



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO ANTIMICÓTICO DEL ACEITE ESENCIAL DE
Mentha spp SOBRE POLIMETILMETACRILATO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

ALAN JOCSAN MERAZ HERNÁNDEZ

TUTOR: Dr. ENRIQUE ROMO ARÉVALO

ASESOR: Dra. MIRYAM MARTÍNEZ HERNÁNDEZ
ASESOR: Esp. FEDERICO TORRES TERÁN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Romo Arévalo por compartir sus conocimientos y de su tiempo para poder realizar este proyecto.

A la Dra. Miryam Martínez por apoyarme en el análisis de las imágenes obtenidas de Microscopia Electrónica de Barrido.

Al Dr. Federico Torres, quien me ayudó a realizar la parte clínica de este trabajo.

Al Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados por permitirme usar sus instalaciones y equipo para poder llevar a cabo el trabajo de investigación.

A la Dra. Sonia López Letayf por su apoyo en el análisis estadístico.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto: IN206420 e IA206522.

DEDICATORIAS

A mis padres José Alonso Meraz y María Leticia Hernández que incondicionalmente siempre han estado y estarán presentes en cada una de las etapas de mi vida.

A mi hermano Osmar Axel Meraz Hernández, a quien siempre he admirado, que siempre me ha apoyado, me ha guiado y me ha acompañado.

A mis abuelos, tios y primos quienes siempre han sido parte importante de mi persona.

A la Dra. Lía Alioth Hoz Rodríguez quien me abrió las puertas del laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados hace 5 años y me mostró todo un mundo de conocimientos en la ciencias básicas.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES.....	6
1.1 Candidiasis oral.....	6
1.2 Estomatitis protésica.....	7
1.3 Polimetilmetacrilato.....	9
1.4 Resistencia a los antimicóticos.....	10
1.5 Aceites esenciales.....	11
1.6 Aceite esencial de <i>Mentha spp</i>	13
2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
3 JUSTIFICACIÓN.....	15
4 HIPÓTESIS.....	15
5 OBJETIVOS.....	16
6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	16
7 METODOLOGÍA.....	17
7.1 Preparación de muestras de PMMA.....	17
7.2 Preparación de la suspensión estandarizada de <i>Candida albicans</i>	18
7.3 Extracción del aceite esencial de menta.....	19
7.4 Pruebas de inhibición del crecimiento de <i>C. albicans</i> por el aceite esencial	19
7.5 Análisis de resultados.....	20
7.6 Análisis por microscopia electrónica de barrido.....	20
7.7 Análisis elemental por energía dispersiva de Rayos X (EDS).....	21
8 RESULTADOS.....	22
8.1 Discos de acrílico.....	22
8.2 Cultivo de <i>Candida albicans</i>	23
8.3 Pruebas de inhibición de crecimiento de <i>Candida albicans</i>	26
9 ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	32
9.1 Análisis estadístico.....	32
9.2 Microscopia Electrónica de Barrido.....	33
9.3 Análisis elemental mediante EDS.....	37

10	DISCUSIÓN.....	41
11	CONCLUSIÓN.....	44
12	REFERENCIAS.....	47

RESUMEN

La elevada prevalencia de la estomatitis protésica, así como la generación de resistencia a los antimicóticos por parte de los microorganismos involucrados en esta patología comprometen la calidad y tiempo de vida útil del tratamiento protésico, así como la salud general del paciente. Esta situación ha generado que la investigación en nuevas alternativas para el manejo y control de estas infecciones sea más amplia.

El presente trabajo tiene como objetivo analizar la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* mediante el uso del aceite esencial de menta en el polimetilmetacrilato (PMMA) *in vitro*.

Nuestra metodología consistió en aislar el aceite esencial de menta mediante hidrodestilación. Posteriormente, se preparó una suspensión estandarizada de *C. albicans* con una densidad óptica de 1 a 600 nm y se cultivaron placas de agar dextrosa Sabouraud en las que se colocaron discos de PMMA incubados durante 8 horas en 0.75%, 1% y 2% de aceite esencial y se midieron los halos de inhibición alrededor de los discos. Las pruebas se realizaron por triplicado en tres ocasiones distintas. Posteriormente se realizó la observación de las muestras de PMMA por microscopia electrónica de barrido y el análisis de espectroscopia por dispersión de rayos X (EDS) para observar si el aceite de menta ocasiona alguna modificación en la superficie y composición elemental de PMMA.

Los resultados demuestran que las muestras de PMMA incubadas en la solución de aceite esencial tienen un efecto inhibitor en el crecimiento de *C. albicans*, mientras que en el grupo control sin aceite esencial no hay inhibición del microorganismo.

Además, el aceite en las concentraciones que fueron utilizadas no modifica la microestructura ni la composición elemental de las muestras de PMMA.

Podemos concluir que el aceite esencial de menta puede ser una opción prometedora para controlar y prevenir el crecimiento de *Candida albicans* en pacientes portadores de prótesis con base de PMMA.

ABSTRACT

The high prevalence of prosthetic stomatitis, as well as the resistance to antifungal agents of the microorganisms involved in this pathology compromise the quality of prosthetic treatment and the general health of the patient. This situation has led to increase the research into new alternatives for the management and control of these infections.

The present work has the objective of analyzing the inhibition of the growth of *Candida albicans* using peppermint essential oil in polymethylmethacrylate (PMMA). Our methodology consisted of isolating peppermint essential oil by hydrodistillation. Subsequently, a standardized suspension of *C. albicans* with an O.D 1 at 600 nm was prepared and Sabouraud dextrose agar plates were cultured and PMMA discs previously incubated for 8 hours in 0.75%, 1% and 2% essential oil were placed, and the inhibition halos were measured. The tests were performed in triplicate on three different occasions. Subsequently, it was performed scanning electron microscopy (SEM) and Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS) to observe if the peppermint oil causes morphological and chemical modifications, respectively, in the PMMA samples.

The results show that the PMMA samples incubated in the essential oil solution have an inhibitory effect on the growth of *C. albicans*, while in the control group without essential oil there is no inhibition of the microorganism.

We can conclude that peppermint essential oil has antifungal properties and that it can be used in PMMA without modifying its structure and its chemical composition. Further research will be relevant to propose new antimicrobial therapeutics.

INTRODUCCIÓN

El uso de prótesis dentales removibles, ya sean parciales o totales, son requeridas por los pacientes al haber una frecuencia alta en la ausencia de órganos dentales. Dichas prótesis ayudan a mejorar la salud y la calidad de vida de los pacientes portadores; sin embargo, su uso en conjunto con una mala higiene y factores como inmunosupresión, suelen ocasionar un desequilibrio en el ecosistema bucal que provoca la infección micótica conocida como estomatitis protésica [1].

La estomatitis protésica es un desorden bastante común que afecta directamente a pacientes portadores de estas prótesis. Se caracteriza por provocar inflamación y eritema de la mucosa bucal en las zonas cubiertas por la dentadura. Se estima, que afecta entre el 15% al 70% de los pacientes portadores de prótesis [2]. Es una de las condiciones más frecuentes en odontología protésica y suele ser asintomática; solamente en una minoría de los casos, la estomatitis protésica puede provocar experiencias de dolor, comezón, o alguna sensación de quemazón y este desorden es primeramente diagnosticado durante la examinación clínica [3].

Candida albicans, es un hongo oportunista residente de la cavidad bucal y es el principal microorganismo asociado al desarrollo y mantenimiento de la estomatitis protésica. Dicho microorganismo puede desarrollarse en forma de levaduras unicelulares, pseudohifas e hifas [4], cuyo cambio de forma de levadura a forma de hifa se asocia con la patogenicidad durante infecciones superficiales a sistémicas [5, 6].

Los tratamientos más comunes para la infección por *Candida spp* en la cavidad bucal incluyen: una correcta higiene oral y antimicrobianos tópicos, y el tratamiento con antimicóticos sistémicos (nistatina, anfotericina B, miconazol y clotrimazol) [7].

A pesar del buen pronóstico del tratamiento de la candidiasis bucal con antimicóticos tópicos y sistémicos, en la actualidad, el uso incorrecto e indiscriminado de medicamentos antimicóticos sintéticos y semisintéticos ha propiciado la formación de cepas resistentes a dichos medicamentos, lo cual ha llevado a la investigación en el uso de productos naturales, como lo son los aceites esenciales de plantas, como herramientas antimicrobianas útiles contra virus, bacterias, hongos y parásitos [8].

ANTECEDENTES

1.1 Candidiasis oral

Candida albicans forma parte de la microbiota humana, suele colonizar diferentes partes del cuerpo, como el tracto gastrointestinal, el tracto del aparato reproductor de la mujer, la cavidad oral y la piel. Forma parte de los microorganismos benignos dentro de la microbiota oral, sin embargo, cuando el equilibrio entre los componentes de esta se ve alterado puede causar infecciones localizadas e inclusive llegar a causar infecciones diseminadas potencialmente malignas en individuos con un sistema inmune comprometido [9, 10].

La candidiasis es la infección micótica oportunista más común en el ser humano. *C. albicans* es la especie de mayor prevalencia dentro de todas las especies que se encuentran implicados en la infección; en pacientes inmunocomprometidos se observa un incremento en el crecimiento de esta levadura en el tracto gastrointestinal, urinario y respiratorio, mientras que en individuos sanos se ha relacionado con infecciones nosocomiales [11].

Los principales factores que pueden predisponer al paciente para que desarrolle candidiasis oral son la xerostomía, inmunosupresión (infección por VIH, tratamiento de quimio o radioterapia y trastornos inmunológicos), malnutrición y enfermedades sistémicas como la diabetes mellitus. Las variaciones clínicas de la candidiasis oral incluyen a la candidiasis pseudomembranosa candidiasis eritematosa, queilitis angular, glositis romboidea media, estomatitis protésica, crónica multifactorial y mucocutánea [12, 13, 14].

1.2 Estomatitis protésica

Es la infección micótica que afecta directamente a pacientes portadores de prótesis dental removible parcial y/o total. Se caracteriza por una inflamación y eritema de la mucosa bucal en las zonas cubiertas por la prótesis y afecta entre el 15% al 70% de los pacientes portadores [15]. La etiología de la estomatitis protésica es compleja y multifactorial, algunos factores pueden ser locales o sistémicos, relacionados directamente con el paciente y algunos otros con la capacidad de adhesión y proliferación de *Candida albicans* en el tejido epitelial.

Dentro de los factores sistémicos que se relacionan para el desarrollo de la estomatitis protésica destacan la diabetes, las afectaciones renales, desnutrición y la inmunosupresión; mientras que algunos de los factores locales pueden ser trauma local, xerostomía, descenso del pH de la cavidad oral y en el caso de la prótesis, la porosidad de la superficie del acrílico, la presencia de la biopelícula, la capacidad de adhesión de *C. albicans* y el uso prolongado de la prótesis sin una adecuada limpieza [16].

La mayoría de las bases para prótesis dental removible están elaboradas de polimetilmetacrilato (PMMA). Dicho material proporciona una superficie rugosa (a nivel microscópico), y proporciona un área hidrofóbica que en su conjunto favorecen la formación de la biopelícula en la prótesis y subsecuentemente (si se presentan las condiciones) se desarrolle la Estomatitis protésica [17]. Una superficie rugosa provee una mayor área para la adhesión microbiana, además se ha observado que esta misma rugosidad protege a los microorganismos durante la limpieza de la dentadura, lo que hace que su eliminación sea complicada incluso cuando se

utilizan agentes antimicrobianos. Así mismo, la alta hidrofobicidad de las superficies de la prótesis aumenta la adhesión de *Candida albicans* debido a la interacción hidrofóbica entre ésta y la resina de la dentadura [18].

La estomatitis protésica se clasifica actualmente en tres grados (clasificación de Newton) [47, 48]:

1. Grado I: EP localizada simple (Fig. 1).
2. Grado II: EP difusa simple (Fig. 2).
3. Grado III: EP granular o de hiperplasia granular (Fig. 3).

El hecho de que la etiología de la estomatitis protésica sea multifactorial, nos conlleva a que el tratamiento para esta condición sea complejo; actualmente el tratamiento que se sigue para esta patología incluye el uso de medicamentos tópicos y antimicóticos sistémicos como nistatina, anfotericina B, miconazol y clotrimazol, el uso de desinfectantes, radiación con microondas, así como una eliminación profunda y el control de la biopelícula presente en la dentadura y en la mucosa oral [19].



Clasificación clínica de Estomatitis Protésica de Newton: Fig. 1 EP grado I. Fig. 2 EP grado II. Fig. 3 EP grado III.

1.3 Polimetilmetacrilato.

El polimetilmetacrilato (PMMA) es un polímero termoplástico, el cual se obtiene directamente de la polimerización del metilmetacrilato en su forma monomérica, el cual es un material transparente [20].

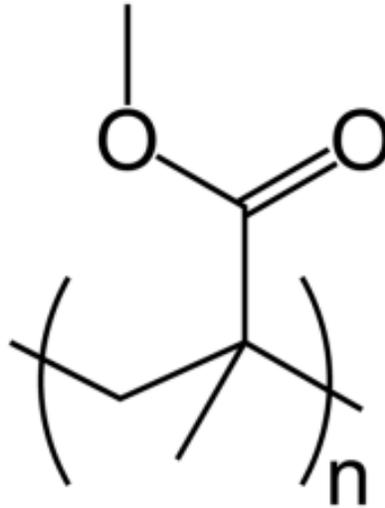


Fig. 4 Estructura química del PMMA

En el año de 1937, Walter Wright fue el precursor de la aplicación del PMMA como resina acrílica en el área odontológica, siendo este material el de primera elección a considerar para la elaboración de las diferentes prótesis dentales [21]. Tiene propiedades y características específicas como la biocompatibilidad, es estable a altas temperaturas y gracias a estas características este material es utilizado para poder realizar restauraciones provisionales, cucharillas individuales y se sigue utilizando para la elaboración de las bases de las dentaduras. Actualmente se sigue estudiado su aplicación en diferentes ramas de la odontología [22].

1.4 Resistencia a los antimicóticos

El uso frecuente e indiscriminado de antifúngicos ha llevado al desarrollo de una resistencia en muchas especies de *Candida*. Esta resistencia hace referencia a un fallo en el efecto terapéutico donde la condición del paciente no mejora usando un antimicótico en una dosis estándar. El desarrollo de una resistencia antifúngica es un proceso complejo, ya que depende de muchos factores, los cuales se pueden englobar como factores propios del paciente y factores de la microbiota [23]. El estado inmunológico del huésped es un factor muy importante, ya que los fármacos que se administran al paciente trabajan sinérgicamente para tratar y controlar una infección. Esto quiere decir que, en pacientes con una inmunodeficiencia severa, es más probable que el tratamiento fracase, ya que el fármaco antimicótico no hace sinergia de una respuesta inmune. Existen otros factores que pueden favorecer a la adhesión y el establecimiento de las biopelículas que son resistentes a la acción de los medicamentos como los catéteres, válvulas cardiacas artificiales, prótesis dentales y otros dispositivos quirúrgicos [24].

1.5 Aceites esenciales

Los aceites esenciales son metabolitos volátiles secundarios, los cuales le dan a la planta un olor característico, sabor o ambos. Estos aceites son producidos por alrededor de 17,500 especies de plantas, sin embargo, a la fecha solo se han comercializado cerca de 300 de estas especies [25]. Los compuestos de los cuales están hechos los aceites esenciales son sintetizados en el citoplasma y los plásmidos de las células a través de las vías del ácido malónico, ácido mevalico y metil-d-eritritol-4-fostato. Se producen y almacenan en estructuras secretoras complejas, como glándulas, cavidades secretoras y conductos resinosos. Se suelen presentar como gotas de líquido en las hojas, tallos, flores y frutos, en la corteza y en las raíces de las mismas plantas. A pesar de contener dos o tres componentes principales a un 20 a 70%, los aceites esenciales son mezclas muy complejas, principalmente de terpenos, terpenoides y fenilpropanoides. También pueden contener muchos otros compuestos, como ácidos grasos, óxidos y derivados del azufre [26]. Los aceites esenciales se obtienen generalmente como resultado de procesos específicos como la hidrodestilación, destilación al vapor, destilación seca o el prensado mecánico en frío de las plantas [27].

Los compuestos de menor tamaño y volátiles son los monoterpenos, que están biosintetizados por la unión de dos moléculas de isopreno, el cual es un hidrocarburo volátil de 5 carbonos [49], mientras los compuestos de mayor tamaño y menos volátiles están biosintetizados por la unión de tres, o más, moléculas de isopreno [28]. Los terpenos son los metabolitos secundarios que dan las características organolépticas (aroma y sabor) de las plantas y que constituyen la

mayor parte del aceite esencial producido por las plantas aromáticas. Estos componentes químicos son excretados por los vegetales para expulsar a los depredadores o agentes dañinos, así como tener un efecto preventivo para evitar la deshidratación de las hojas y frutos [28].

El mecanismo de acción de los aceites esenciales contra algunos tipos de microorganismos es muy complejo y a la fecha no se ha podido explicar por completo. Generalmente se ha reconocido que el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales está directamente relacionado con sus características hidrofílicas y lipofílicas. Los terpenoides son un ejemplo de agentes solubles en lípidos que afectan las actividades de enzimas catalizadas por la membrana de los microorganismos. Existen algunos terpenoides específicos con grupos funcionales, como los alcoholes, fenólicos o aldehídos, que interfieren con la membrana integrada o proteínas enzimáticas, deteniendo la producción o su actividad [26,27].

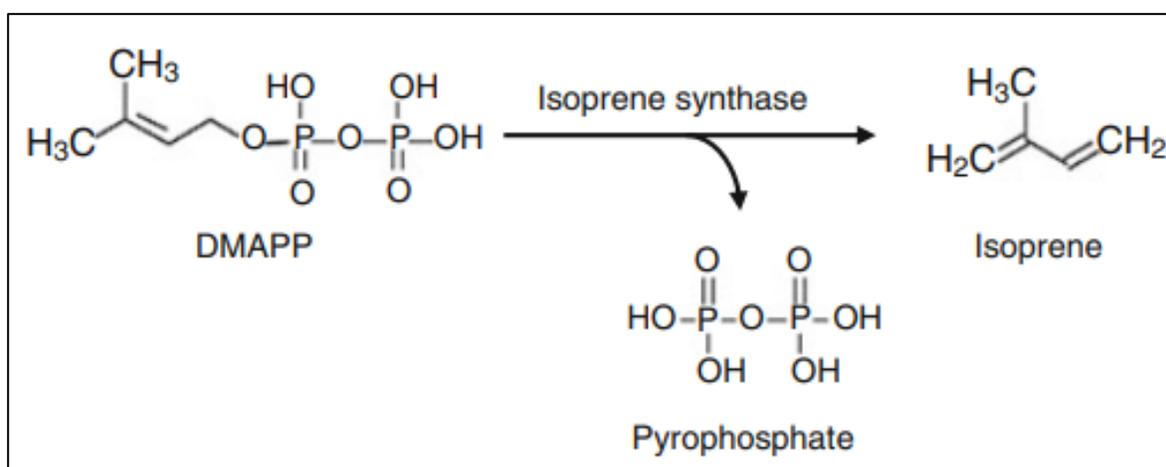


Fig.5 Síntesis del Isopreno derivado del Pirofosfato de dimetilalilo.

1.6 Aceite esencial de *Mentha spp*

Muchas de las plantas aromáticas que actualmente son usadas en la industria de la medicina, comida y farmacéutica son pertenecientes a la familia *Lamiaceae*. Dentro de esta familia, el género *Mentha* incluye alrededor de 30 diferentes especies que generalmente crecen y son cultivadas en zonas como Europa, America del Norte y África. *Mentha spp* ha demostrado tener importantes actividades biológicas [26].

El aceite esencial de *Mentha spp* se ha utilizado como remedio popular para enfermedades respiratorias como la bronquitis, sinusitis, tuberculosis y el resfriado [31] sus propiedades más citadas son antivirales, antibacterianas y antifúngicas [32].

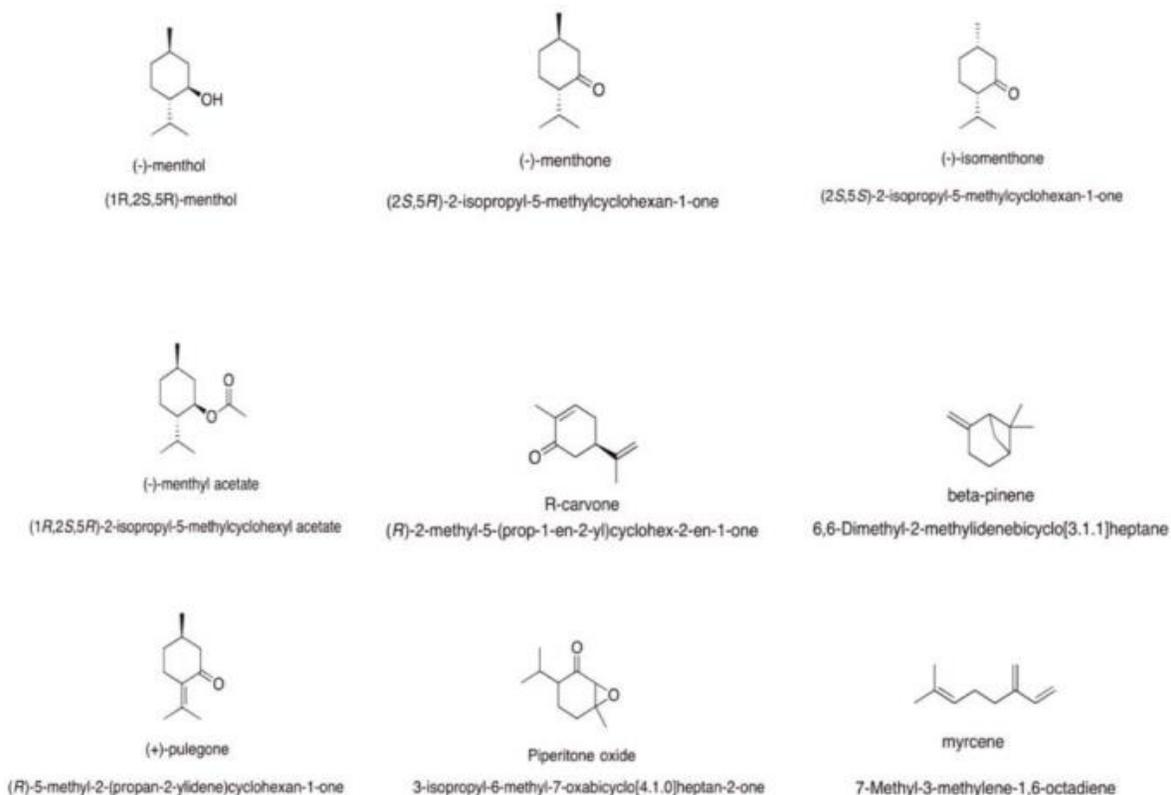


Fig. 6. Estructura química de los principales componentes del aceite esencial de *Mentha spp*.

Se ha reportado en múltiples estudios que el aceite esencial de *Mentha spp* afecta la actividad enzimática de *C. albicans*, inhibiendo su crecimiento [29, 33, 34] y que su vaporización en el medio también tiene un efecto antimicótico [33]. De igual forma se ha informado que el aceite esencial de *Mentha spp* puede tener un efecto sinérgico con otros fármacos o aceites esenciales, por ejemplo, el aceite esencial de *Pongamia pinnata* o con los azoles, como el Fluconazol y Ketokonazol [35, 36].

Tomando en conjunto todos estos antecedentes, se hace notar la importancia de *Candida albicans* en el desarrollo de micosis en pacientes portadores de prótesis removible. Por lo tanto, es de interés la investigación de aceites esenciales de plantas que han demostrado acción antimicrobiana y que pudieran ser empleados para desarrollar terapéuticas encaminadas a la prevención de la colonización del PMMA, así como para el control de microorganismos de interés odontológico.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de prótesis dentales removibles totales o parciales es indispensable para mejorar la salud y calidad de vida de los pacientes portadores. Sin embargo, los defectos en el polimetilmetacrilato, aunado a una mala higiene del individuo y condiciones sistémicas, da origen a la infección micótica por *Candida albicans*. Esto compromete la calidad del tratamiento protésico y salud bucal del paciente

3 JUSTIFICACIÓN

Actualmente, existe evidencia de que el aceite esencial de *Mentha spp* ejerce actividades biológicas notables contra *Candida albicans*. Por lo que a investigación de dicho aceite aplicado al PMMA puede derivar en tratamientos que ayuden a prevenir y/o controlar la estomatitis protésica.

4 HIPÓTESIS

El tratamiento del polimetilmetacrilato con diferentes concentraciones de aceite esencial de menta inhibe el crecimiento de *Candida albicans in vitro*.

5 OBJETIVOS

Determinar si el aceite esencial de menta en discos de polimetilmetacrilato inhibe el crecimiento de *Candida albicans in vitro*.

6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Realizar la extracción del aceite esencial de menta por hidrodestilación.
2. Realizar pruebas de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* mediante la aplicación al PMMA de aceite esencial de menta al 0.75%, 1% y 2% durante 24 y 48 horas.
3. Analizar los resultados de inhibición mediante halos de inhibición.
4. Determinar mediante microscopia electrónica de barrido si se presentan cambios en la superficie del polimetilmetacrilato después de utilizar el aceite esencial de menta al 1% y 2%.
5. Determinar mediante análisis elemental por energía dispersiva de rayos X si el aceite esencial de menta modifica la composición elemental de las muestras de PMMA.

7 METODOLOGÍA

7.1 Preparación de muestras de PMMA

Se formaron patrones en cera de forma circular de 10 mm de diámetro y 0.5 mm de grosor. Posteriormente se colocaron en una contra mufla de policarbonato con yeso tipo III y se sumergieron parcialmente en el yeso dejando la parte superior del disco descubierta. Una vez fraguado el yeso, se colocó una cubierta de silicona por condensación sobre los patrones de cera. Al polimerizar la silicona se cierra la mufla, se colocan los tornillos de mantención y se rellena la contra mufla con yeso. Después de tres horas, se retiran los patrones de cera, se limpia perfectamente y se coloca una capa de separador sobre todas las huellas de los patrones y la superficie de yeso. En seguida se preparó el acrílico en una proporción de acuerdo con las instrucciones del fabricante (OPTI-CRYL®, Lot TR 490521, Colombia); donde se agregan dos partes de polímero termopolimerizable y una parte de monómero termopolimerizable (si es que la preparación se realiza por peso), si la preparación se realiza por volumen, se agregan tres partes de polímero termopolimerizable y una parte de monómero termopolimerizable. La preparación de la mezcla debe ser en un recipiente adecuado (dappen, recipiente de vidrio, porcelana o silicona), posteriormente se vierte el polímero dosificado sobre el monómero en las proporciones indicadas, se mezcla en forma de cruz continuamente durante 30 segundos aproximadamente (para evitar la generación de aire y para asegurar que las partículas de polímero se incorporen completamente con el monómero). Posteriormente se tapa el recipiente para evitar la inclusión de aire hasta que la mezcla se encuentre en la etapa plástica (cuando la mezcla no se

adhiera a la espátula o a las paredes del recipiente). Una vez que tiene la consistencia necesaria se coloca en la mufla en los espacios que dejaron los patrones de cera, se coloca la contra mufla y se coloca en una prensa a una presión de 3 toneladas durante 30 minutos de curado de banco. Pasado este tiempo se colocan los tornillos de sujeción y se coloca en el horno de microondas durante 4 minutos a mediana potencia para polimerizar el acrílico. Al terminar este proceso se retira del microondas y se pone a enfriar durante 30 minutos a temperatura ambiente, terminando este tiempo se sumerge en agua 15 minutos y se procede a rescatar los patrones de acrílico y se recortan.

7.2 Preparación de la suspensión estandarizada de *Candida albicans*

Para este trabajo, se utilizó la cepa *Candida albicans* ATCC 40028. La cepa fue donada por el Área de Investigación en Virología y Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Se tomó una asada de la cepa y se cultivó en agar dextrosa Sabouraud (BD Difco, ref 238230, adicionado con 1% de Agar bacteriológico BD Bioxon ref 215000), la placa se mantuvo en una incubadora microbiológica durante 24 hrs a 37°C. Se seleccionó una colonia aislada y se inoculó en 80 ml de caldo dextrosa Sabourand (BD Difco, ref 238230) y se incubó durante 24 hrs a 37°C en agitación (220 rpm). Pasado el periodo de incubación, se colectó la biomasa por centrifugación a 7,500 rpm durante 12 minutos a 4 °C. Para formar nuestra suspensión de trabajo, las células se resuspendieron en medio Sabouraud estéril hasta ajustar la suspensión, con un espectrofotómetro (Genesys 150, Thermo Scientific) a una densidad óptica de 1 con una longitud de onda de 600nm. La

suspensión de trabajo de *Candida albicans* se alicuotó en criotubos para realizar la siembra de placas individuales y añadió glicerol estéril en una proporción 1:1 para ser almacenado a una temperatura de -80°C hasta que se realizarán los experimentos.

7.3 Extracción del aceite esencial de menta

El método que se utilizó para la extracción del aceite esencial fue la hidrodestilación (38).

Brevemente, en un matraz de Kitasato se colocaron 600 gr de biomasa (hojas frescas de *Mentha spp*, lavadas previamente con agua filtrada) con 300 ml de agua desionizada y se llevaron a ebullición con un mechero bunsen. El aceite extraído es arrastrado junto con el vapor de agua hacia un condensador de vidrio con serpentín interno, refrigerado con agua a 4°C que enfría la mezcla y la dirige a una bureta de separación y el agua de arrastre es separada del aceite por pipeteo. El aceite esencial se almacena en un tubo Eppendorf de 1.5 ml en oscuridad hasta la realización de las pruebas de inhibición.

7.4 Pruebas de inhibición del crecimiento de *C. albicans* por el aceite esencial

En una placa de agar dextrosa Sabourand se sembraron 47 µl de la suspensión estandarizada de *Candida albicans* por medio de la técnica de sembrado por estría cruzada. Se colocaron tres discos de acrílico (con las dimensiones antes señaladas) estériles, que fueron incubados previamente durante 8 horas en una solución del

aceite esencial al 0.75%, 1% y 2% (la dilución se realizó con agua doble destilada estéril). Las placas fueron incubadas a 37°C y se tomaron fotografías a las 24 y 48hrs. Como control se utilizaron discos de acrílico incubados únicamente en agua doble destilada estéril.

Todos los medios de cultivo, muestras de acrílico y material de laboratorio fueron esterilizados por autoclave, mientras que las pruebas de inhibición se realizaron en una campana de flujo laminar (Purair® PCR Laminar Flow Workstation 36"). Las pruebas de inhibición se realizaron por triplicado en tres ocasiones diferentes.

7.5 Análisis de resultados

La sensibilidad ante el aceite esencial de *Mentha spp.* se midió a través de los halos de inhibición, tomando en cuenta el borde del disco al borde del halo, estas medidas se promediaron por placa y por el tiempo de incubación con un análisis ANOVA.

7.6 Análisis por microscopía electrónica de barrido

Se incubaron tres muestras, el grupo control se incubó en agua destilada estéril durante 8 horas y los grupos experimentales se incubaron durante 8 horas en una concentración de aceite esencial al 1% y 2% respectivamente, una vez pasadas las 8 horas se secaron por medio de vacío en una cámara de secado. Se llevaron a la Unidad de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI), donde en un microscopio electrónico de barrido (JSM-5900 LV, Scanning Electron Microscope) observamos la superficie del polimetilmetacrilato en diferentes aumentos (x100, x300, x600, x1000 y x2000). Se realizaron dos pruebas, una en bajo vacío donde observamos

la superficie mediante electrones retrodispersos y la segunda en alto vacío donde mediante electrones secundarios observamos la superficie, es esta última prueba se recubrió la superficie con oro para poder tener una mejor definición en la imagen.

7.7 Análisis elemental por energía dispersiva de Rayos X (EDS)

Al igual que en el análisis por microscopia electrónica de barrido se incubaron tres muestras, el grupo control se incubó en agua estéril durante 8 horas y los grupos experimentales se incubaron durante 8 horas en una concentración de aceite esencial al 1% y 2% respectivamente, una vez pasadas las 8 horas se secaron por medio de vacío en una cámara de secado con silica gel. En un microscopio electrónico de barrido (JSM-5900 LV, Scanning Electron Microscope) mediante el sistema de Espectroscopia por energía dispersiva de rayos X y sin que las muestras tengan algún recubrimiento en su superficie, se realizó un análisis elemental de dicha superficie para observar cual eran los elementos presentes y el porcentaje de cada uno.

8 RESULTADOS

8.1 Discos de acrílico

Obtuvimos discos de acrílico de 10 mm de diámetro, los cuales se recortaron y se les removió la película creada por el separador de acrílico-yeso, pero no se pulieron para simular la superficie interna de una prótesis dental.

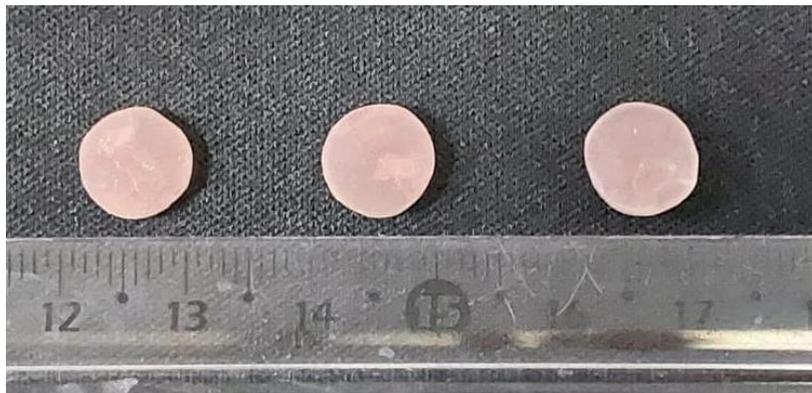


Fig.7 Discos de Polimetilmetacrilato de 10 mm de diámetro

8.2 Cultivo de *Candida albicans*.

Placas de agar dextrosa Sabouraud sembradas con 47 μ l de la suspensión estandarizada de *Candida albicans* con una técnica de estría cruzada, la cual se incubo a 37 °C durante 24 y 48 horas. Una vez transcurridas las primeras 24 horas podemos observar un crecimiento importante de las colonias de *Candida albicans*.



Fig. 8 Incubación de *Candida albicans* durante 24 hrs.



Fig.9 Incubación de *Candida albicans* durante 48 hrs.

Polimetilmetacrilato incubado en agua destilada estéril

Una vez observada la viabilidad de la cepa de *Candida albicans*, se colocaron los discos de PMMA incubados en agua destilada estéril durante 8 horas en placas de Agar previamente cultivadas con la cepa y se incubaron durante 24 hora. Se observó que el PMMA por sí solo no tiene efecto antimicótico.



Fig. 10



Fig. 11



Fig. 12

Fig. 10, 11 y 12. Discos de Polimetilmetacrilato en agua estéril durante 8 hrs. e incubados en placas cultivadas con *C. albicans*. Observación después de 24 hrs.

A las 48 horas de incubadas las placas de Agar con la cepa de *Candida albicans* y el PMMA incubado en agua estéril podemos notar que el crecimiento de la levadura no se ve afectado por el PMMA.



Fig. 13



Fig. 14



Fig. 15

Fig. 13, 14 y 15. Discos de Polimetilmetacrilato en agua estéril durante 8 hrs. e incubados en placas cultivadas con *C. albicans*. Observación a las 48 hrs.

8.3 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans*.

Efecto antimicótico del aceite esencial de menta a 0.75% en PMMA sobre *Candida albicans* a las 24 horas.

Discos de PMMA embebidos en aceite esencial de menta en una concentración de 0.75% durante 8 horas e incubados durante 24 horas en las placas de *Candida albicans*, donde se observa un halo de inhibición de en promedio 1.3 mm



Fig. 16

1.3 mm



Fig. 17

1.2 mm



Fig. 18

1.3 mm

Fig. 16, 17 y 18. Discos de PMMA tratados con aceite esencial de menta en una concentración de 0.75% durante 8 horas. Observación a las 24 horas.

Efecto antimicótico del aceite esencial de menta a 0.75% en PMMA sobre *Candida albicans* a las 48 horas.

Una vez transcurridas 48 horas de incubación de las placas de Agar con discos de PMMA tratados con aceite esencial de menta al 0.75%, observamos que el efecto antimicótico se mantiene, generando halos de inhibición de 1.23 mm en promedio.



Fig. 19 1.4 mm



Fig. 20 1.1 mm



Fig. 21 1.2 mm

Fig. 19, 20 y 21. Discos de PMMA tratados con aceite esencial de menta en una concentración de 0.75% durante 8 horas. Observación a las 48 hrs.

Efecto antimicótico del aceite esencial de menta al 1% en PMMA sobre *Candida albicans* a las 24 horas.

Al aumentar la concentración del aceite esencial de menta al 1% observamos que el efecto antimicótico aumenta, y genera halos de inhibición de 2.4 mm en promedio a las 24 horas



Fig. 22 2.4 mm



Fig. 23 4.2 mm



Fig. 24 1.4 mm

Fig. 22, 23 y 24. Discos de PMMA tratados con aceite esencial de menta en una concentración de 1% durante 8 horas. Observación a las 24 hrs.

Efecto antimicótico del aceite esencial de menta al 1% en PMMA sobre *Candida albicans* a las 48 horas.

Una vez transcurridas 48 horas de la incubación de *Candida* con discos de PMMA con aceite esencial de menta al 1% podemos observar que el efecto antimicótico aún está presente, generando halos de inhibición de 2 mm en promedio.



Fig. 25 2.0 mm



Fig. 26 3.6 mm



Fig. 27 0.9 mm

Fig. 25, 26 y 27. Discos de PMMA tratados con aceite esencial de menta en una concentración de 1% durante 8 horas. Observación a las 48 hrs.

Efecto antimicótico del aceite esencial de menta al 2% en PMMA sobre *Candida albicans* a las 24 horas.

Discos de PMMA previamente tratados con aceite esencial de menta al 2%, los cuales fueron colocados en placas de agar dextrosa Sabouraud previamente cultivadas con la cepa de *Candida albicans*, donde observamos que los halos de inhibición tienen un tamaño promedio de 6.1 mm.



Fig. 28 6.1 mm



Fig. 29 3.6 mm



Fig. 30 2.7 mm

Fig. 28, 29 y 30. Discos de PMMA tratados con aceite esencial de menta en una concentración de 2% durante 8 horas. Observación a las 24 hrs.

Efecto antimicótico del aceite esencial de menta al 2% en PMMA sobre *Candida albicans* a las 48 horas.

Transcurridas 48 horas de la incubación de las placas de Agar con los discos de PMMA tratados con aceite esencial de menta al 2%, observamos que el efecto antimicótico disminuye, sin embargo, aun así, obtenemos halos de inhibición de 5.2 mm en promedio.



Fig. 31 5.2 mm



Fig. 32 2.6 mm



Fig. 33 2.1 mm

Fig. 31, 32 y 33. Discos de PMMA tratados con aceite esencial de menta en una concentración de 2% durante 8 horas. Observación a las 48 hrs.

9 ANÁLISIS DE RESULTADOS

9.1 Análisis estadístico

Para poder realizar un análisis estadístico, se realizó primero una recopilación de las mediciones de los halos de inhibición, se promediaron todas las medidas por cada disco de PMMA (la medida que se tomó para una mayor precisión fue del borde del disco de PMMA al borde del halo de inhibición), posteriormente se promediaron por cada caja de cultivo y por último se promediaron los triplicados de cada experimento que se realizó.

CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE MENTA			
	0.75%	1%	2%
24 hrs.	1.3 mm	2.4 mm	6.1 mm
48 hrs.	1.23 mm	2 mm	5.2 mm

Tabla 1. Inhibición promedio de cada concentración de aceite esencial de menta en los diferentes triplicados durante 24 y 48 horas

En el análisis estadístico observamos que hay una correlación positiva entre la concentración del aceite y el tamaño de los halos de inhibición. En caso de requerir más datos sobre el análisis estadístico, al final se anexa el Apéndice 1.

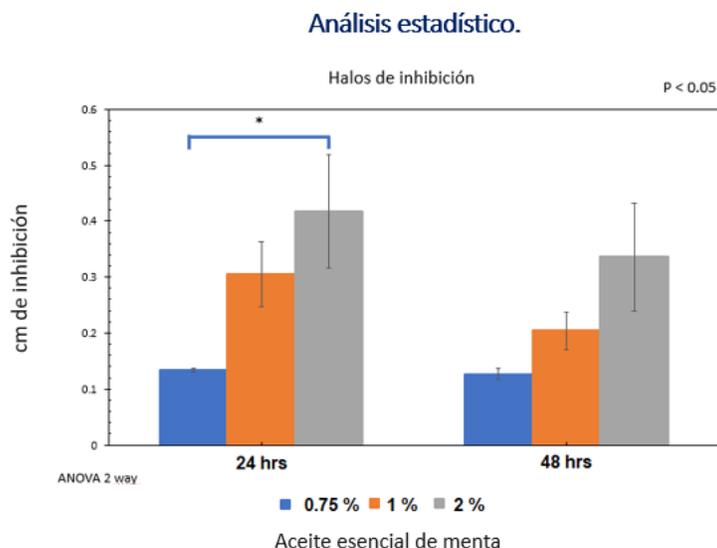


Fig. 34. Análisis comparativo de la concentración del aceite esencial de menta en dos diferentes intervalos de tiempo.

9.2 Microscopia Electrónica de Barrido

(Alto vacío, electrones secundarios, con recubrimiento de oro)

Para observar si es que la estructura a nivel microscópico se modifica, realizamos microscopia electrónica de barrido, donde el PMMA fue incubado en agua destilada estéril (fig. 35) durante 8 horas, al llevarla al microscopio observamos una topografía tipo empedrado con glóbulos aplanados que pueden ir desde las 2 a las 50 micras de diámetro.

Observamos que este patrón no se modifica en los grupos experimentales incubados con el aceite esencial de menta al 1 y 2 % (fig. 36). A un mayor aumento (fig. 37) podemos observar que las superficies de las nuestras muestras experimentales son muy similares a nuestro grupo control con lo que determinamos que estas concentraciones de aceite no modifican superficialmente las características del material.

GRUPO CONTROL

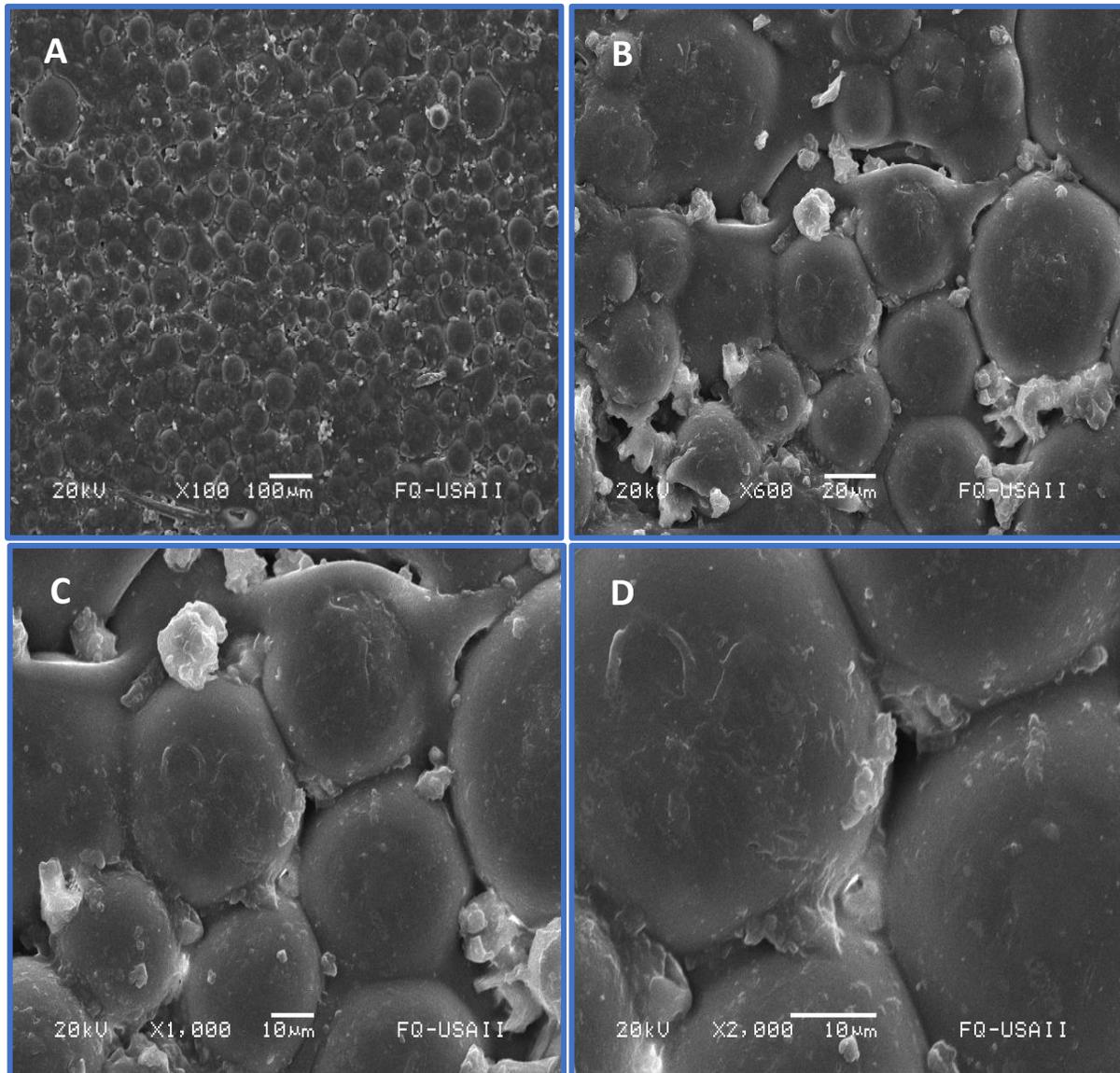


Fig. 35. PMMA incubado en agua destilada estéril. Aumento 100X (A), aumento 600X (B), aumento 1,000X (C) y aumento 2,000 (D).

GRUPO EXPERIMENTAL: ACEITE ESENCIAL AL 1%.

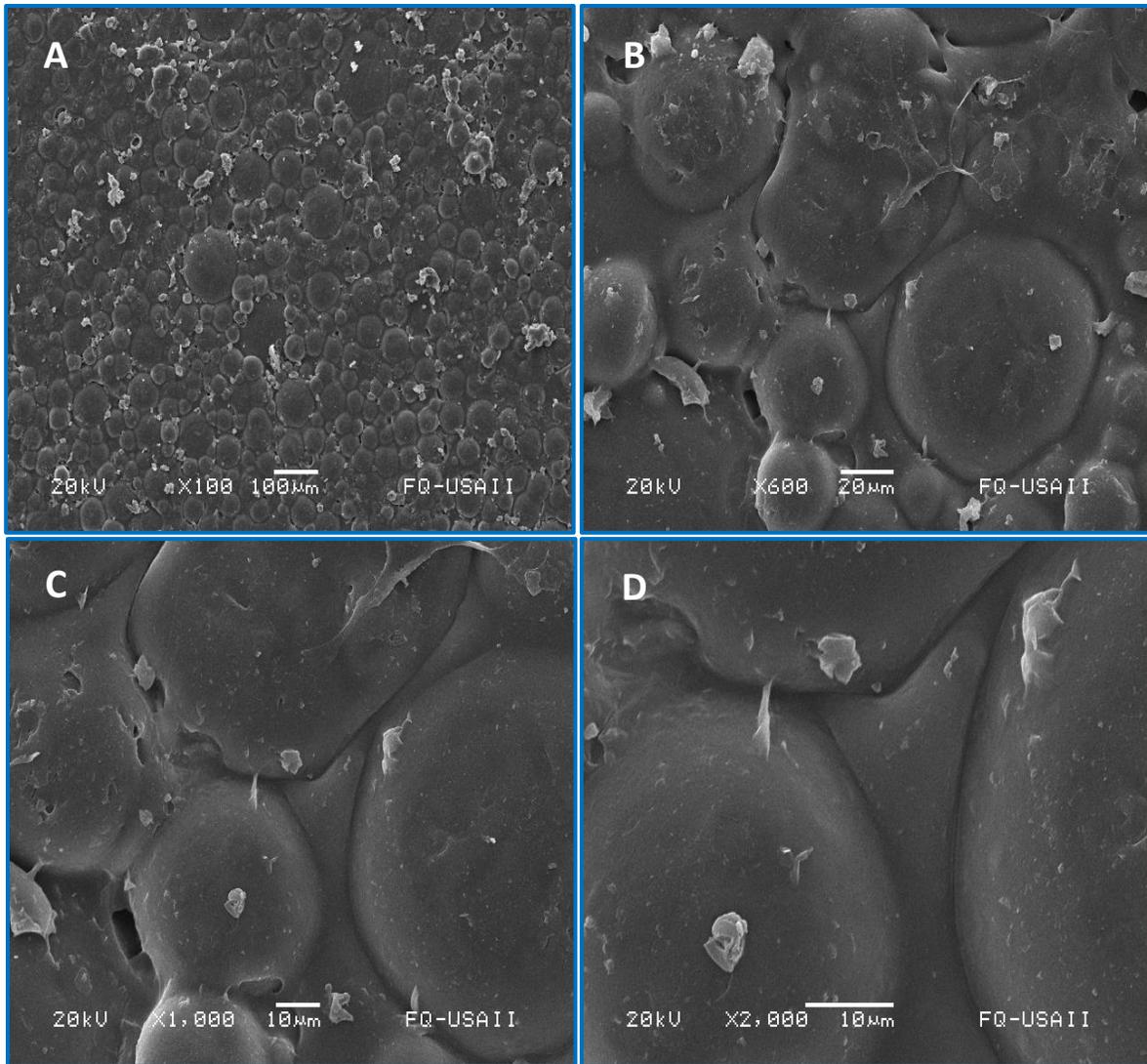


Fig. 36. PMMA incubado en aceite esencial de *Mentha spp* a una concentración de 1%. Aumento 100X (A), aumento 600X (B), aumento 1,000X (C) y aumento 2,000 (D).

GRUPO EXPERIMENTAL: ACEITE ESENCIAL AL 2%

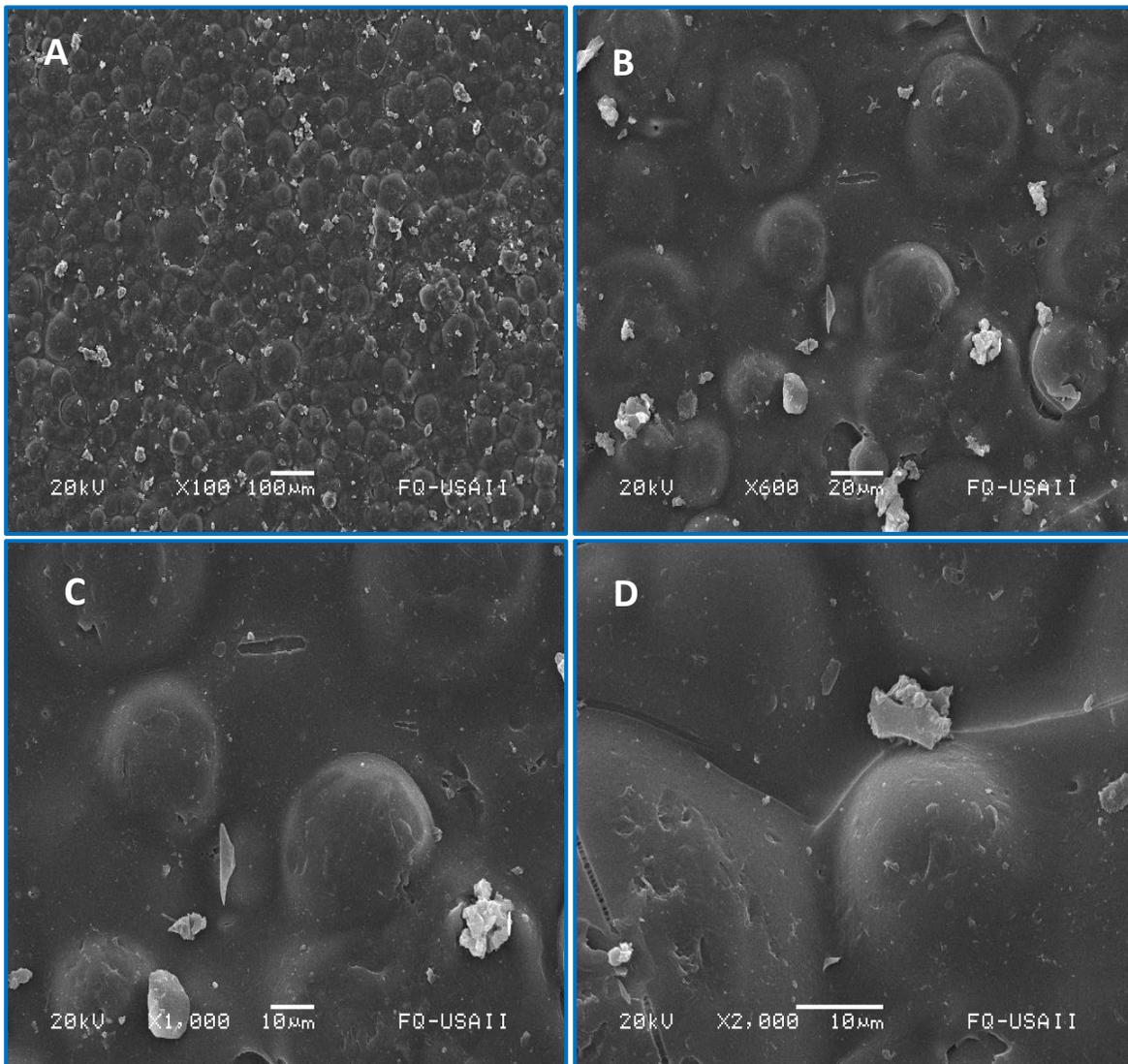


Fig. 37 PMMA incubado en aceite esencial de *Mentha spp* a una concentración de 2%. Aumento 100X (A), aumento 600X (B), aumento 1,000X (C) y aumento 2,000 (D).

9.3 Análisis elemental mediante EDS

Por último, realizamos análisis elemental mediante energía dispersiva de Rayos X, para determinar cuál es la composición elemental en la superficie de las muestras. En el grupo control (fig. 38) se observa que los elementos presentes en su superficie principalmente son carbono, oxígeno y silicio. El carbono y el oxígeno son elementos constitutivos del polimetilmetacrilato, mientras que el silicio son trazas del molde de yeso donde se confeccionaron las muestras de polimetilmetacrilato. En las concentraciones de 1% y 2% (fig. 39 y 40), observamos que las proporciones de estos elementos son muy parecidas en comparación con el grupo control, con lo cual se demuestra que la adición del aceite esencial de menta no altera la composición elemental del polimetilmetacrilato.

GRUPO CONTROL

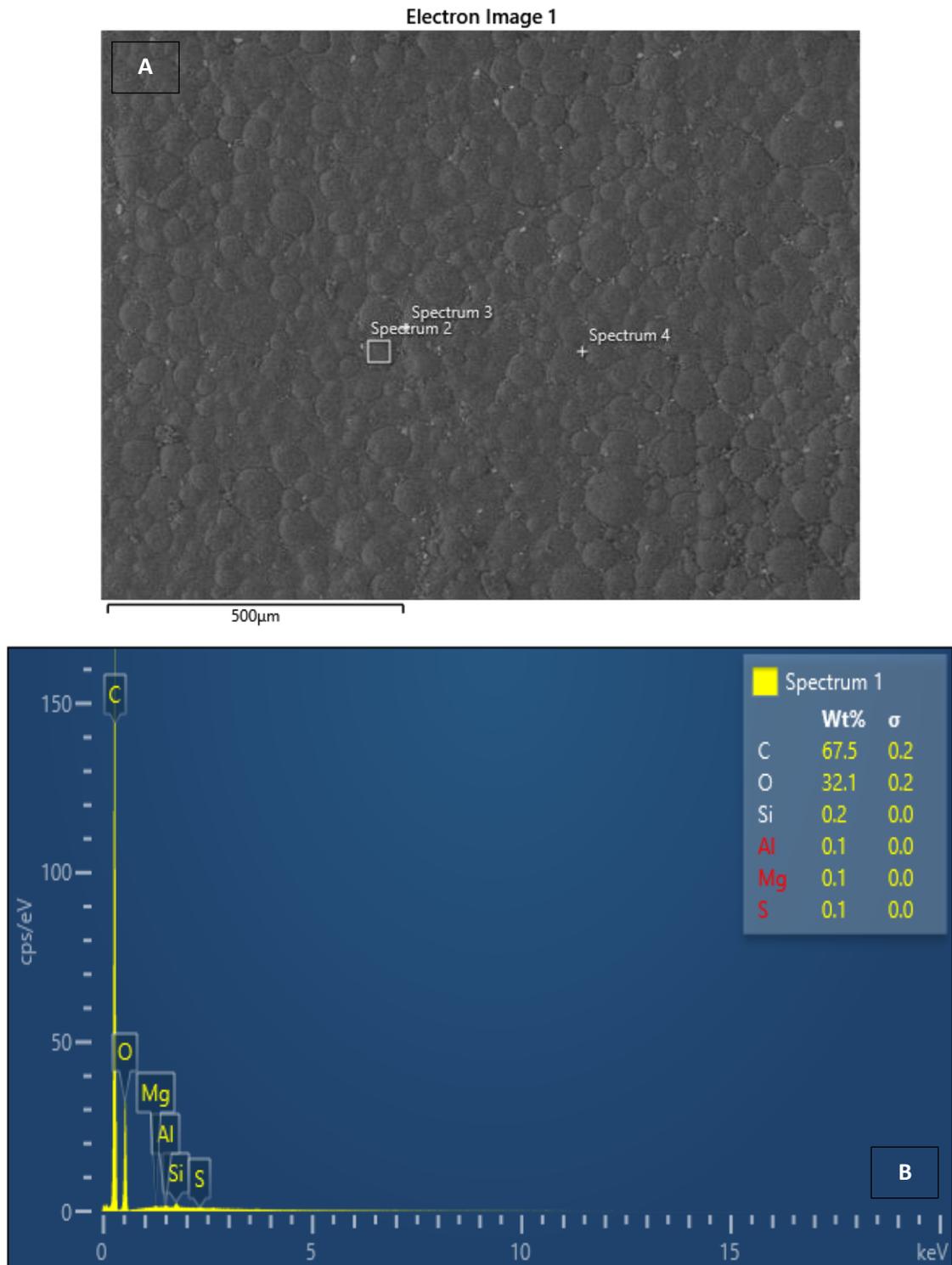
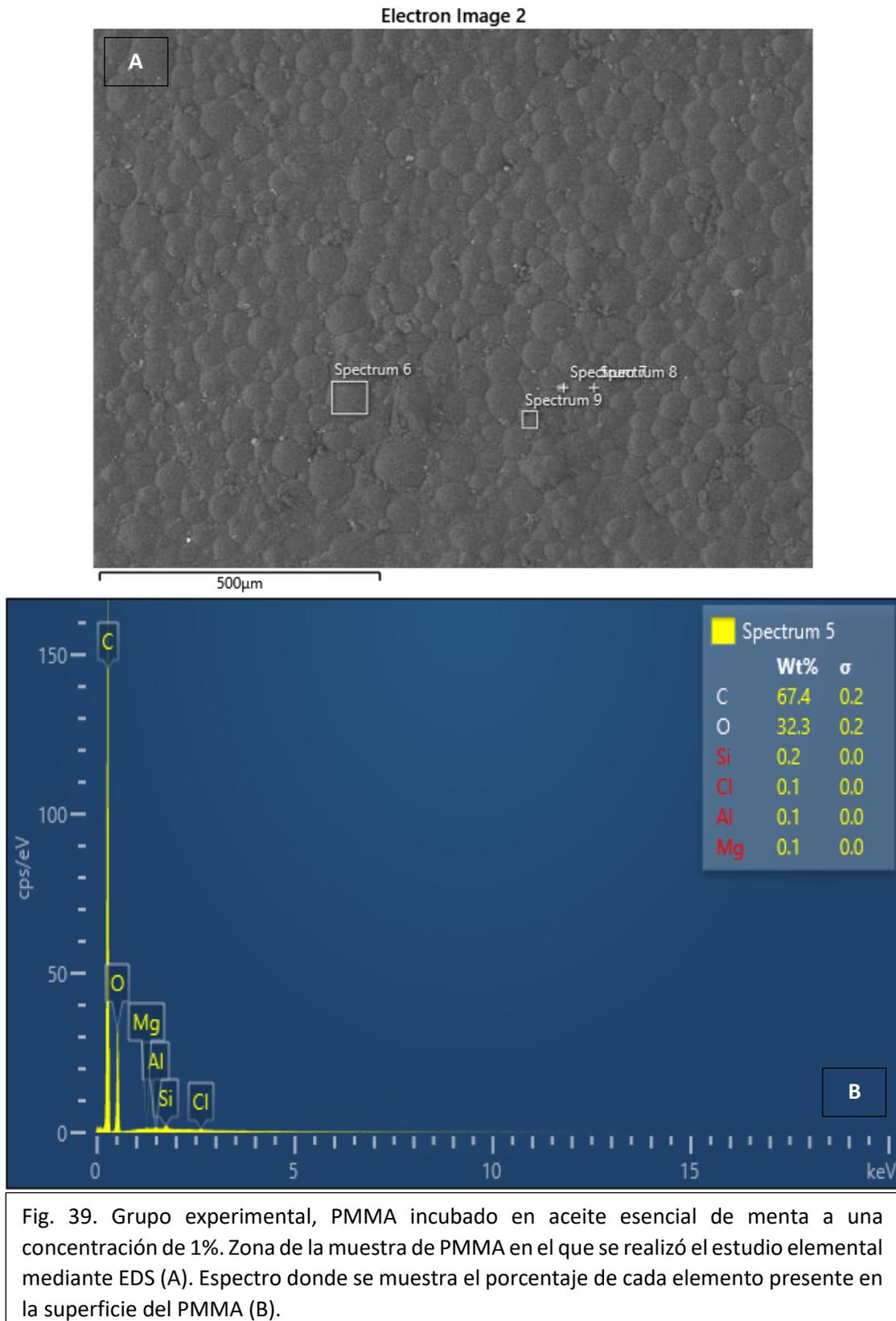


Fig. 38. Grupo control, PMMA incubado en agua estéril. Zona de la muestra de PMMA en el que se realizó el estudio elemental mediante EDS (A). Espectro donde se muestra el porcentaje de cada elemento presente en la superficie del PMMA (B).

GRUPO EXPERIMENTAL: ACEITE ESENCIAL AL 1%.



GRUPO EXPERIMENTAL: ACEITE ESENCIAL AL 2%.

Electron Image 3

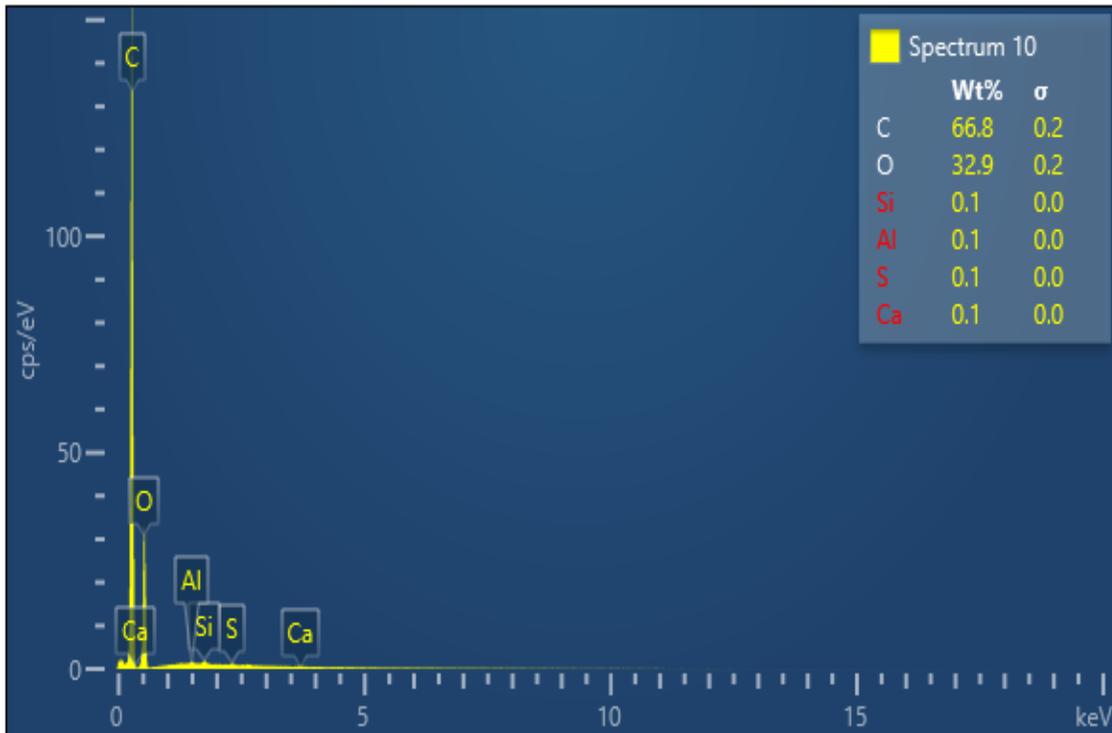
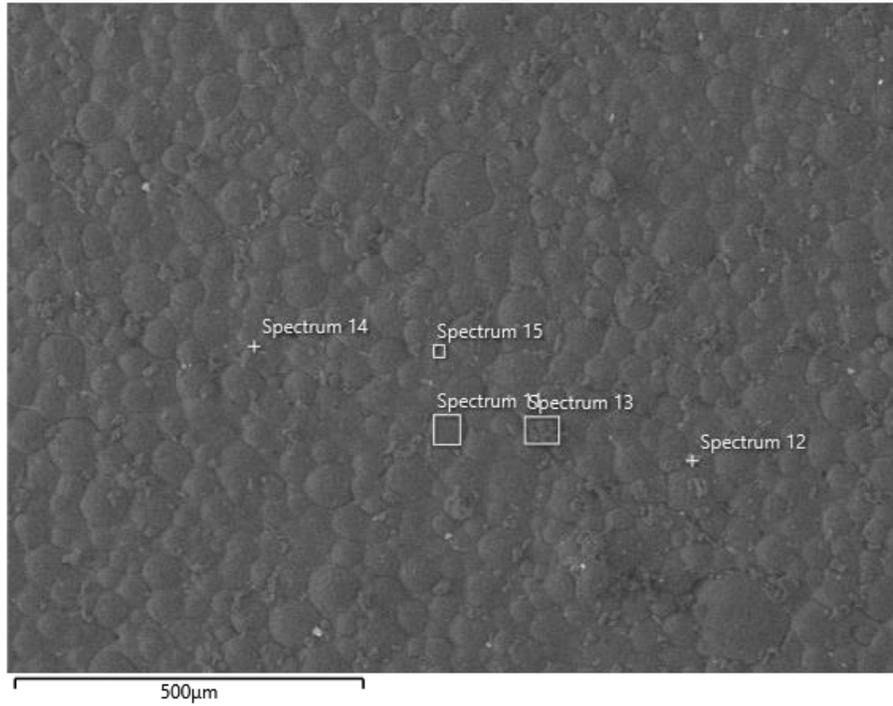


Fig. 40. Grupo experimental, PMMA incubado en aceite esencial de menta a una concentración de 2%. Zona de la muestra de PMMA en el que se realizó el estudio elemental mediante EDS (A). Espectro donde se muestra el porcentaje de cada elemento presente en la superficie del PMMA (B).

10 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha demostrado el efecto antimicótico del aceite esencial de *Mentha spp* sobre el PMMA. En trabajos de investigación publicados por Annariata Stringaro (2018) [26], Paola Tampieri (2015) [37], Fernanda Badillo (2019) [38] y por Prado Patricia (2021) [39] han demostrado el efecto antimicótico del aceite esencial de *Mentha spp* contra *Candida albicans*, sin embargo, hasta la fecha no se han reportado trabajos en los que describa el efecto antimicótico contra *Candida albicans* del aceite esencial de *Mentha spp* sobre PMMA, lo cual abre el campo de investigación de esta área.

Existen trabajos de investigación en los cuales se demuestra la efectividad de los aceites esenciales para inhibir el crecimiento de *Candida albicans*, como lo menciona Bona E. (2016) [40], donde se compara el efecto antimicótico de clotrimazol, itraconazol y fluconazol contra el efecto que tienen 12 aceites esenciales (árbol de té, laurel, anís, albahaca, bergamota, lavanda, menta, orégano, pomelo, romero, ajedrea de invierno y jengibre), donde los fármacos, como los aceites esenciales se colocaron en papel filtro en placas de agar dextrosa. Como control positivo se tomó la inhibición del clotrimazol, el cual generó un halo de inhibición de 20 mm. Se comparó la inhibición del clotrimazol porque de los tres fármacos utilizados fue el que mostro una mayor efectividad antimicótica contra *Candida albicans*. El aceite esencial de menta en este experimento generó un halo de inhibición del 80% (16 mm) de la inhibición que genero el Clotrimazol, mientras que en nuestros resultados obtenemos halos de inhibición de hasta 6 mm, sin embargo, en comparación con nuestra metodología existen variables importantes a

considerar para su uso clínico, una de ellas es la concentración en la que el aceite esencial de menta se usa, la cual en nuestro trabajo utilizamos 0.75, 1 y 2% comparado al 100% que se utilizó en el experimento de Bona E.; otra variable importante es el tipo de material en el que se utilizó el aceite esencial, en el trabajo de Bona E. la metodología indica que se utilizaron papeles filtro el cual está hecho de fibras que son altamente absorbentes donde se capta el 100% del aceite, mientras que en la metodología de nuestro trabajo utilizamos PMMA (material que es utilizado en la práctica clínica).

En 2013 Akanksha Srivatstava [41] utilizó aceite esencial de orégano como un aditivo para el acondicionar de tejidos para reducir la adhesión de *Candida albicans* al PMMA. En este estudio lo que se hizo fue agregar diferentes concentraciones: 10, 20, 30, 40, 50, 55, 57, 60 y 65% del aceite esencial de orégano al líquido del acondicionador de tejidos (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Germany) para posteriormente agregar el líquido se mezcló con el polvo durante 30 segundos. La superficie de cada placa de resina acrílica termopolimerizada se raspó con papel de carburo de silicio de grano 100 para estandarizar la rugosidad de la superficie. Posteriormente se agregó el acondicionador de tejidos con o sin aceite de orégano (Oregano Oil; Suyash Herbs Pvt Ltd) en forma de relleno en la parte inferior de la resina acrílica termopolimerizada. Los resultados que se obtuvieron en este experimento muestran una alta efectividad antimicótica del aceite esencial de contra *Candida albicans*, sin embargo, al agregarlo directamente al acondicionador de tejidos, esta actividad disminuye considerablemente, aun así, la inhibición del crecimiento de *C. albicans* en concentraciones mayores del aceite, principalmente

a una concentración de 60 y 65 %, es buena, obteniendo halos de inhibición de 21 mm en promedio, que en comparación a nuestro estudio podemos mencionar que los halos de inhibición son mayores, sin embargo, como en el trabajo de investigación de Bona E. (2016) [40], estas concentraciones para su uso clínico son poco favorables, en comparaciones a las que nosotros usamos en nuestro trabajo, que fueron de 0.75, 1 y 2%, otro punto a destacar de nuestro trabajo es que comprobamos que nuestras concentraciones no alteran la topografía del PMMA y no modifican la composición elemental de la superficie del material.

En cuanto a la vía de administración, podrían ser tópicos, aerosoles, tabletas, o colutorios. Tayarani-Najaran (2013) [44] ha utilizado este aceite mediante la vía de administración oral, en forma de gotas. Henrique Soares Luis (2017) [45] investigó su uso en forma de colutorio para controlar la biopelícula dental y Eran Ben-Arye (2011) [46] ha estudiado su uso como aerosol. Por lo que se consideran cualquiera de estas tres opciones, ya sea colutorio, aerosol o tabletas para su uso en pacientes.

11 CONCLUSIÓN

El aceite esencial de *Mentha spp* conserva sus propiedades antimicóticas contra *Candida albicans* sobre el polimetilmetacrilato, de igual manera sabemos que este aceite a las concentraciones usadas en este trabajo no modifica la estructura a nivel microscópico del material, ni la composición elemental. Por lo que una investigación profunda de este tema podría derivar en tratamientos preventivos o curativos contra infecciones micóticas de este tipo como la estomatitis protésica, las cuales sabemos que en la actualidad requieren un tratamiento complejo para poder ser efectivo. Al ser un recurso que tiene un costo más accesible que los tratamientos convencionales, es una alternativa que puede estar al alcance de los diferentes grupos socioeconómicos.

APENDICE 1.

2way ANOVA Tabular results					
1	Table Analyzed	Data 3			
2					
3	Two-way RM ANOVA	Matching by cols			
4					
5	Source of Variation	% of total variation	P value		
6	Interaction	2.12	0.0432		
7	Time	5.17	0.0020		
8	Column Factor	51.63	0.0830		
9	Subjects (matching)	39.9414	0.0002		
10					
11	Source of Variation	P value summary	Significant?		
12	Interaction	*	Yes		
13	Time	**	Yes		
14	Column Factor	ns	No		
15	Subjects (matching)	***	Yes		
16					
17	Source of Variation	Df	Sum-of-squares	Mean square	F
18	Interaction	2	0.007455	0.003728	5.550
19	Time	1	0.01823	0.01823	27.14
20	Column Factor	2	0.1820	0.09100	3.878
21	Subjects (matching)	6	0.1408	0.02347	34.93
22	Residual	6	0.004030	0.0006717	
23					
24	Number of missing values	0			
25					
26	Bonferroni multiple comparisons	Number of comparisons: 6			
27					
28	0.75% vs 1%				
29	Column Factor	0.75%	1%	Difference	95% CI of diff.
30	24 hrs	0.1344	0.3065	0.1720	-0.1108 to 0.4548
31	48 hrs	0.1270	0.2041	0.07704	-0.2058 to 0.3598
32					
33	Column Factor	Difference	t	P value	Summary
34	24 hrs	0.1720	1.918	P > 0.05	ns
35	48 hrs	0.07704	0.8589	P > 0.05	ns
36					
37	0.75% vs 2%				
38	Column Factor	0.75%	2%	Difference	95% CI of diff.
39	24 hrs	0.1344	0.4176	0.2831	0.0003597 to 0.5659
40	48 hrs	0.1270	0.3365	0.2094	-0.07334 to 0.4922
41					
42	Column Factor	Difference	t	P value	Summary
43	24 hrs	0.2831	3.157	P < 0.05	*
44	48 hrs	0.2094	2.335	P > 0.05	ns

2way ANOVA					
Tabular results					
45					
46	1% vs 2%				
47	Column Factor	1%	2%	Difference	95% CI of diff.
48	24 hrs	0.3065	0.4176	0.1111	-0.1717 to 0.3939
49	48 hrs	0.2041	0.3365	0.1324	-0.1504 to 0.4152
50					
51	Column Factor	Difference	t	P value	Summary
52	24 hrs	0.1111	1.239	P > 0.05	ns
53	48 hrs	0.1324	1.476	P > 0.05	ns

12 REFERENCIAS.

1. Bianchi, C. M., Bianchi, H. A., Tadano, T., Paula, C. R., Hoffmann-Santos, H. D., Leite, D. P., Jr, & Hahn, R. C. (2016). FACTORS RELATED TO ORAL CANDIDIASIS IN ELDERLY USERS AND NON-USERS OF REMOVABLE DENTAL PROSTHESES. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 58, 17. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201658017>
2. Yarborough, A., Cooper, L., Duqum, I., Mendonça, G., McGraw, K., & Stoner, L. (2016). Evidence Regarding the Treatment of Denture Stomatitis. *Journal of prosthodontics: official journal of the American College of Prosthodontists*, 25(4), 288–301. <https://doi.org/10.1111/jopr.12454>
3. Gendreau, L., & Loewy, Z. G. (2011). Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *Journal of prosthodontics: official journal of the American College of Prosthodontists*, 20(4), 251–260. <https://doi.org/10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x>
4. Lu, Y., Su, C., & Liu, H. (2014). *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. *Trends in microbiology*, 22(12), 707–714. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.001>
5. Solis, N. V., Park, Y. N., Swidergall, M., Daniels, K. J., Filler, S. G., & Soll, D. R. (2018). *Candida albicans* White-Opaque Switching Influences Virulence but Not Mating during Oropharyngeal Candidiasis. *Infection and immunity*, 86(6), e00774-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00774-17>
6. Richardson, J. P., & Moyes, D. L. (2015). Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. *Virulence*, 6(4), 327–337.

7. Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in dermatology*, 34(4), 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.022>.
8. Tullio V, Roana J, Scalas D, Mandras N. Evaluation of the Antifungal Activity of Mentha x piperita (Lamiaceae) of Pancalieri (Turin, Italy) Essential Oil and Its Synergistic Interaction with Azoles. *Molecules*. 2019;24(17):3148. Published 2019 Aug 29. doi:10.3390/molecules24173148
9. Gulati, M., & Nobile, C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and infection*, 18(5), 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.01.002>
10. Arkowitz, R. A., & Bassilana, M. (2019). Recent advances in understanding *Candida albicans* hyphal growth. *F1000Research*, 8, F1000 Faculty Rev-700. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18546.1>
11. Martins, N., Ferreira, I. C., Barros, L., Silva, S., & Henriques, M. (2014). Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. *Mycopathologia*, 177(5-6), 223–240. <https://doi.org/10.1007/s11046-014-9749-1>
12. Millsop, J. W., & Fazel, N. (2016). Oral candidiasis. *Clinics in dermatology*, 34(4), 487–494. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.022>
13. Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP. Contemporary oral and maxillofacial pathology [Internet]. Second edition. Mosby; 2004 [cited 2020 Jun 2]. Available from:
<http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cab02025a&AN=lib.MX001001865541&lang=es&site=eds-live14>. Chi AC,

14. Damm DD, Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot J. Oral and Maxillofacial Pathology. Saint Louis: Elsevier; 2008
15. Contaldo, M., Romano, A., Mascitti, M., Fiori, F., Della Vella, F., Serpico, R., & Santarelli, A. (2019). Association between denture stomatitis, candida species and diabetic status. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 33(3 Suppl. 1).
16. Webb, B. C., Thomas, C. J., Willcox, M. D., Harty, D. W., & Knox, K. W. (1998). Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by Candida species. *Australian dental journal*, 43(3), 160–166. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1998.tb00157.x>
17. R, A. N., & Rafiq, N. B. (2022). Candidiasis. In StatPearls. StatPearls Publishing.
18. Webb, B. C., Thomas, C. J., Willcox, M. D., Harty, D. W., & Knox, K. W. (1998). Candida-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 3. Treatment of oral candidosis. *Australian dental journal*, 43(4), 244–249. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1998.tb00172.x>
19. Fouda, S. M., Gad, M. M., Ellakany, P., Al-Thobity, A. M., Al-Harbi, F. A., Virtanen, J. I., & Raustia, A. (2019). The effect of nanodiamonds on candida albicans adhesion and surface characteristics of PMMA denture base material - an in vitro study. *Journal of applied oral science : revista FOB*, 27, e20180779. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0779>
20. <https://www.resinex.es/tipos-de-polimeros/pmma.html>
21. CRAIG RG, Peyton FA. Restoration Dental Materials. 9th ed. St. Louis, MO: C. V. Mosby;1993. p. 127-31, 500-10.

22. ANUSAVICE, Kenneth. PHILLIPS. *Ciencia de los Materiales Dentales* 11th ed. Elsevier – Saunders. España, 200
23. Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2021). Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chemical reviews*, 121(6), 3390–3411. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199>
24. Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, Rogers PD, Perlin DS. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;5(7):a019752. Published 2014 Nov 10. doi:10.1101/cshperspect.a019752
25. Mérillon, J.-M.; Rivièrè, C. *Natural Antimicrobial Agents*; Springer International Publishing AG: Cham, Switzerland, 2018.
26. Stringaro, A.; Colone, M.; Angiolella, L. Antioxidant, antifungal, antibiofilm, and cytotoxic activities of *Mentha* spp. essential oils. *Medicines* 2018, 5, 112.
27. Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. Essential Oils as Antimicrobial Agents-Myth or Real Alternative?. *Molecules*. 2019;24(11):2130. Published 2019 Jun 5. doi:10.3390/molecules24112130
28. <https://www.fundacion-canna.es/los-terpenos>
29. D'agostino M, Tesse N, Fripiat JP, Machouart M, Debourgogne A. Essential Oils and Their Natural Active Compounds Presenting Antifungal Properties. *Molecules*. 2019;24(20):3713. Published 2019 Oct 15. doi:10.3390/molecules24203713
30. Piątkowska E, Rusiecka-Ziółkowska J. Influence of Essential Oils on Infectious Agents. *Adv Clin Exp Med*. 2016;25(5):989–995. doi:10.17219/acem/31287

31. Peixoto I.T.A., Furlanetti V.F., Anibal P.C., Duarte M.C.T., Höfling J.F. Potential pharmacological and toxicological basis of the essential oil from *Mentha* spp. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2009;30:235–239.
32. Chávez-González M.L., Rodríguez-Herrera R., Aguilar C.N. Essential oils: A natural alternative to combat antibiotics resistance antibiotic resistance in mechanisms and new antimicrobial approaches. In: Kateryna K., Mahendra R., editors. *Antibiotic Resistance*. Academic Press; Cambridge, MA, USA: 2016. pp. 227–237.
33. Al-Bayati FA. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009;8:20. Published 2009 Jun 12. doi:10.1186/1476-0711-8-20
34. Benzaid C, Belmadani A, Djeribi R, Rouabhia M. The Effects of *Mentha × piperita* Essential Oil on *C. albicans* Growth, Transition, Biofilm Formation, and the Expression of Secreted Aspartyl Proteinases Genes. *Antibiotics (Basel)*. 2019;8(1):10. Published 2019 Jan 30. doi:10.3390/antibiotics8010010
35. Tejas Rathod, Hemali Padalia and Sumitra Chanda. Chemical constituents of *Mentha piperita* and *Pongamia pinnata* essential oils and their synergistic anticandidal activity with some antibiotics against multidrug resistant clinical isolates of *Candida*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2017; 6(5): 579-589.
36. Rosato A, Carocci A, Catalano A, Clodoveo ML, Franchini C, Corbo F, Carbonara GG, Carrieri A, Fracchiolla G. Elucidation of the synergistic action of *Mentha Piperita* essential oil with common antimicrobials. *PloS one*. 2018 Aug 1;13(8):e0200902.

37. Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F, et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia*. 2005; 159(3): 339-345. Doi:10.1007/s11046-003-4790-5.
38. Badillo Rangel, María Fernanda, sustentante Inhibición del crecimiento de microorganismos de interés médico y odontológico mediante aceites esenciales de plantas / 2019.
39. Prado Castillo, Patricia, sustentante El efecto antimicótico del aceite esencial de *Mentha spp* y *Rosmarinus officinalis* en una cepa de *Candida Albicans* resistente a antimicóticos / 2021.
40. Bona, E., Cantamessa, S., Pavan, M., Novello, G., Massa, N., Rocchetti, A., Berta, G., & Gamalero, E. (2016). Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents?. *Journal of applied microbiology*, 121(6), 1530–1545. <https://doi.org/10.1111/jam.13282>
41. Srivatstava, A., Ginjupalli, K., Perampalli, N. U., Bhat, N., & Ballal, M. (2013). Evaluation of the properties of a tissue conditioner containing organum oil as an antifungal additive. *The Journal of prosthetic dentistry*, 110(4), 313–319. [https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(13\)60381-9](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(13)60381-9).
42. Choonharuangdej, S., Srithavaj, T., & Thummawanit, S. (2021). Fungicidal and inhibitory efficacy of cinnamon and lemongrass essential oils on *Candida albicans* biofilm established on acrylic resin: An in vitro study. *The Journal of prosthetic dentistry*, 125(4), 707.e1–707.e6. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2020.12.017>.
43. Sookto, T., Srithavaj, T., Thaweboon, S., Thaweboon, B., & Shrestha, B. (2013). In vitro effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*. *Asian*

Pacific journal of tropical biomedicine, 3(5), 376–380.

[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60080-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60080-5)

44. Tayarani-Najaran Z, Talasaz-Firoozi E, Nasiri R, Jalali N, Hassanzadeh M. Antiemetic activity of volatile oil from *Mentha spicata* and *Mentha × piperita* in chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Ecancermedicalscience*. 2013; 7:290. doi:10.3332/ecancer.2013.290.
45. Luls HS, Luis LS, Bernardo M. In vitro study of the effect of an essential oil and a delmopinol mouth rinse on dental plaque bacteria. *Indian J Dent Res*. 2016;27(6):648-651. doi:10.4103/0970-9290.19960256.
46. Ben-Arye E, Dudai N, Eini A, Torem M, Schiff E, Rakover Y. Treatment of upper respiratory tract infections in primary care: a randomized study using aromatic herbs. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011;2011:690346. doi:10.1155/2011/690346.
47. Barata D, Durán A, Carrillo S. Estomatitis protésica. Aspectos clínicos y tratamiento. *Prof. dent*. 2002, 5(10): 622-627.
48. Rebolledo M, Leonor; Pastor M. Comportamiento de prótesis dentales removibles como factor causal de estomatitis subprotésica: Reporte de un caso. *Acta Odontol. Colomb*, 2012, 2(2): 105-111.
49. Vickers, C. E., & Sabri, S. (2015). Isoprene. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 148, 289–317. https://doi.org/10.1007/10_2014_303