeric-Micelles-Based Hydrogel Containing Origanum vulgare L. Essential Oil: In Vitro Release and Permeation, Angiogenesis, and Safety Profile In Ovo. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(7).
91. Tan PY, Tey BT, Chan ES, Lai OM, Chang HW, Tan TB, et al. Stabilization and Release of Palm Tocotrienol Emulsion Fabricated Using pH-Sensitive Calcium Carbonate. *Foods*. 2021;10(2):358.
92. Tan PY, Tan TB, Chang HW, Mwangi WW, Tey BT, Chan ES, et al. Pickering emulsion-templated ionotropic gelation of tocotrienol microcapsules: effects of alginate and chitosan concentrations and gelation process parameters. *J Sci Food Agric*. 2021;101(14):5963-71.
93. Nie B, Wang H, Rao C, Zhang Y, Wang H, Lian X, et al. Preparation and characterization of sodium alginate/phosphate-stabilized amorphous calcium carbonate nanocarriers and their application in the release of curcumin. *Nanotechnology*. 2021;32(37):375712.

94. Kryeziu TL, Haloci E, Loshaj-Shala A, Bagci U, Oral A, Stefkov GJ, et al. Nanoencapsulation of *Origanum vulgare* essential oil into liposomes with anticancer potential. *Pharmazie*. 2022;77(6):172-8.
95. Kamel KM, Khalil IA, Rateb ME, Elgendy H, Elhawary S. Chitosan-Coated Cinnamon/Oregano-Loaded Solid Lipid Nanoparticles to Augment 5-Fluorouracil Cytotoxicity for Colorectal Cancer: Extract Standardization, Nanoparticle Optimization, and Cytotoxicity Evaluation. *J Agric Food Chem*. 2017;65(36):7966-81.
96. Dai W, Sun C, Huang S, Zhou Q. Carvacrol suppresses proliferation and invasion in human oral squamous cell carcinoma. *Onco Targets Ther*. 2016;9:2297-304.
97. Sharifi-Rad M, Varoni EM, Iriti M, Martorell M, Setzer WN, Del Mar Contreras M, et al. Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytother Res*. 2018;32(9):1675-87.
98. Kubatka P, Kello M, Kajo K, Kruzliak P, Výbohov D, Mojžiš J, et al. Oregano demonstrates distinct tumour-suppressive effects in the breast carcinoma model. *Eur J Nutr*. 2017;56(3):1303-16.
99. Nasra S, Meghani N, Kumar A. Nanoemulsion-Based System as a Novel and Promising Approach for Enhancing the Antimicrobial and Antitumoral Activity of *Thymus vulgaris* (L.) Oil in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *Appl Biochem Biotechnol*. 2023.
100. Li Y, Wen JM, Du CJ, Hu SM, Chen JX, Zhang SG, et al. Thymol inhibits bladder cancer cell proliferation via inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;491(2):530-6.
101. Elbe H, Yigitturk G, Cavusoglu T, Uyanikgil Y, Ozturk F. Apoptotic effects of thymol, a novel monoterpene phenol, on different types of cancer. *Bratisl Lek Listy*. 2020;121(2):122-8.
102. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019;43(6):582-92.
103. Fuentes C, Fuentes A, Byrne HJ, Barat JM, Ruiz MJ. In vitro toxicological evaluation of mesoporous silica microparticles functionalised with carvacrol and thymol. *Food Chem Toxicol*. 2022;160:112778.