



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EFFECTO ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE
EUCALIPTO, HIPOCLORITO DE SODIO Y CLORHEXIDINA
CONTRA *Candida albicans* RESISTENTE A
ANTIMICÓTICOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A:

GABRIELA FLORES ZUNO

TUTOR: Dr. ENRIQUE ROMO ARÉVALO

MÉXICO, Cd. Mx.

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mis padres y hermanos...

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Romo Arévalo, por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo con él, ofreciéndome su tiempo, apoyo, dedicación y excelente cumplimiento profesional.

Al Dr. Mikado Alejandro Nidome Campos, por presentar su apoyo y ofrecer sus conocimientos en el Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología.

A la Mtra. Laura Elena Gómez Lizárraga del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, por su excelente dedicación y amabilidad en el Servicio Académico de Microscopía Electrónica de Barrido (SAMEB).

Al Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología por abrir las puertas y otorgarme un espacio de trabajo en las instalaciones, proporcionándome el instrumental necesario para desarrollar esta investigación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me ha permitido crecer personalmente y me ha brindado todo lo necesario para mi desarrollo académico.

Al proyecto **PAPIIT IN 202024** (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica), por permitir el desarrollo de mi trabajo de investigación.

DEDICATORIAS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Odontología.

A mi madre por ser mi mayor apoyo, darme su amor incondicional y creer en mí.

A mi padre por enseñarme valiosas lecciones de vida para no rendirme.

A mis hermanos por brindarme su apoyo absoluto y proporcionarme la fuerza para seguir adelante.

A mis amigos y compañeros que me han apoyado y guiado en mi desarrollo académico.

Contenido

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
1. MARCO TEÓRICO	6
1.1.1 <i>Candida albicans</i>	6
1.1.2 Ecología	7
1.1.3 Patogenicidad	7
1.2.1 HIPOCLORITO DE SODIO	9
1.2.2 Mecanismos de acción	9
1.2.3 Uso	9
1.3.1 CLORHEXIDINA	10
1.3.2 Mecanismo de acción	10
1.3.3 Uso	11
1.4.1 ACEITES ESENCIALES	12
1.4.2 Clasificación	12
1.4.3 ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO	13
1.4.4 Composición química	14
1.4.5 Mecanismo de acción	14
1.4.6 Usos	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. OBJETIVOS	16
5. HIPÓTESIS	17
6. MATERIALES	17
7. METODOLOGÍA	19
8. RESULTADOS	23
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS	62
10. DISCUSIÓN	65
11. CONCLUSIÓN	67
12. REFERENCIAS	68

Resumen

El estudio de las infecciones causadas por los hongos del género *Candida*, es de gran relevancia, debido a que estas son las que se reportan con mayor regularidad en el ser humano y cuya especie más aislada y frecuente es *Candida albicans*. En la cavidad oral, las infecciones ocasionadas por *Candida* son conocidas como candidiasis y se presentan con mayor frecuencia en pacientes portadores de prótesis removibles, con un desequilibrio de la salud, ya sea local, sistémico o fisiológico (edad avanzada), aunado a una higiene deficiente. Las condiciones anteriores crean un ambiente perfecto para el desarrollo de la estomatitis protésica, inflamación crónica de la mucosa oral que está en contacto con la prótesis removible. La limpieza mecánica de las prótesis removibles dentales no es suficiente para erradicar a estos hongos, por tal motivo es de suma importancia utilizar agentes químicos para su desinfección.

El presente trabajo de investigación fue diseñado para comparar el efecto antifúngico de diferentes agentes con propiedades desinfectantes (aceite esencial de eucalipto, hipoclorito de sodio y clorhexidina) contra una cepa de *Candida albicans* resistente a antimicóticos. La metodología consistió en generar una solución estandarizada de *Candida albicans* y diluir en ella una concentración específica de cada desinfectante, a un tiempo de contacto establecido de 15 y 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las pruebas se sembraron en cajas petri con Agar Dextrosa Sabouraud (DSA) y se observaron después de 24 y 48 horas de incubación. Adicionalmente, se determinó el efecto de concentraciones de los desinfectantes sobre la morfología de las células de *Candida albicans* mediante microscopía electrónica de barrido. Las concentraciones eficaces contra *Candida albicans*, obtenidas en estas pruebas indican que el Aceite Esencial de Eucalipto debe encontrarse a una concentración del 2%, aplicándolo durante 30 minutos, el hipoclorito de sodio a una concentración de 0.5% por 30 minutos y la clorhexidina a una concentración de 0.06% durante 15 minutos. Nuestro estudio es relevante ya que da información valiosa que se puede aplicar en la clínica para el control del desarrollo de microorganismos patógenos para el ser humano.

Abstract

The study of infections caused by fungi of the *Candida* genus is of great relevance because these are the ones most reported in humans, and *Candida albicans* is the most isolated and frequent species. In the oral cavity, infections caused by *Candida* are known as candidiasis and occur more frequently in patients with removable prostheses, along with an imbalance in health, local, systemic, or physiological conditions (such as advanced age), combined with poor hygiene. These conditions create a perfect environment for the development of prosthetic stomatitis, a chronic inflammation of the oral mucosa which is in contact with removable prostheses. Mechanical cleaning for removable dental prostheses is not sufficient to eradicate these fungi, due to the use of chemical agents for disinfection is critical.

This research was designed to compare the antifungal effect of different disinfectant agents (eucalyptus essential oil, sodium hypochlorite, and chlorhexidine) against a strain of *Candida albicans* resistant to conventional antifungals. The methodology involved the preparation of a standardized solution of *Candida albicans* and diluting, in it, a specific concentration of each disinfectant for a set time of 15 and 30 minutes. After this time, the tests were sown on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) petri dishes and observed after 24 and 48 hours of incubation. Additionally, the effect of disinfectant concentrations on the morphology of *Candida albicans* cells was determined by scanning electron microscopy. Effective concentrations against *Candida albicans* obtained in these tests indicate that Eucalyptus Essential Oil should be at a concentration of 2%, applied for 30 minutes, sodium hypochlorite at a concentration of 0.5% for 30 minutes, and chlorhexidine at a concentration of 0.06% for 15 minutes. Our study is relevant since it provides valuable information that can be applied in the clinical control of the development of pathogenic microorganisms for humans.

Introducción

En los últimos años ha aumentado el interés en el estudio de las infecciones causadas por los hongos del género *Candida* (candidiasis), dado que estas suelen reportarse con mayor frecuencia en el ser humano. Dichas infecciones se presentan en la cavidad bucal cuando se pierde la eubiosis (equilibrio en la microbiota), ya sea por factores predisponentes generales como diabetes, malnutrición, cáncer, deficiencias en el sistema inmune, entre otras, o locales, por ejemplo; xerostomía, higiene deficiente, prótesis parciales o totales removibles en mal estado, etc. Aunque el género *Candida* incluye más de 150 especies, solo algunas de estas pueden ser patógenas para los humanos como *Candida albicans* que es la especie aislada con mayor frecuencia.^{1,2}

Debido a esto, se han realizado extensas investigaciones enfocadas en la identificación y tratamiento de *Candida albicans*, puesto que es la principal especie responsable de la Candidiasis Oral; una enfermedad infecciosa que puede manifestarse en forma de lesiones superficiales en la mucosa bucal.^{1,3,4} En este sentido, la Estomatitis Protésica (EP) es la lesión más frecuente de la mucosa oral en pacientes portadores de prótesis totales asociada a la infección por *Candida*, esta condición se caracteriza por la presencia de áreas inflamadas, edema y/o crecimiento excesivo de tejido en el área de soporte biológico de las prótesis. Su etiología es multifactorial: trauma debido al mal ajuste de las prótesis, falta de higiene, uso constante de las prótesis sin retirarlas durante la noche, presión negativa en la zona de contacto prótesis-mucosa, compromiso del sistema inmunológico, entre otras. Desde el punto de vista microbiológico, el factor etiológico más importante en el desarrollo de la EP es la presencia de biopelícula en la superficie de las prótesis, a causa de que el material con el que están elaboradas, polimetilmetacrilato (PMMA) tiene una superficie rugosa y porosa que actúa como reservorio, favorece la adhesión y protección de los microorganismos. Todos estos factores resultan favorables para la colonización y crecimiento de *Candida albicans* y, por ende, de la estomatitis protésica.^{5,6}

Por lo antes mencionado, es extremadamente importante realizar la limpieza y desinfección de las prótesis totales removibles (PTR) y/o prótesis parciales removibles (PPR), aunque esto puede representar un reto para el paciente, ya que se deben emplear sustancias desinfectantes y una técnica adecuada. Sin embargo, existe desconocimiento por parte de los clínicos y pacientes portadores de prótesis sobre los desinfectantes, los tiempos y las concentraciones a los que se deben aplicar, además de no contar con técnicas de higiene y mantenimiento para sus prótesis removibles.^{7,8}

Los desinfectantes o antisépticos usados para las PTR pueden causar efectos adversos en el PMMA, o al paciente si no se usan de forma adecuada. Es posible que su efecto sea nulo o exagerado, asimismo muchos de estos pacientes han tenido tratamientos prolongados o excesivos con antifúngicos, lo cual ha creado resistencia a estos fármacos por parte de estos microorganismos, en consecuencia, es necesario encontrar un desinfectante ideal, capaz de inhibir el crecimiento de *C. albicans*, incluso cepas resistentes a antimicóticos, que además tenga latencia y que sea otra opción de uso en el caso de resistencia micótica.^{7,8}

El hipoclorito de sodio es el desinfectante más utilizado en odontología debido a su capacidad degradante de materia orgánica, también se usa para la desinfección de PTR, es un agente bactericida y fungicida, así como blanqueador de manchas, en diferentes estudios se ha comparado su eficacia y su concentración a partir de 0,2% resulta eficaz, a pesar de ello, no es posible utilizarlo para la limpieza de cualquier material, ya que su uso prolongado provoca la destrucción del PMMA o cambios físicos y químicos en materiales metálicos. La clorhexidina también es útil para la desinfección de las PTR, ya que inhibe la formación de la biopelícula en boca y en superficies sólidas, al igual que el hipoclorito de sodio tiene efectos contraproducentes, su uso prolongado puede producir ciertos efectos negativos a nivel local, como pigmentaciones y alteración de percepción de sabores.^{5,9,10} Como consecuencia de estos efectos adversos, se comenzó a investigar a los aceites esenciales (AE) de ciertas plantas como desinfectantes, estos también cuentan con

propiedades antifúngicas y tienen además propiedades antiinflamatorias. Se piensa que pueden ser una mejor opción en el tratamiento contra EP y *Candida albicans*.

11

En este estudio se analizarán los efectos antifúngicos del aceite esencial de eucalipto (AEE), hipoclorito de sodio y clorhexidina en contra de *Candida albicans* resistentes a antimicóticos.

1. MARCO TEÓRICO

1.1.1 *Candida albicans*

Candida albicans es la especie fúngica con mayor prevalencia en el cuerpo humano sano y coloniza principalmente el tracto digestivo y genitourinario por lo que en presencia de un desequilibrio homeostático, la incidencia de colonización por *Candida albicans* es común. Las infecciones pueden ser superficiales de la piel y las mucosas, por ejemplo, aftas y candidiasis vaginal, o infecciones hematógenas diseminadas con una mortalidad importante.^{3,12}

Este microorganismo es un hongo dimórfico, lo que significa que tiene dos formas diferentes, dependiendo de las condiciones y el medio en el que se desarrolle. Cuando se encuentra en su estado saprófito (organismo heterótrofo que consigue su alimento de materia orgánica en descomposición o de detritos desechados por otros organismos), *Candida albicans* es un organismo unicelular que se reproduce por gemación, se muestra como una levadura de forma redonda u ovalada, con un tamaño de 2 a 4 micras y paredes delgadas. En su estado parasitario, llega a formar filamentos con extremos redondos, que tienen un diámetro de 3 a 5 micras y una longitud variable. Estos filamentos forman una estructura cilíndrica conocida como pseudomicelio, ya que los brotes no se separan de la célula madre.^{1,3,5}

Por otro lado, la hifa es la forma filamentosa del hongo y se define como una estructura tubular microscópica que contiene múltiples unidades celulares separadas por septos, estas hifas pueden presentarse a partir de blastosporas o de hifas existentes. Igualmente se menciona que todas las especies de *Candida* tienen una apariencia microscópica similar, siendo todas las levaduras Gram positivas.¹

1.1.2 Ecología

De las diversas especies de *Candida* que causan infecciones en la cavidad bucal humana, *C. albicans* ha demostrado ser la más patógena y común. Sin embargo, hay otras especies de *Candida* que son menos comunes como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. kefyr*, *C. krusei* y *C. guilliermondii*, pero también pueden estar involucradas en procesos infecciosos orales.⁵ Las células del género *Candida* son microorganismos oportunistas que se presentan en las secreciones, las mucosas y en la piel de humanos y ciertos animales. En la cavidad bucal, la colonización varía notablemente según la ubicación, *C. albicans* representa del 60 al 70% de los aislamientos y *C. tropicalis* representa el 7%, *C. krusei* y *C. guilliermondii* se aíslan con mucha menos frecuencia.¹

La colonización de la cavidad bucal por *C. albicans* es un paso temprano y crítico en el desarrollo de la candidiasis oral, un proceso que implica la adquisición, adhesión y mantenimiento de una población de levadura estable. La boca tiene numerosos nichos para la colonización de esta especie, particularmente células epiteliales, prótesis dental removible y células bacterianas de la microbiota bucal local. Sin embargo, la capacidad de infección por *Candida* se reduce debido a la existencia de un equilibrio biológico con la microbiota bacteriana comensal.³

1.1.3 Patogenicidad

Como se ha mencionado anteriormente, en una microbiota saludable, *C. albicans* se encuentra de forma natural, es asintomática y coloniza varios nichos del cuerpo. Para la mayoría de las personas con sistemas inmunológicos sanos, *C. albicans* es un organismo comensal inofensivo que existe en armonía con otros miembros de la microbiota, pero cuando este delicado equilibrio se altera, por ejemplo, por cambios en el entorno local (como cambios en el pH o la dieta), el uso de antibióticos o cambios en el sistema inmunológico, pueden ocurrir infecciones causadas por *C. albicans*, que se multiplica rápidamente. Este estado infeccioso se presenta desde

lesiones superficiales de la piel y las mucosas hasta invasión del torrente sanguíneo grave, con una mortalidad significativa de un 47% en algunos casos.¹³

La supervivencia de *C. albicans* depende de su capacidad para formar biopelículas. Se sabe que gracias a las PPR o PTR las biopelículas logran formarse porque consiguen una superficie y un refugio para el crecimiento. Las biopelículas de *C. albicans* son altamente estructuradas compuestas de diferentes tipos de células (células redondas similares a levaduras, células pseudohifales ovaladas y células hifales alargadas) rodeadas por una matriz extracelular. La estructura, evolución y propiedades intrínsecas de las biopelículas son características de las especies microbianas que las componen o son miembros de ellas. Una característica de casi todas las biopelículas es su resistencia al daño físico y químico, lo que las hace muy difíciles de controlar clínicamente.^{13, 14}

La matriz extracelular de la biopelícula de *Candida albicans*, es un componente importante implicado en la resistencia a los fármacos antifúngicos. La matriz juega el papel de una barrera física para la penetración de fármacos y como estabilizador de la estructura general de la biopelícula. Otro componente nombrado de la matriz de la biopelícula que aporta propiedades de resistencia a los medicamentos es el polisacárido β -1,3-glucano. Existen pruebas de que el β -1,3-glucano de matriz puede unirse específicamente a la anfotericina B y evitar que este fármaco antifúngico ejerza su efecto sobre las células fúngicas recubiertas de matriz dentro de las biopelículas. Además, la presencia celular persistente es otro factor importante para la supervivencia de *C. albicans*. Estas son un pequeño subconjunto de células de levadura metabólicamente inactivas que surgen casualmente como mutaciones fenotípicas dentro de biopelículas y son altamente resistentes a los fármacos antifúngicos.¹³

1.2.1 HIPOCLORITO DE SODIO

El hipoclorito de sodio (NaClO) es un compuesto químico, un sólido cristalino blanco muy inestable, por lo que es más utilizado en disoluciones acuosas, las cuales poseen olor a cloro. Se origina por la mezcla de cloro, hidróxido de sodio y agua, se descompone con el dióxido de carbono (CO₂) del aire. El hipoclorito es un desinfectante universal, definido como un líquido claro, pálido, verde amarillento, alcalino, que presenta una acción disolvente sobre tejidos necróticos y residuos orgánicos, además es un potente agente antimicrobiano y es considerado bactericida y fungicida.^{15, 16}

1.2.2 Mecanismos de acción

El hipoclorito de sodio es uno de los desinfectantes más utilizados para realizar la asepsia de superficies inertes. Su mecanismo de acción se basa en el proceso de cloraminación, que es la reacción del cloro con los grupos amino presentes, para producir cloraminas que afectan el metabolismo celular. El NaClO inhibe enzimas esenciales mediante oxidación. Se ha demostrado que el hipoclorito de sodio a concentraciones de 0,2%, 0,5%, 1% y 2,5% es altamente desinfectante en prótesis colonizadas por *C. albicans*, sin embargo, el uso prolongado de más de 6 meses da como resultado cambios en la rugosidad y una dureza reducida del material acrílico.^{5,17,18}

1.2.3 Uso

El NaOCl actúa como agente antifúngico cuando se utiliza como solución desinfectante en las prótesis removibles (PR), es útil para desinfectar las prótesis afectadas por la EP (estomatitis protésica). Según algunos estudios, sumergir la prótesis en NaOCl al 0,5% durante 5 a 10 minutos es suficiente para eliminar *C. albicans*. Sin embargo, se debe utilizar una vez por semana ya que decolora el acrílico y afecta su resistencia de flexión.⁵

1.3.1 CLORHEXIDINA

De la familia de las biguanidas, la clorhexidina es un antiséptico eficaz, es incoloro, inodoro y de sabor amargo. Se trata de una molécula bicatiónica simétrica compuesta por dos anillos, 4-clorofenilo y dos grupos biguanida unidos por una cadena central decametileno (clorofenilbiguanida). Se ha demostrado que es eficaz para reducir la viabilidad de las biopelículas cuando se aplica a superficies antes y posteriormente de la exposición bacteriana. Es bien conocida por su propiedad para inhibir la formación de la biopelícula dental. Las moléculas de clorhexidina se adsorben inicialmente en las superficies del esmalte o en las membranas salivales de una manera que inhibe la unión bacteriana.^{17,19}

En cuanto a los efectos tóxicos y adversos, puede producir un desplazamiento leve de la microbiota a microorganismos menos sensibles si se emplea de manera prolongada. Un efecto negativo común es la pigmentación de color marrón de los dientes, algunos materiales de restauración y de las mucosas, siendo la zona más afectada el dorso de la lengua. También se puede producir alteración del gusto. De igual forma, se han descrito lesiones descamativas en la mucosa alveolar después de enjuagues al 0.2%. La descamación de células epiteliales puede ocurrir con mayor frecuencia a alta concentración. No se ha descrito toxicidad sistémica ni resistencia bacteriana. Otro punto es que se debe tener cuidado con el uso de jabones naturales, aniones inorgánicos, surfactantes no iónicos y cremas de manos que contengan agentes aniónicos que generen emulsiones ya que al ser una molécula catiónica puede observarse reducida su actividad.^{17,19, 20}

1.3.2 Mecanismo de acción

A bajas concentraciones provoca la pérdida de constituyentes citoplasmáticos de bajo peso molecular, mientras que en concentraciones elevadas su mecanismo de acción es desestabilizar y permeabilizar las membranas celulares, depositándose en el citoplasma (precipitándolo) perjudicando la función de la membrana, impidiendo la disponibilidad de oxígeno y, en consecuencia, se reduce los niveles

de ATP (trifosfato de adenosina) y produce así la muerte celular. Aunque su efecto disminuye según el pH, si este se encuentra por debajo de 5 iniciará la pérdida de su actividad bactericida. El gluconato de clorhexidina al 2% altera la porosidad de la superficie de la prótesis.^{17,19}

Es muy importante mencionar que tiene eficacia anti-biopelícula y actividad antimicrobiana residual cuando es utilizada como irrigación final en endodoncia. Finalmente, este antiséptico tiene la capacidad de unirse a las proteínas que contiene la saliva, como la mucina, dando lugar a la liberación paulatina durante 8 a 13 horas de la clorhexidina y se mantiene en la saliva a niveles bacteriostáticos.^{19,21,22}

1.3.3 Uso

A nivel hospitalario la clorhexidina es un excelente antiséptico ya que ha demostrado un valioso papel en la prevención de infecciones asociadas a la atención en salud. Distintos estudios han demostrado que este antiséptico puede ser utilizado de diferentes formas las cuales son: limpieza de las manos, preparación prequirúrgica de la piel, prevención en la bacteriemia asociada a catéter vascular, prevención en la neumonía asociada al respirador y las infecciones maternas, entre otras.^{10,23} En la odontología, el empleo de la clorhexidina es extremadamente amplio, llegando a utilizarse en casi todas las áreas de esta. Un ejemplo es su uso en odontología restauradora, donde se emplea para la desinfección de las preparaciones dentales para la colocación posterior de un material restaurador, además es útil para la reducción de la degradación del componente de colágena de la capa híbrida. Su uso en periodoncia también es fundamental ya que los enjuagues de clorhexidina, se recomienda administrar 10 ml del producto con concentración al 0,2% y 15 ml del producto al 0,12%²⁰, inhiben la actividad proteolítica de las matriz metaloproteinasas (MMPs) -2, -8 y -9, las cuales tienen un papel importante en las enfermedades inflamatorias que destruyen los tejidos periodontales, lo que ayuda al tratamiento de la periodontitis.¹⁰

1.4.1 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales (AE) son líquidos volátiles que se obtienen generalmente mediante destilación por arrastre de vapor de agua. Estos aceites contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y desempeñan un papel importante en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Son mezclas complejas compuestas por más de 100 componentes, que pueden incluir compuestos alifáticos de bajo peso molecular como alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos, así como monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. En su mayoría, estos aceites tienen un aroma agradable.²⁴

La resistencia de los patógenos a los antimicrobianos sintéticos está en aumento a nivel mundial y expone una seria amenaza para el tratamiento efectivo de una variedad de infecciones. Actualmente las personas suelen evitar productos que contengan fármacos sintéticos, por lo que se ha generado un gran interés en la investigación de los aceites esenciales (AE), como otra opción contra agentes microbianos, gracias a los compuestos que poseen, tienen actividad antimicrobiana contra una amplia gama de patógenos.^{21,25}

La candidiasis también se ha convertido en un problema significativo, ya que *Candida albicans* muestra una mayor resistencia a los antifúngicos comunes. Si bien los aceites esenciales se utilizan en enjuagues bucales para el tratamiento de la candidiasis oral, también pueden ser utilizados para desinfectar ciertos materiales, como las prótesis dentales parciales o totales removibles.^{26,27}

1.4.2 Clasificación

Los AE se agrupan de acuerdo con diferentes criterios como su consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.^{27,28}

Según su consistencia

- Esencias líquidas: a temperatura ambiente son líquidos volátiles.

- Bálamos: espesos, poco volátiles y experimentan reacciones de polimerización.
- Oleorresinas: tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son líquidos, muy viscosos o semisólidos.

Según su origen

- Naturales: obtenidos directamente de la planta y no son modificados física ni químicamente.
- Artificiales: su producción es con procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes
- Sintéticos: son la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química.

Según el punto de vista químico

- Monoterpenoides.
- Sesquiterpenoides.
- Fenilpropanoides.

En esta clasificación se nombran conforme a sus componentes que se encuentran en mayor proporción.

1.4.3 ACEITE ESENCIAL DE EUCALIPTO

Eucalyptus es un árbol de la familia *Myrtaceae*, es caracterizado por tener corteza gris, hojas dimórficas, con fuerte olor a cineol (terpeno). Incluye 140 géneros y unas 3,800 especies y subespecies, distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales. Se cultiva en Brasil, África, Sudeste de Asia y Sur de Europa. La especie más utilizada a nivel mundial es el eucalipto blanco o albar “*Eucalyptus globulus*”. Posee glándulas que segregan aceites esenciales de sus hojas, los cuales producen su característico olor y componentes que pueden ser convertidos en productos químicos de valor industrial. El aceite esencial de eucalipto (AEE) y otros aceites esenciales de plantas aromáticas tienen diversos usos funcionales.²⁴

1.4.4 Composición química

La composición química de los AEE dependerá de la especie de árbol del que se obtiene, también se reporta que una influencia importante es el método para extraer el AE, no obstante, los componentes reportados en distintos artículos y tesis que han realizado estudios mediante la técnica de Cromatografía de Gases de Alta Resolución (GCAR) para determinar los componentes mayoritarios del AEE, reportan que son los monoterpenos oxigenados como el Eucaliptol, hidrocarburos como α -Pino y D-Limoneno, sesquiterpenos y monoterpenos. Además, se menciona que los compuestos aromáticos y la toxicidad de AE tienen efectos antimicrobianos y que la composición y toxicidad definen los efectos antimicrobianos de los AE.^{6,27,29}

1.4.5 Mecanismo de acción

La actividad bactericida y antifúngica de estas sustancias está estrechamente relacionada con los fenoles y monoterpenos que poseen, gracias a que son lipófilos atraviesan la pared celular, y son capaces de tener una interacción directa con el citoplasma del patógeno haciendo permeable la membrana (alterando la estructura de las capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos) o bien, gracias a su hidrofobicidad, pueden incorporarse a los lípidos de la membrana celular bacteriana, en donde ocurre una fuga de iones y otros compuestos de la bacteria. La composición y los efectos tóxicos del AE causan los efectos antimicrobianos.³⁰

Desafortunadamente, los AE no son atacantes selectivos de los patógenos; sino que pueden afectar también a las células somáticas de forma reversible o irreversible. En casos extremos, la citotoxicidad del AE puede provocar apoptosis, necrosis e insuficiencia orgánica. Por lo tanto, el uso de los AE debe ser prudente.^{26,31}

1.4.6 Usos

El aceite esencial de eucalipto (AEE) y otros aceites esenciales de plantas aromáticas tienen diversos usos funcionales. Debido a esto, se utilizan como componentes en muchos medicamentos patentados, como jarabes, pastillas y gotas nasales para tratar problemas respiratorios como la congestión nasal, resfriados y enfermedades bronquiales. Además, se ha demostrado que el AEE en forma de vapor tiene propiedades tóxicas para bacterias, hongos, patógenos del suelo e insectos. Esto sugiere que podría tener un uso potencial como fumigante o antimicrobiano en laboratorios, hospitales y almacenes de granos alimenticios, entre otro.^{24,28,29,30}

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que las especies de *Candida* son comunes en el cuerpo humano y están en un equilibrio constante con este, se considera una especie normal de la microbiota humana, sin embargo, es un microorganismo oportunista, si las condiciones de equilibrio se rompen debido a factores predisponentes locales o generales del huésped, se obtendrá como consecuencia una colonización de esta especie y eventualmente el desarrollo de candidiasis.

En odontología, *Candida albicans* es el principal microorganismo asociado al desarrollo de estomatitis protésica. La limpieza de las prótesis removibles se hace con sustancias químicas desinfectantes que, si no son utilizadas adecuadamente, su efecto antiséptico podría ser exagerado o casi nulo, dañar el material protésico, e incluso, tener un efecto tóxico para el mismo paciente.

2. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de este estudio proporcionará información acerca de cuál desinfectante entre NaClO, Clorhexidina y AEE tiene el mejor efecto antifúngico contra una cepa de *Candida albicans* resistente a antimicóticos y cuáles son las mejores condiciones para conseguir tales efectos. Este estudio arrojará datos para que el personal clínico odontológico pueda ofrecer la mejor opción de tratamiento para la desinfección de las PR colonizadas por *C. albicans* y poder brindar una alternativa adecuada para evitar y controlar la estomatitis protésica.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar cuál desinfectante, entre: hipoclorito de sodio, clorhexidina y aceite de eucalipto tiene mejor efecto contra el crecimiento de *C. albicans*, según el tiempo y la concentración al que sean empleados.

Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de eucalipto a concentraciones de 1% y 2% durante 15 y 30 minutos.
- Evaluar el efecto antifúngico del hipoclorito de sodio a concentraciones de 0.5% y 0.25% durante 15 y 30 minutos.
- Evaluar el efecto antifúngico de la clorhexidina a concentraciones de 0.06% y 0.12% durante 15 y 30 minutos.
- Determinar los cambios morfológicos, mediante microscopía electrónica de barrido, de las células de *Candida albicans* después de someterlas a los diferentes desinfectantes.

4. HIPÓTESIS

Los desinfectantes propuestos inhiben el crecimiento de una cepa de *C. albicans* resistente a los antimicóticos.

5. MATERIALES

RECURSOS MATERIALES PARA LA PREPARACIÓN DE CULTIVO ESTÉRIL CALDO DEXTROSA SABOURAUD Y AGAR DEXTROSA SABOURAUD.

- Matraz Erlenmeyer de 500 ml
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Aluminio cortado en cuadros de 8x8 cm
- Báscula
- Probeta 1000 ml
- Agua desionizada
- Platos de pesaje - poliestireno
- Cajas Petri
- Autoclave

RECURSOS MATERIALES PARA EL CULTIVO DE *Candida albicans*

- Muestra de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos proporcionada por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)
- Ultra congelador de -80 °C
- Medio de cultivo estéril Dextrosa Sabouraud BD DIFCO TM Lot. 8155577
- Agar Bacteriológico BD Bioxon Lot. 8107600
- Tubos Falcon de 50 ml
- Campana de flujo laminar AIR SCIENCE™
- Micropipeta con capacidad de 1000 µl
- Puntas para micropipeta

- Incubadora microbiológica orbital con control de temperatura MRC®
- Ligas elásticas de goma

RECURSOS MATERIALES PARA LA REALIZACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTANDARIZADA DE *Candida albicans*.

- Tubo Falcon de 50 ml
- Centrifuga KENDRO LABORATORY PRODUCTS y MULTIFUGE 3 S-R
- Gradilla para tubos Falcon
- Medio de cultivo estéril Dextrosa Sabouraud
- Campana de flujo laminar AIR SCIENCE™
- Espectrofotómetro de luz visible y UV. THERMO SCIENTIFIC® GENESYS 150
- Vortex. THERMO SCIENTIFIC® M37615
- Celdas para espectrofotómetro de 1cm de paso óptico

RECURSOS MATERIALES PARA PRUEBAS DE INHIBICIÓN MICÓTICA CON DESINFECTANTES

- Campana de flujo laminar AIR SCIENCE™
- Solución estandarizada
- Microtubos eppendorf 1.5 ml
- Micropipetas de capacidad de 20, 100 y 1000 µl
- Incubadora orbital con control de temperatura MRC®
- Vortex. THERMO SCIENTIFIC® M37615
- Gradilla para microtubos eppendorf
- Hipoclorito de sodio al 5% (clorox)
- Consepsis al 2% (gluconato de clorhexidina, marca ultradent)
- Aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* grado terapéutico puro)
- Marcador indeleble
- Incubadora microbiológica

RECURSOS MATERIALES PARA LA TOMA DE FOTOGRAFÍAS

- Soporte
- Cartulina negra
- Cinta adhesiva
- Cámara fotográfica
- Papel cascaron

RECURSOS MATERIALES MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

- Ionizadora JEOL JFC-1100
- Portamuestras de aluminio para microscopio electrónico de barrido
- Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6360LV

6. METODOLOGÍA

Se elaboraron cajas Petri con Agar Dextrosa Sabouraud (medio dextrosa sabouraud Difco USA) para sembrar los microorganismos después del periodo de incubación con las diferentes soluciones desinfectantes. La información de la concentración y el tiempo al que se utilizó cada desinfectante se encuentra en la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones de los diferentes desinfectantes y su tiempo de aplicación sobre la suspensión estandarizada de *Candida albicans*.

Desinfectante	Concentración		Tiempo	
AEE	1%	2%	15'	30'
NaClO	0.25%	0.5%	15'	30'
Clorhexidina	0.06%	0.12%	15'	30'

ELABORACIÓN DE LA SUSPENSIÓN ESTANDARIZADA DE *Candida albicans*

La cepa de *Candida albicans* resistentes a los antimicóticos (Fluconazol 25µg, Ketoconazol 50µg y Anfotericina B 100µg) utilizada en este trabajo de investigación fue donada por el Área de Investigación en Virología y Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).³²

Dentro de una campana de flujo laminar (AIR SCIENCE™) se realizó lo siguiente: En un tubo Falcon de 50 ml estéril, se agregaron 3 ml de medio DS estéril y 100 µl de un stock criopreservado de cepa de *Candida albicans* resistente a antimicóticos. Esta mezcla se homogeneizó en un vortex y se llevó a la incubadora microbiológica orbital con control de temperatura (orbital shaker incubator MRC) donde se dejó crecer a una temperatura de 37° C a 220 rpm por 24 horas. Una vez pasado el tiempo, el tubo Falcon con el cultivo de *C. albicans* se centrifugó a 4500 rpm, a 4° durante 15 minutos para separar la biomasa. Al tubo se le retiró el sobrenadante y al botón celular se le colocó medio DS estéril y se homogeneizó hasta alcanzar una densidad óptica de 1 (1×10^8 células por mililitro), a una longitud de onda de 600 nanómetros en un espectrofotómetro (Espectrofotómetro de luz visible y UV. THERMO SCIENTIFIC® GENESYS 150).

PRUEBAS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Candida albicans* CON LOS DIFERENTES DESINFECTANTES

Una vez que realizada la suspensión estandarizada de *Candida albicans*, se procedió a agregar los diferentes desinfectantes en tubos eppendorf de 1.5 ml estériles, para obtener las concentraciones propuestas (como se indica en la tabla 2) en un volumen de 500 microlitros. Los tubos con las pruebas se mantuvieron en agitación constante a 220 rpm a 37°C en una incubadora orbital, hasta llegar a los tiempos programados de 15 y 30 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 6 µl del tubo correspondiente y se sembraron en placas de agar dextrosa Sabouraud por estría

triple. Las placas con el microorganismo se conservaron en una incubadora microbiológica a 37°C y se documentó el crecimiento del microorganismo, mediante la toma de fotografías a las 24 y 48 horas posteriores a la siembra. Todos los procedimientos se realizaron en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar y por triplicado en tres ocasiones diferentes. Finalmente, como control se sembraron 6 µl de la suspensión sin la adición de ningún desinfectante bajo las condiciones antes descritas.

Tabla 2. Preparación de las pruebas de inhibición con los diferentes desinfectantes.

Desinfectante	Operación y datos	Resultados
Eucalipto (1%)	$\frac{(500 \mu l)(1\%)}{100\%} = 5 \mu l$	5 µl de AEE + 495 µl de suspensión
Eucalipto (2%)	$\frac{(500 \mu l)(2\%)}{100\%} = 10 \mu l$	10 µl de AEE + 490 µl de suspensión
NaClO (0.25%)	$\frac{(500 \mu l)(0.25\%)}{5\%} = 25 \mu l$	25 µl de AEE + 475 µl de suspensión
NaClO (0.5%)	$\frac{(500 \mu l)(0.5\%)}{5\%} = 50 \mu l$	50 µl de AEE + 450 µl de suspensión
Clorhexidina (0.06%)	$\frac{(500 \mu l)(0.06\%)}{2\%} = 15 \mu l$	15 µl de AEE + 485 µl de suspensión
Clorhexidina (0.12%)	$\frac{(500 \mu l)(0.12\%)}{2\%} = 30 \mu l$	30 µl de AEE + 470 µl de suspensión

DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS DIFERENTES DESINFECTANTES SOBRE LA MORFOLOGÍA DE *Candida albicans*, MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Se elaboraron 10 portaobjetos de aluminio para Microscopio Electrónico de Barrido de 1x1 cm, en cada cuadro se aplicó una gota (2 µl) de la muestra de cada desinfectante empleado en la solución estandarizada del microorganismo (como se indica en la tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones propuestas de los diferentes desinfectantes y su tiempo de aplicación sobre la suspensión estandarizada de *Candida albicans* para su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido.

Desinfectante	Concentración	Tiempo
Clorhexidina	2% (máxima concentración)	30'
Clorhexidina	0.12%	15'
Clorhexidina	0.12%	30'
NaClO	5% (máxima concentración)	30'
NaClO	0.05%	15'
NaClO	0.05%	30'
AEE	100% (máxima concentración)	30'
AEE	2%	15'
AEE	2%	30'
Control (Cx)	Levadura sin tratamiento	

Se agregaron los diferentes desinfectantes en tubos eppendorf de 1.5 ml estériles, más las soluciones estandarizadas, para obtener las concentraciones propuestas (como se indica en la tabla 4) en un volumen de 30 µl. Para las muestras que están en su máxima concentración de desinfectante, fue necesario separar el sobrenadante y quedarnos únicamente con el botón celular, para que no existiera disolución. Los tubos con las pruebas se mantuvieron en agitación constante a 220 rpm a 37°C en una incubadora orbital, hasta llegar a los tiempos programados de 15 y 30 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo de cada desinfectante, se tomó 1 gota de cada solución y se colocó en el portaobjetos de aluminio, se dejó secar durante 1 hora y quedó listo para observarse mediante la Microscopia Electrónica de Barrido.

Tabla 4. Preparación de las pruebas de inhibición con los diferentes desinfectantes para la microscopía electrónica de barrido.

Antiséptico	Operación y datos	Resultados
AEE	$\frac{(30\mu l)(0.12\%)}{2\%} = 1.8\mu l$	1.8 μl de AEE + 28.2 μl de solución estandarizada
NaClO	$\frac{(30\mu l)(0.5\%)}{5\%} = 3\mu l$	3 μl de NaClO + 27 μl de solución estandarizada
Clorhexidina	$\frac{(30\mu l)(2\%)}{100\%} = 0.6\mu l$	0.6 μl de Clorhexidina + 29,4 μl de solución estandarizada

7. RESULTADOS

8.1 Obtención de los medios de cultivo

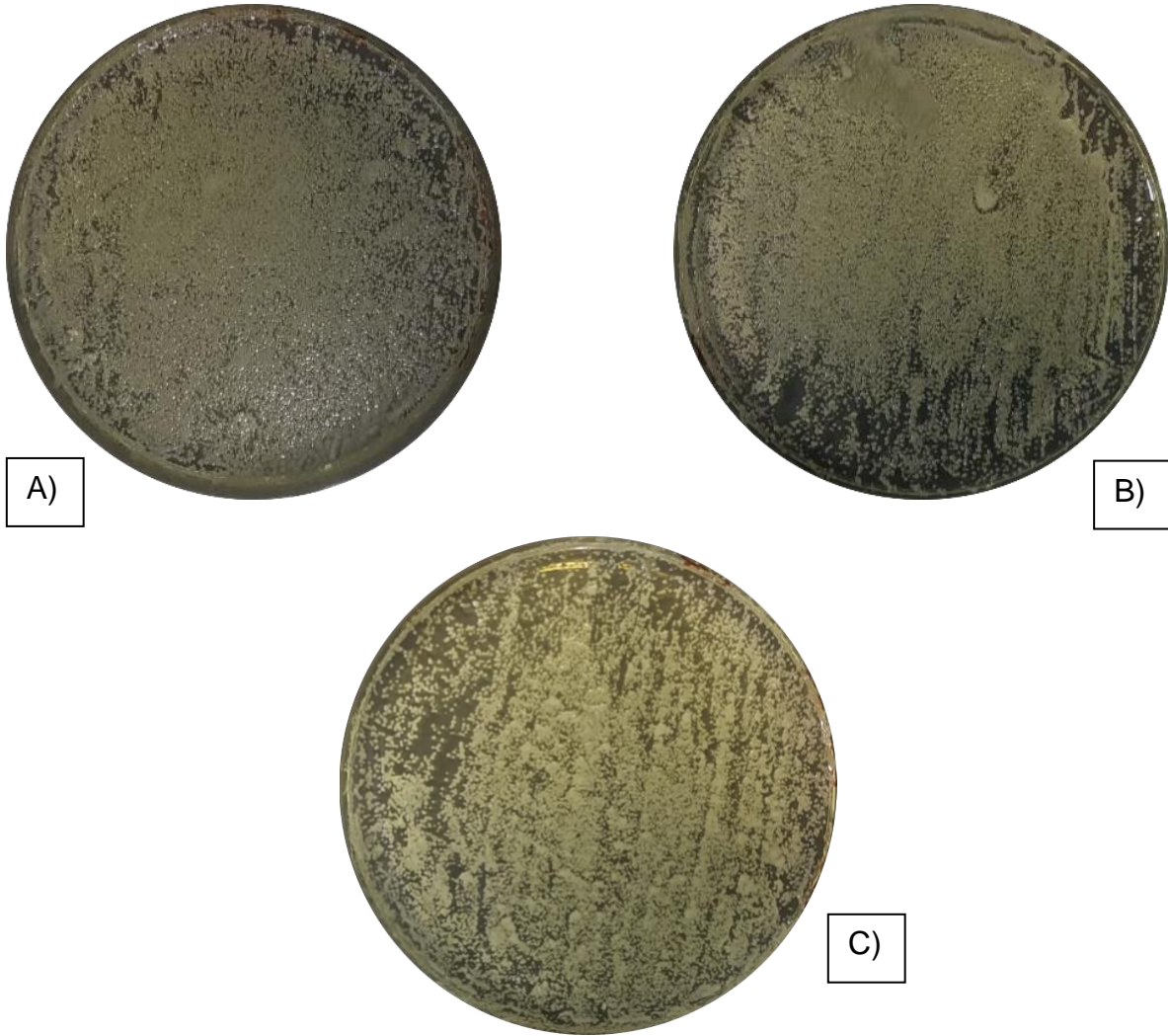
Se obtuvieron dos soluciones de medio dextrosa sabouraud (Difco USA), una con agar para el medio sólido y otra sin agar para el caldo, el medio DSA se repartió en 13 cajas Petri, con 25 ml cada una. Las pruebas microbiológicas se realizaron por triplicado obteniendo así 39 cajas Petri; 3 cajas para realizar los controles y 36 cajas para realizar las pruebas de inhibición de crecimiento con los diferentes desinfectantes.

8.2 Obtención de los cultivos de *Candida albicans* resistente a antimicóticos, inhibidos con los diferentes desinfectantes.

En 36 cajas Petri se sembraron 6 μ l de la solución estandarizada de *Candida albicans* resistente a antimicóticos (Suspensión con una DO de 1) más una concentración de los desinfectantes, establecida en la tabla 2, el tiempo al que se empleó cada desinfectante sobre la cepa resistente se encuentra en la tabla 1. Tres cajas Petri fueron el grupo control, a estas únicamente se les sembraron 6 μ l de solución estandarizada.

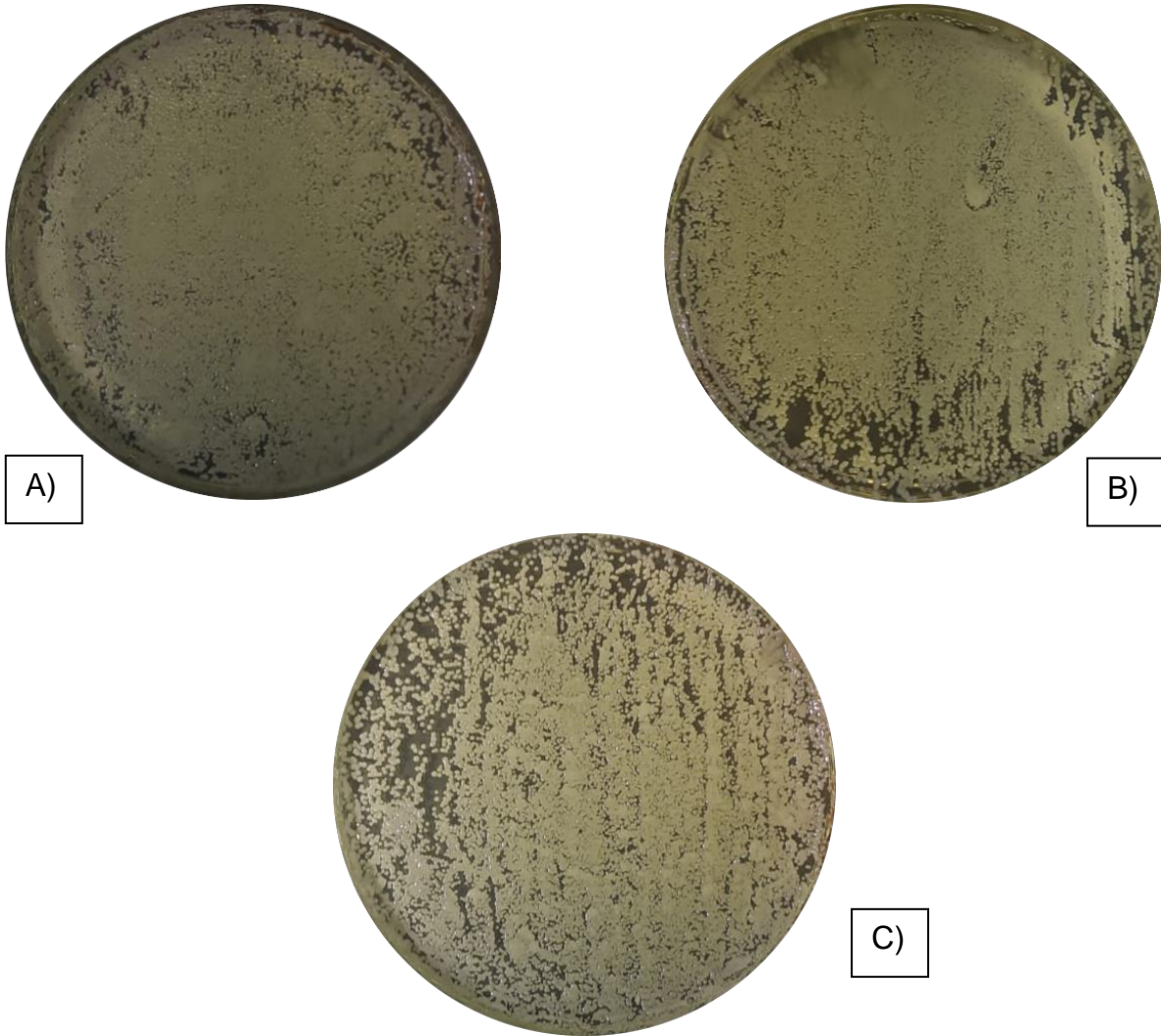
Los resultados fueron evaluados de forma cualitativa visual ya que era imposible contar las colonias de *Candida albicans* del grupo control. Se realizó por triplicado por lo que se obtuvieron 3 pruebas por cada grupo, su concentración y su tiempo de aplicación.

8.2.1 Grupo control (Cx) 6 µl de suspensión estandarizada de *Candida albicans* resistente a antimicóticos sin aplicar ningún tratamiento 24 horas.



Siembra de 6 µl de solución estandarizada de *Candida albicans* resistente a antimicóticos sin emplear desinfectante a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. En las tres cajas se observa un crecimiento similar de la cantidad de colonias.

8.2.2 Grupo control (Cx) 6 µl de suspensión estandarizada de *Candida albicans* resistente a antimicóticos sin aplicar ningún tratamiento 48 horas.



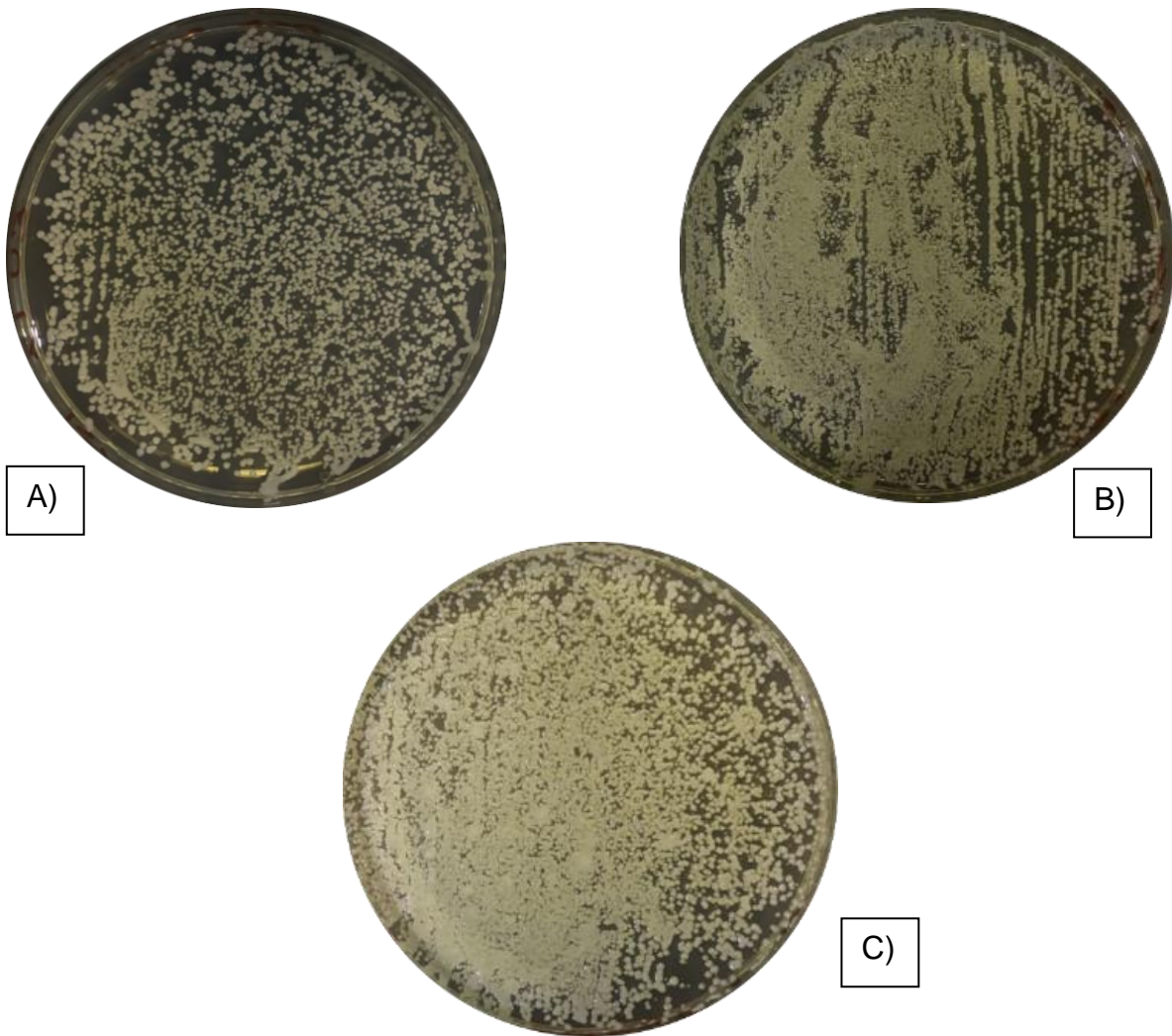
Siembra de 6 µl de suspensión estandarizada de *Candida albicans* resistente a antimicóticos sin emplear desinfectante a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. En las tres cajas se observa un crecimiento similar de la cantidad de colonias.

8.2.3 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Aceite Esencial de Eucalipto al 1% 15 minutos, 24 horas.



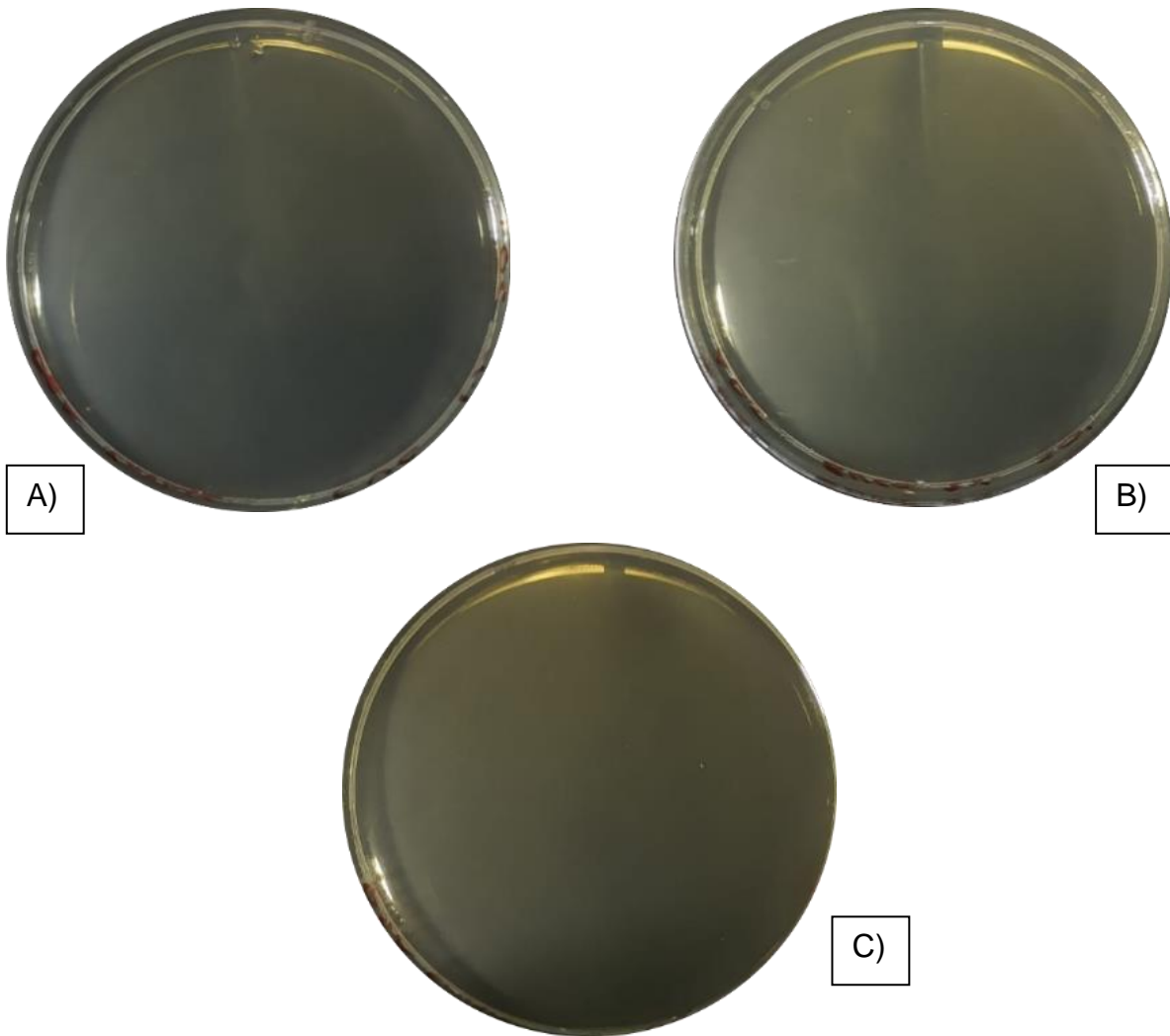
Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando AEE al 1% durante 15 minutos a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. En las cajas B) y C) se observa un crecimiento similar de la cantidad de colonias mientras que en la caja A) se observa una menor cantidad.

8.2.4 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Aceite Esencial de Eucalipto al 1% 15 minutos, 48 horas.



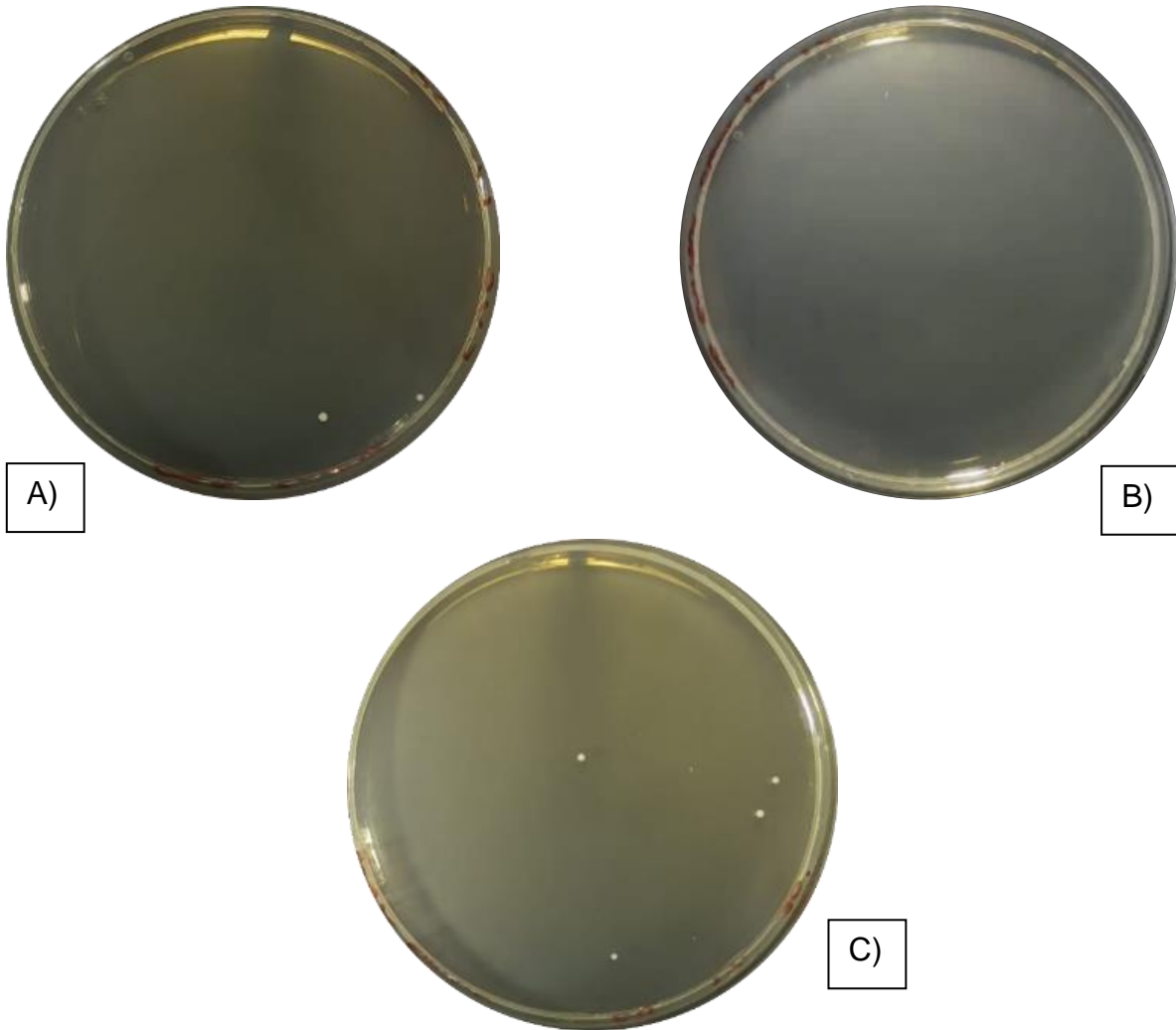
Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando AEE al 1% durante 15 minutos a las 48 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. En número de colonias es incontable en las 3 cajas, pero se puede observar que es menor que en el grupo control.

8.2.5 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Aceite Esencial de Eucalipto al 1% 30 minutos, 24 horas.



Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando AEE al 1% durante 30 minutos a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. Se pueden observar pequeñas colonias aisladas en la caja B) y C), no rebasan las 5 colonias en cada placa. El crecimiento fue mucho menor si lo comparamos con la prueba de AEE 1% 15 minutos a las 24 horas.

8.2.6 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Aceite Esencial de Eucalipto al 1% 30 minutos, 48 horas.



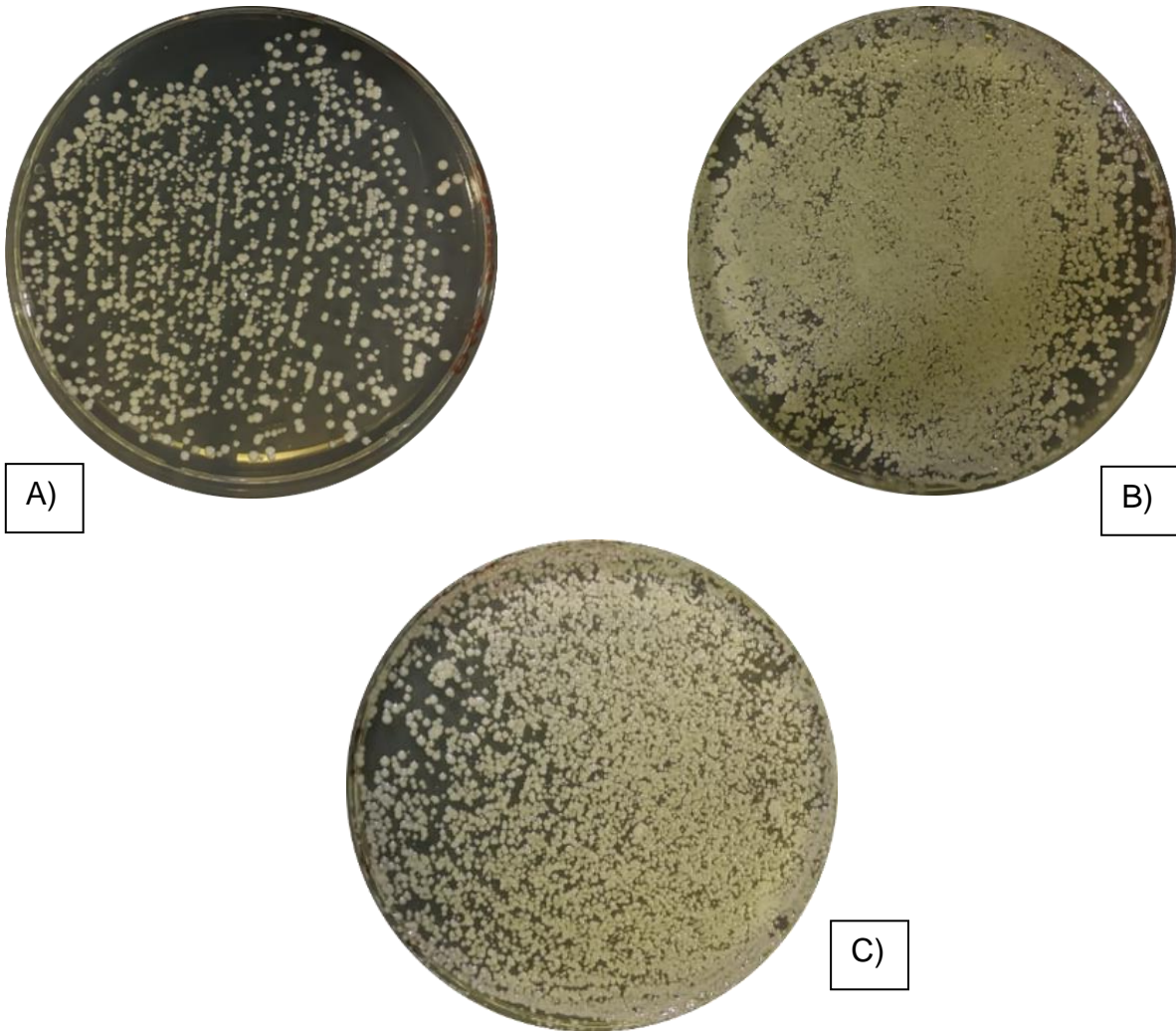
Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando AEE al 1% durante 30 minutos a las 48 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. Se pueden observar colonias aisladas. En la caja A) crecieron 2 colonias medianas, en la B) creció 1 colonia pequeña, mientras que en la caja C) crecieron 4 colonias medianas y 1 pequeña. La cantidad de colonias fue mucho menor si lo comparamos con la prueba de AEE 15 minutos a las 48 horas.

8.2.7 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Aceite Esencial de Eucalipto al 2% 15 minutos, 24 horas.



Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando AEE al 2% durante 15 minutos a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. En la caja A) existió menor crecimiento de colonias que en las cajas B) y C). La cantidad de estas fue menor si lo comparamos con el tiempo de la prueba de AEE 1% 15 minutos a las 24 horas, pero la diferencia no es significativa.

8.2.8 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Aceite Esencial de Eucalipto al 2% 15 minutos, 48 horas.



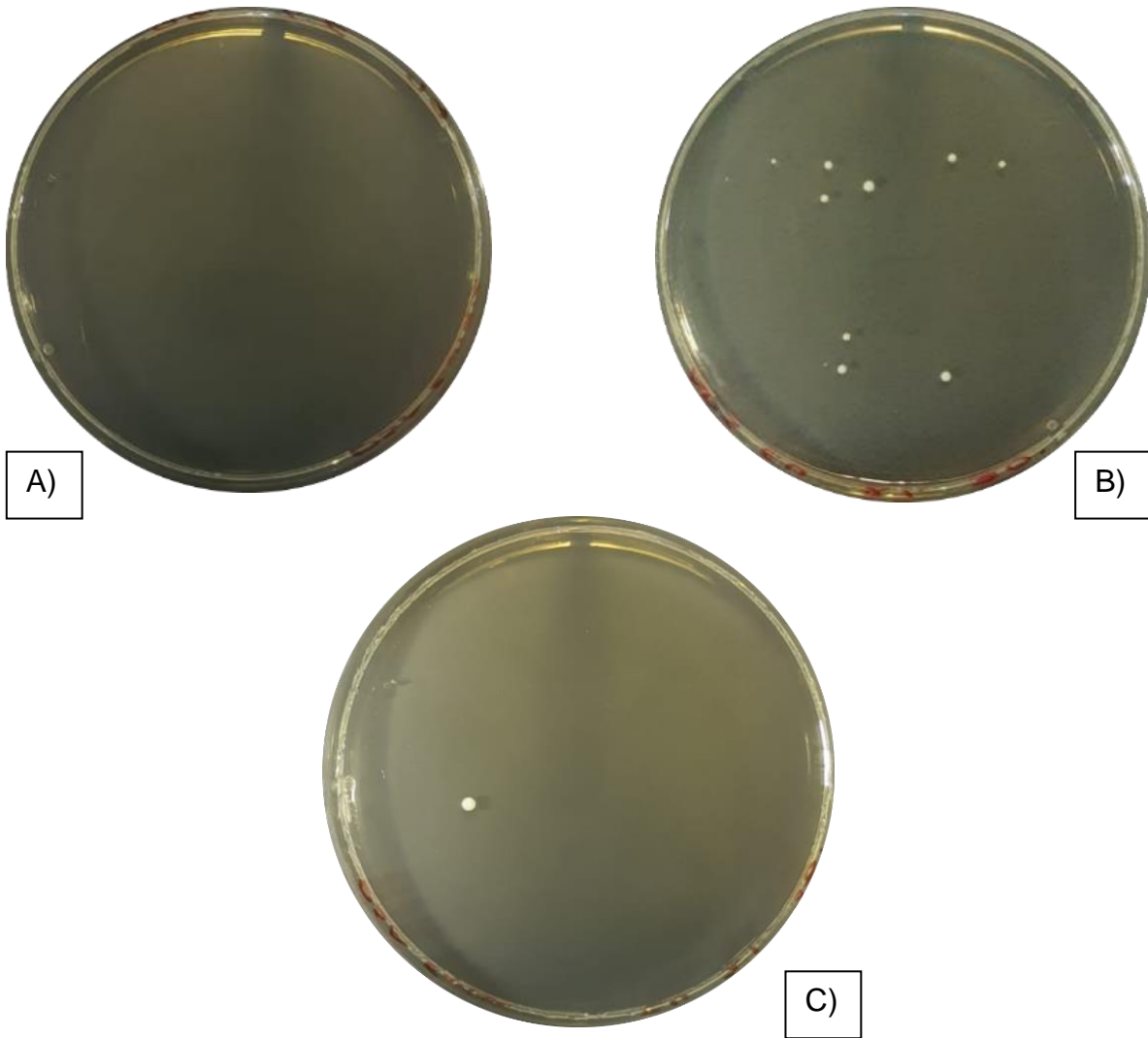
Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando AEE al 2% durante 15 minutos a las 48 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. En la caja A) existió menor crecimiento de colonias. La cantidad de colonias de las cajas B) y C) fue menor si lo comparamos con el tiempo de la prueba de AEE 1% 15 minutos a las 48 horas, pero la diferencia no es significativa.

8.2.9 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Aceite Esencial de Eucalipto al 2% 30 minutos, 24 horas.



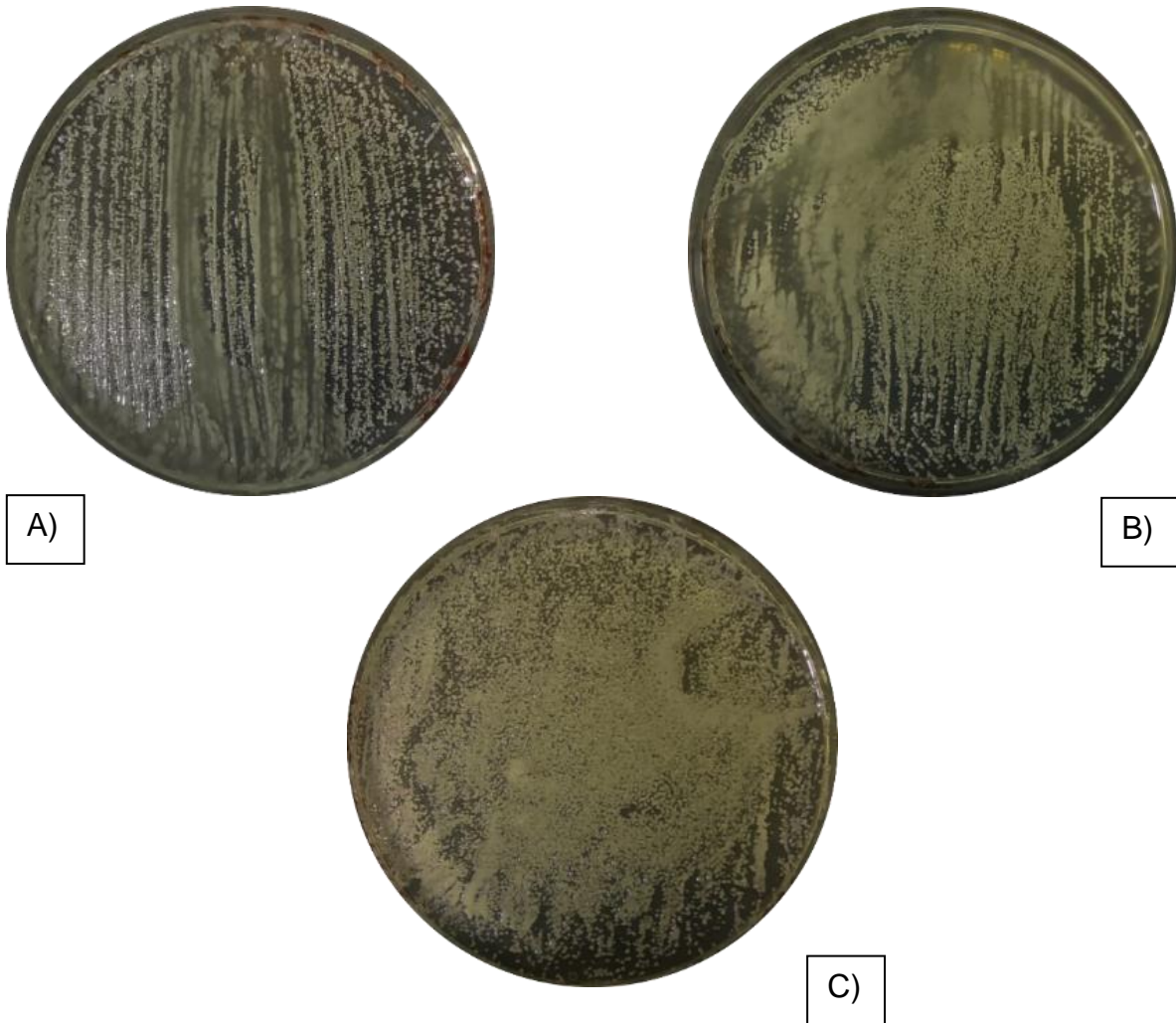
Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando AEE al 2% durante 30 minutos a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. No se observa crecimiento de colonias en ninguna caja.

8.2.10 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Aceite Esencial de Eucalipto al 2% 30 minutos, 48 horas.



Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando AEE al 2% durante 30 minutos a las 48 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. En la caja A) no existió crecimiento de colonias, en la caja B) crecieron 8 colonias medianas y 2 pequeñas, mientras que en la caja C) únicamente creció 1 colonia grande. Existe menor crecimiento de colonias si comparamos esta prueba con la prueba de AEE al 1% 30 minutos 48 horas.

8.2.11 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Hipoclorito de sodio al 0.25% 15 minutos, 24 horas.



Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando NaClO al 0.25% durante 15 minutos a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. La cantidad de colonias parece ser similar en las tres pruebas.

8.2.12 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Hipoclorito de sodio al 0.25% 15 minutos, 48 horas.



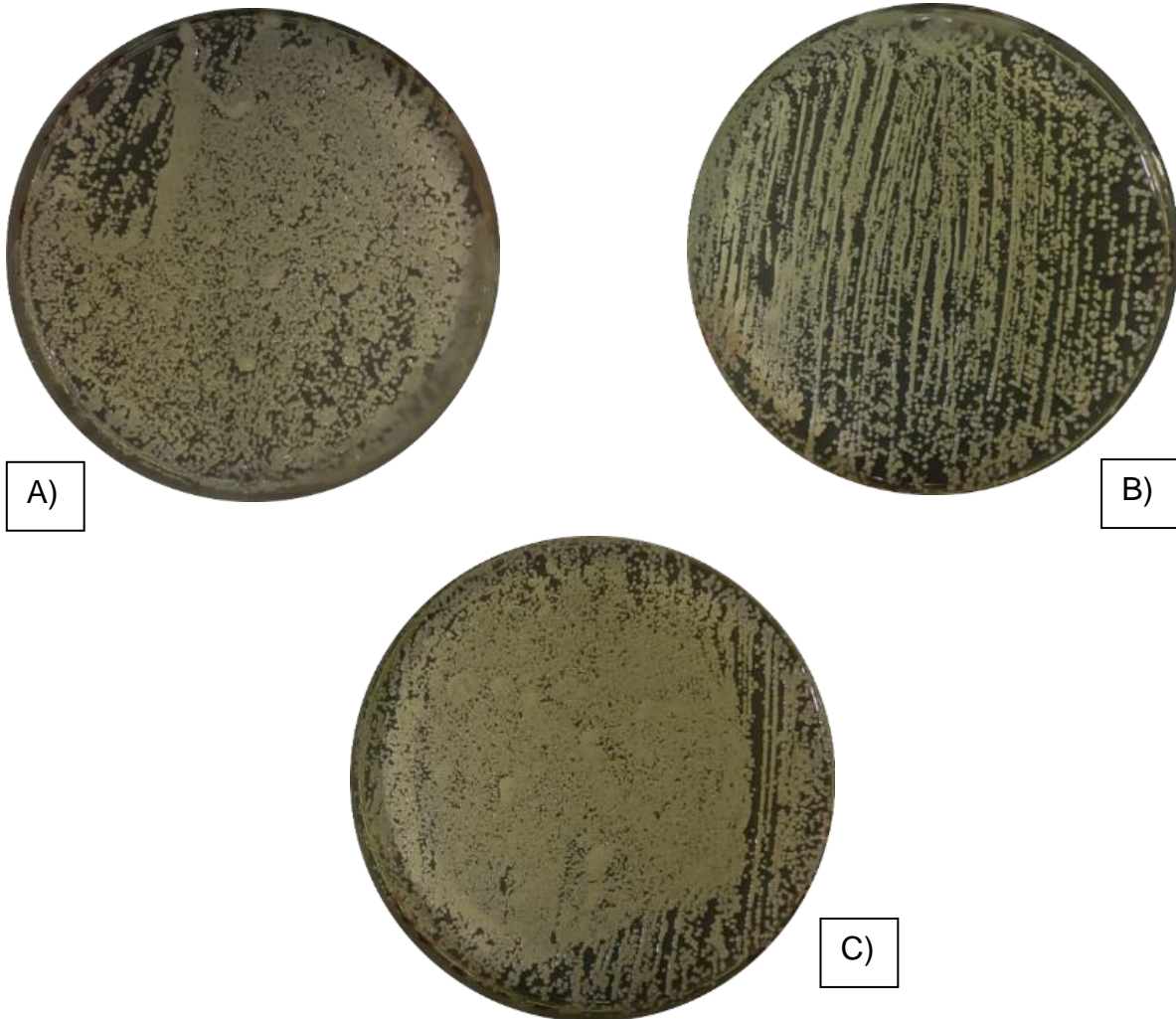
Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando NaClO al 0.25% durante 15 minutos a las 48 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. La cantidad de colonias parece ser similar en las tres pruebas.

8.2.13 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Hipoclorito de sodio al 0.25% 30 minutos, 24 horas.



Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando NaClO al 0.25% durante 30 minutos a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. La cantidad de colonias parece ser similar en las cajas A) y C), mientras que en la caja B) parece haber menos. La cantidad de colonias de las cajas B) y C) parecen ser menores si las comparamos con la prueba de NaClO al 0.25% durante 15 minutos 24 horas.

8.2.14 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Hipoclorito de sodio al 0.25% 30 minutos, 48 horas.



A)

B)

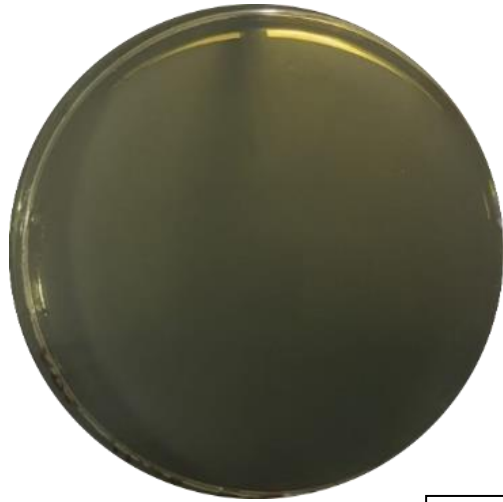
C)

Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando NaClO al 0.25% durante 30 minutos a las 48 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. La cantidad de colonias parece ser similar en las cajas A) y C), mientras que en la caja B) parece haber menos. Se observa un menor crecimiento de colonias si se compara con la prueba de NaClO al 0.25% 15 minutos, sin embargo, la diferencia no parece ser significativa.

8.2.15 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Hipoclorito de sodio al 0.5% 15 minutos, 24 horas.



A)



B)



C)

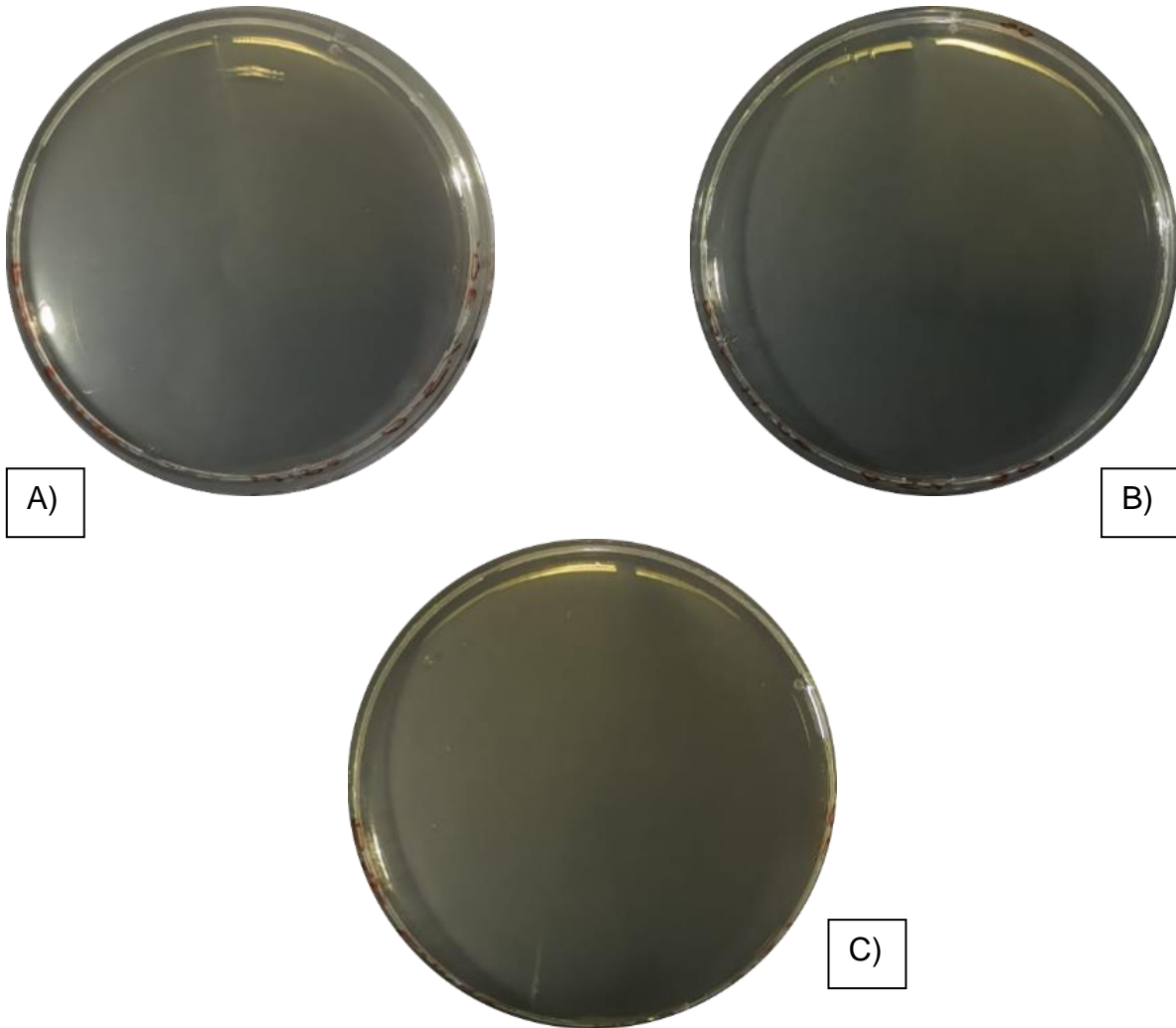
Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando NaClO al 0.5% durante 15 minutos a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. No se observa crecimiento de colonias en ninguna caja.

8.2.16 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Hipoclorito de sodio al 0.5% 15 minutos, 48 horas.



Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando NaClO al 0.5% durante 15 minutos a las 48 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. La cantidad de colonias parece ser similar en las cajas A), B) y C), 3, 1 y 1 colonia respectivamente. Al comparar esta prueba con la de NaClO al 0.25% 15 minutos 48 horas es muy grande la diferencia de crecimiento de colonias, en esta prueba es casi nulo el crecimiento de colonias.

8.2.17 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Hipoclorito de sodio al 0.5% 30 minutos, 24 horas.



Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando NaClO al 0.5% durante 30 minutos a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. No se observa crecimiento de colonias en ninguna caja.

8.2.18 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Hipoclorito de sodio al 0.5% 30 minutos, 48 horas.



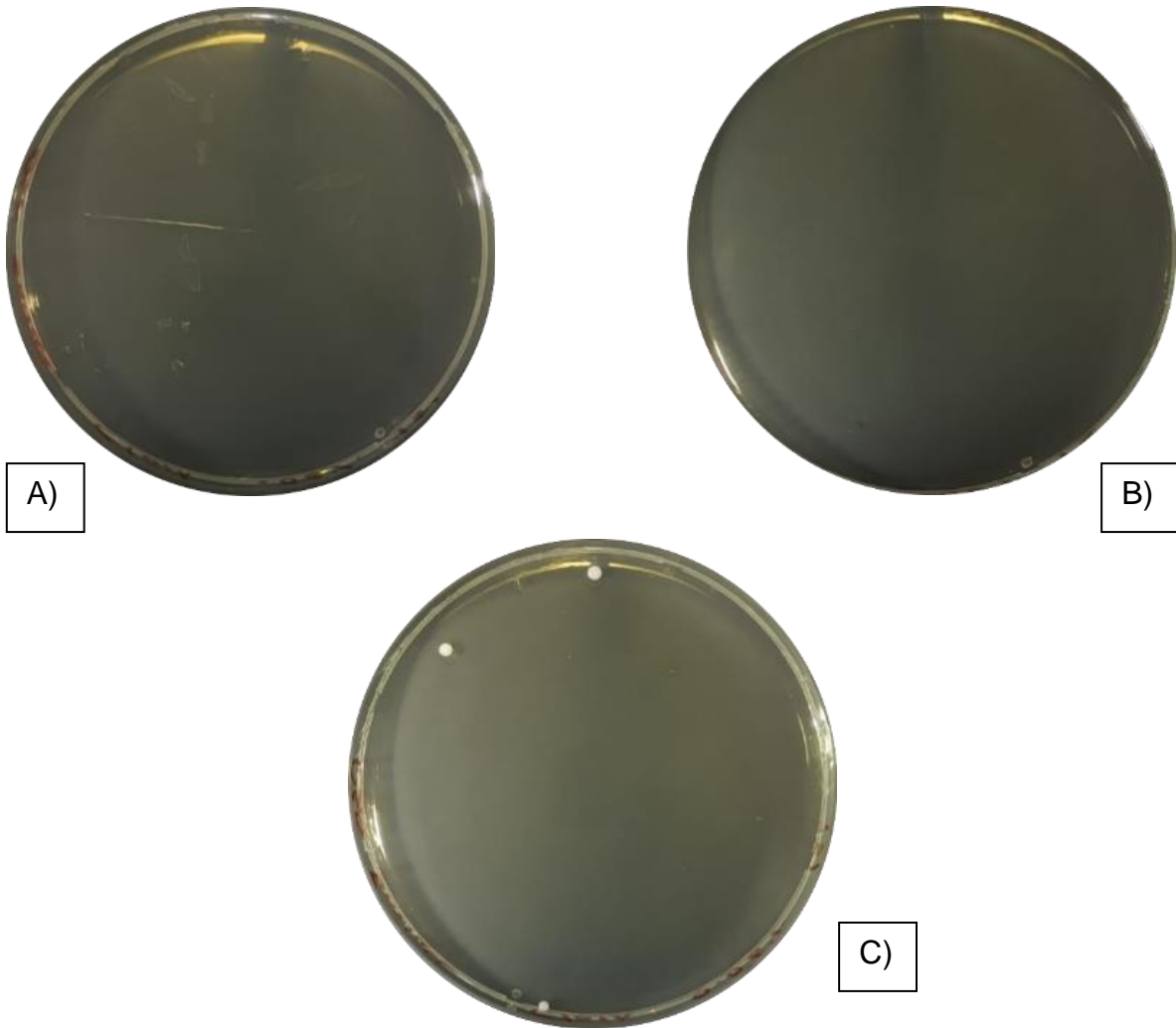
Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando NaClO al 0.5% durante 30 minutos a las 48 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. En las cajas A) y C) no se observan colonias, en la B) se observan 4 pequeñas colonias. Al comparar esta prueba con la de NaClO al 0.5% 15 minutos resulta ser menor el crecimiento de colonias, pero la diferencia es casi nula.

8.2.19 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Clorhexidina (Consepsis Ultradent) al 0.06% 15 minutos, 24 horas.



Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando Clorhexidina al 0.06% durante 15 minutos a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. No se observan colonias en ninguna caja.

8.2.20 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Clorhexidina (Consepsis Ultradent) al 0.06% 15 minutos 48 horas.



Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando Clorhexidina al 0.06% durante 15 minutos a las 48 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. En las cajas A) y B) no se observa ninguna colonia mientras que en la caja C) crecieron 3 grandes colonias aisladas.

8.2.21 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Clorhexidina (Consepsis Ultradent) al 0.06% 30 minutos 24 horas.



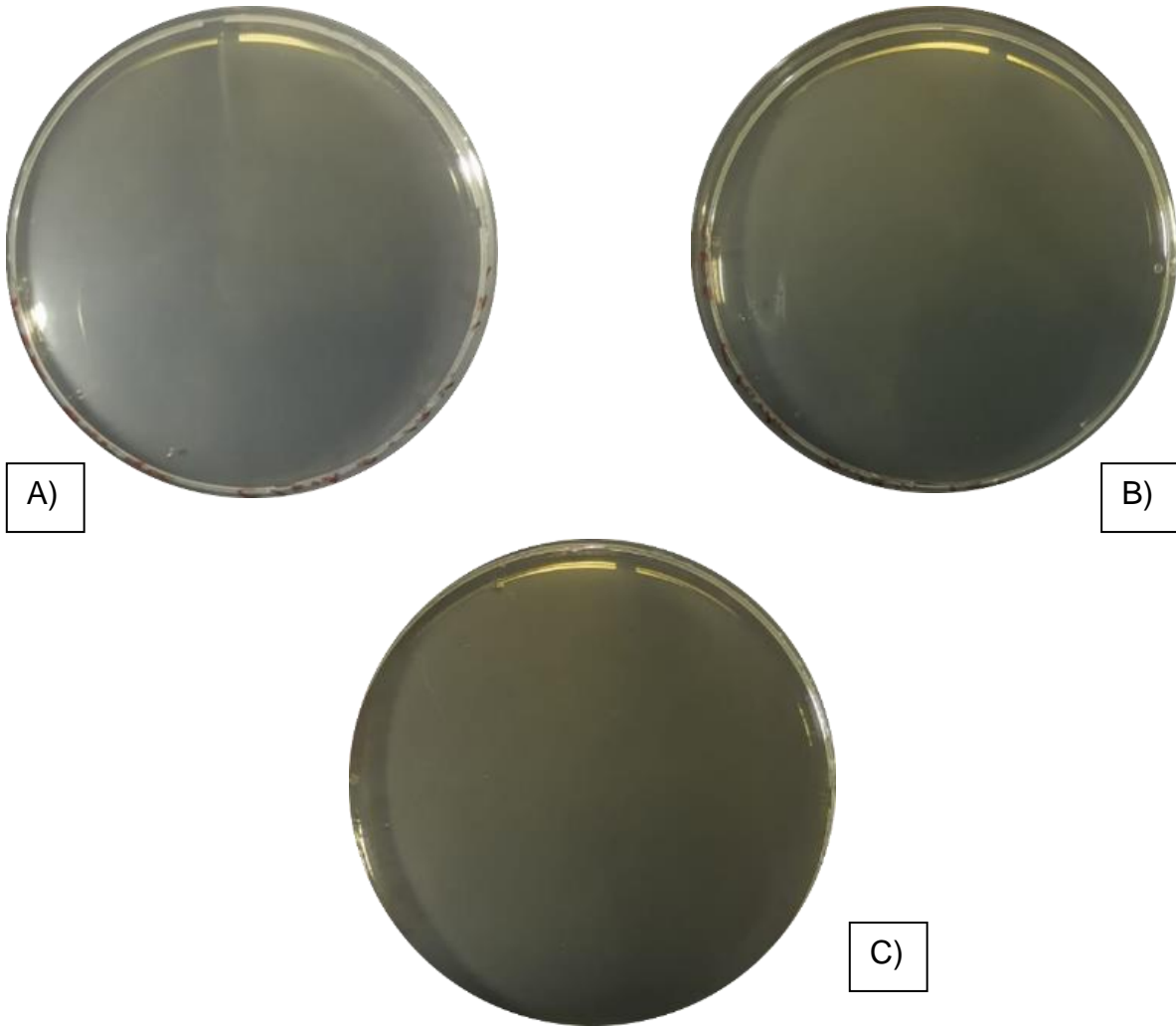
Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando Clorhexidina al 0.06% durante 30 minutos a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. No se observan colonias en ninguna caja.

8.2.22 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Clorhexidina (Consepsis Ultradent) al 0.06% 30 minutos, 48 horas.



Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando Clorhexidina al 0.06% durante 30 minutos a las 48 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. En las cajas A) y B) no se observan colonias mientras que en la C) se observa 1 colonia grande.

8.2.23 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Clorhexidina (Consepsis Ultradent) al 0.12% 15 minutos, 24 horas.



Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando Clorhexidina al 0.12% durante 15 minutos a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. No se observan colonias en ninguna caja.

8.2.24 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Clorhexidina (Consepsis Ultradent) al 0.12% 15 minutos, 48 horas.



Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando Clorhexidina al 0.12% durante 15 minutos a las 48 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. No se observan colonias en ninguna caja.

8.2.25 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Clorhexidina (Consepsis Ultradent) al 0.12% 30 minutos, 24 horas.



Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando Clorhexidina al 0.12% durante 30 minutos a las 24 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. No se observan colonias en ninguna caja.

8.2.26 Pruebas de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos con el uso de Clorhexidina (Consepsis Ultradent) al 0.12% 30 minutos, 48 horas.

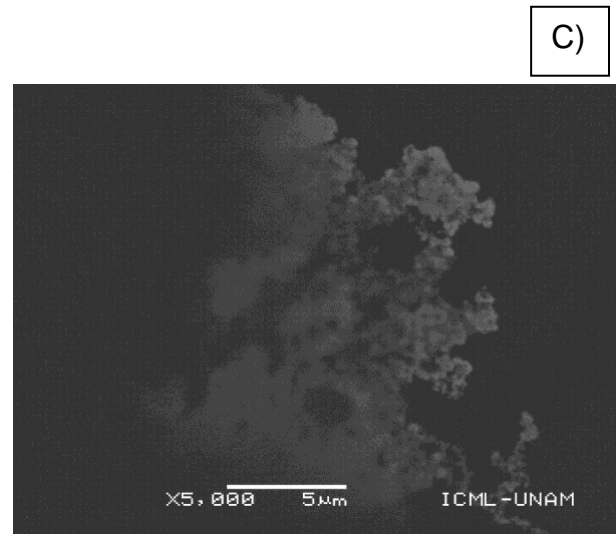
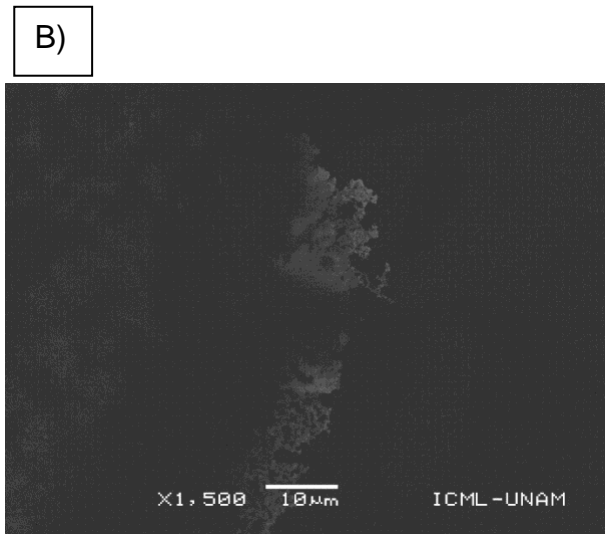
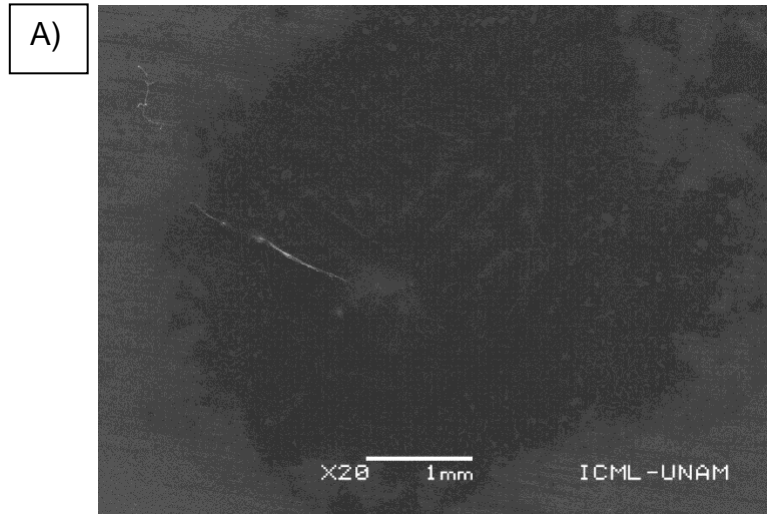


Prueba de inhibición de crecimiento de *Candida albicans* aplicando Clorhexidina al 0.12% durante 30 minutos a las 48 horas. A) Prueba 1, B) Prueba 2 y C) Prueba 3. En las cajas A) y B) no se observan colonias mientras que en la caja C) se observa una colonia grande.

8.3 Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB), determinación del efecto de los diferentes desinfectantes sobre la morfología de *Candida albicans*

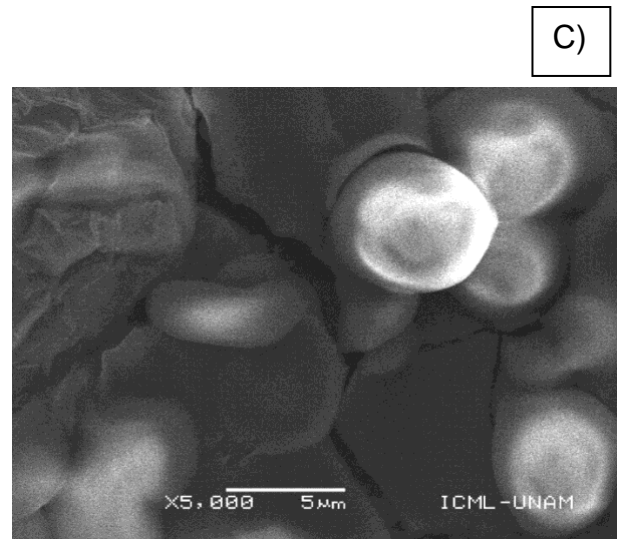
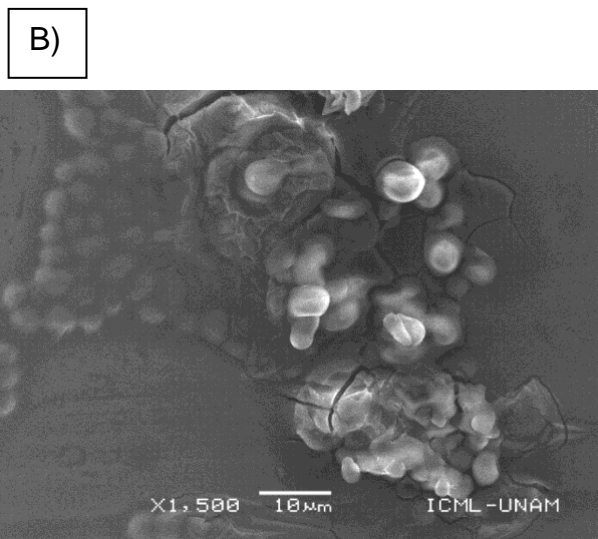
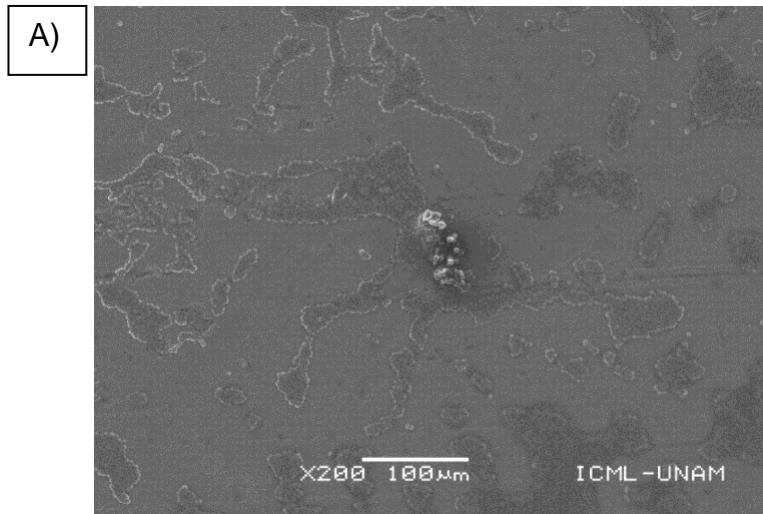
Los datos de las muestras que se observaron en el MEB con la técnica de electrones secundarios, se encuentran en la tabla 3, y cada prueba se observó con un aumento diferente.

8.3.1 Grupo 1. Clorhexidina al 2% aplicada por 30 minutos.



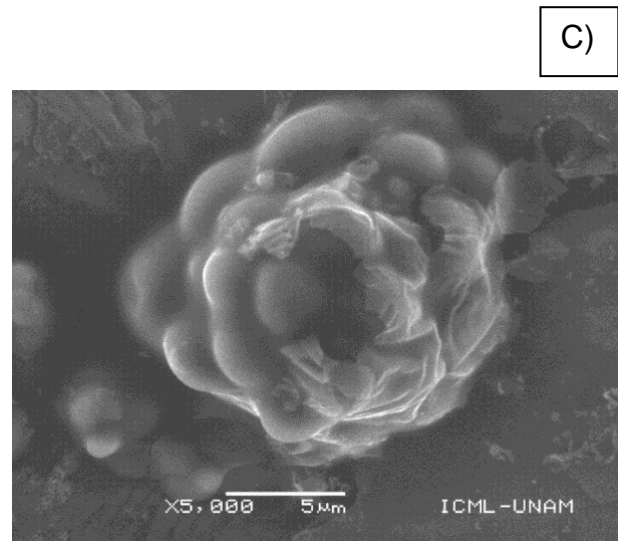
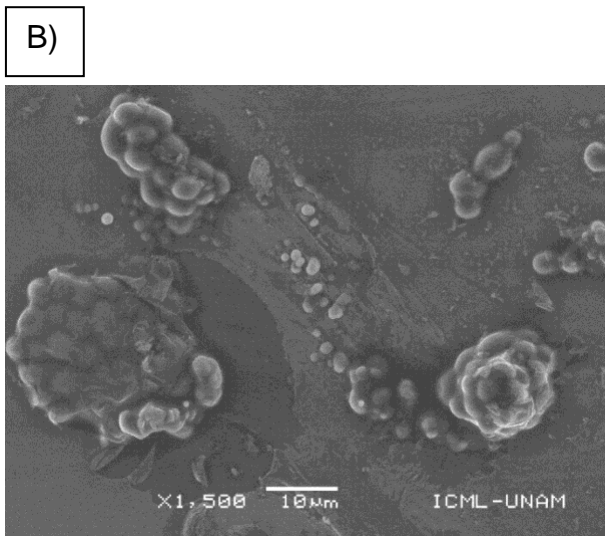
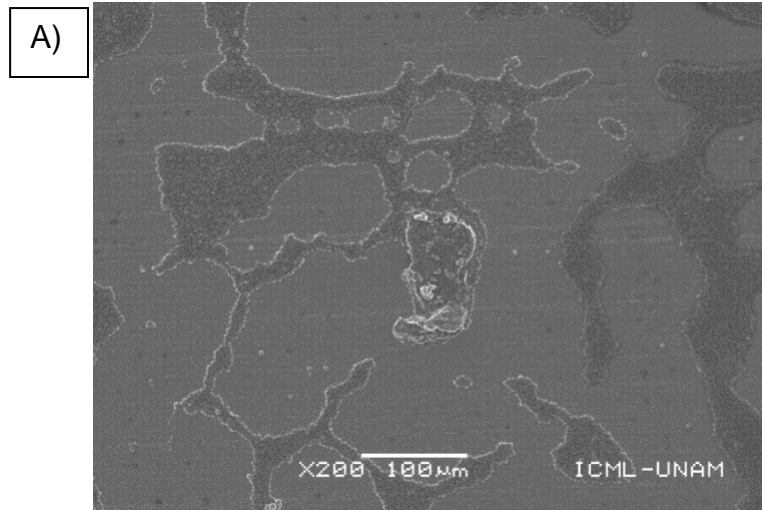
Imágenes del Grupo 1. A) a 20 aumentos, B) a 1500 aumentos y C) a 5000 aumentos. En A), B) y C) no fue posible observar cuerpos celulares a ningún aumento con esta concentración del desinfectante, en B) y C) solo se puede observar una masa dismórfica, que puede corresponder con cuerpos celulares o con el desinfectante empleado.

8.3.2 Grupo 2. Clorhexidina al 0.12% aplicada por 15 minutos.



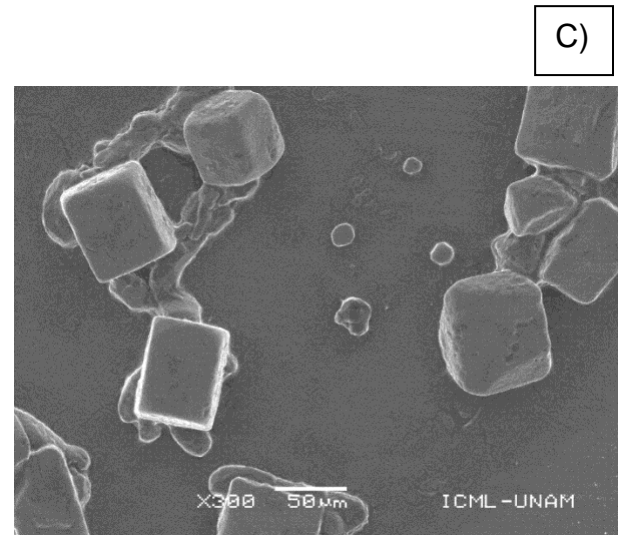
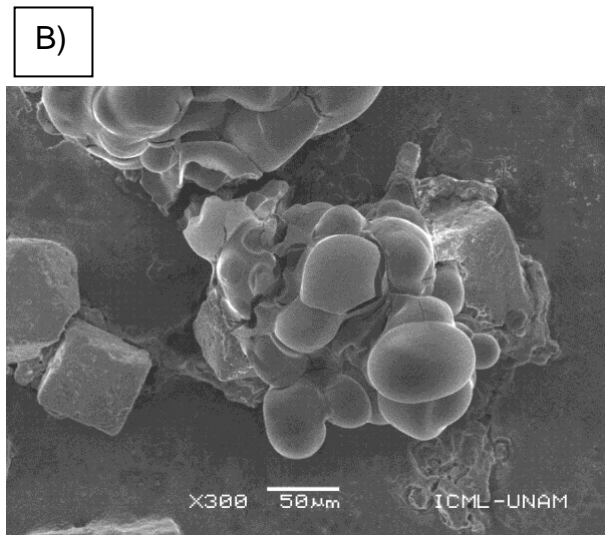
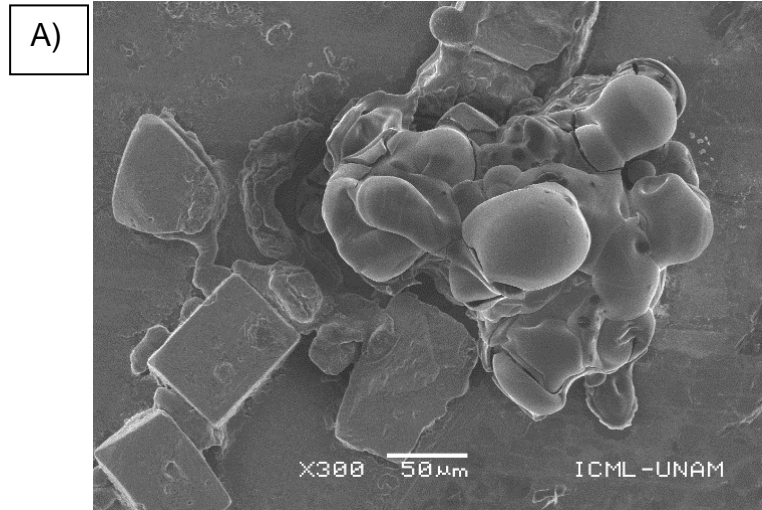
Imágenes del Grupo 2. A) a 200 aumentos, B) a 1500 aumentos y C) a 5000 aumentos. En A) parece que las células están cubiertas por el desinfectante y la densidad de este no permite observarlas claramente. En las imágenes B) y C) se pueden observar células dismórficas y crecidas de la talla normal, que miden aproximadamente 8 micras.

8.3.3 Grupo 3. Clorhexidina al 0.12% aplicada por 30 minutos.



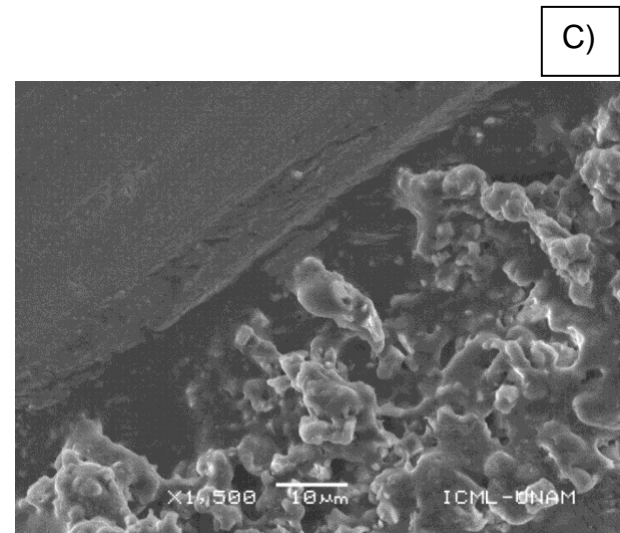
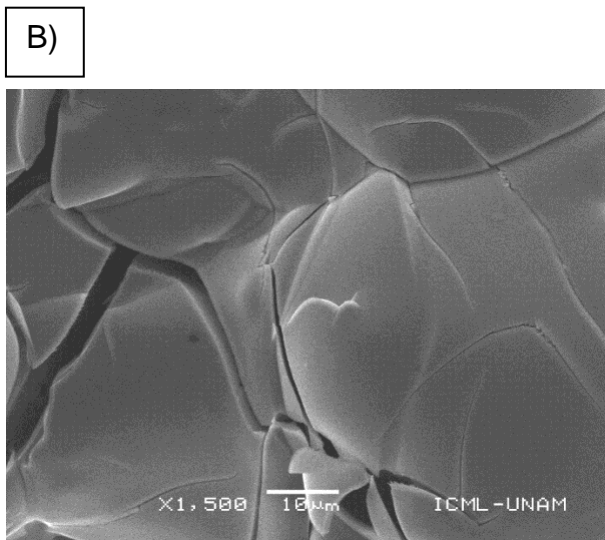
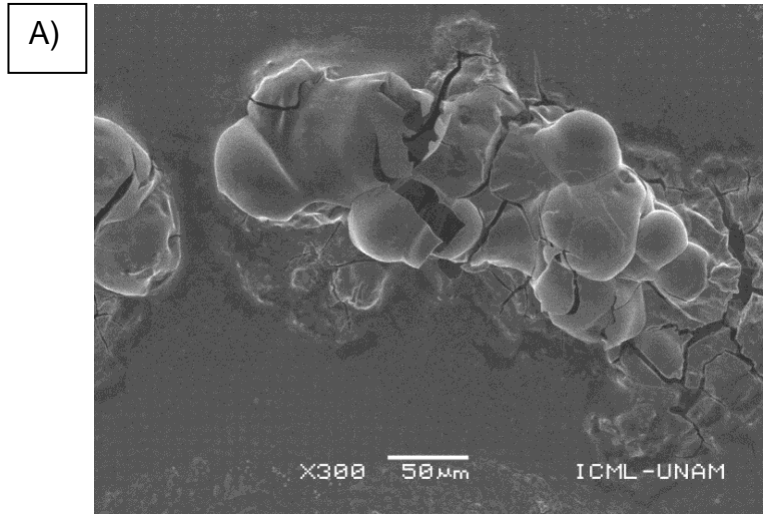
Imágenes del Grupo 3. A) a 200 aumentos, B) a 1500 aumentos y C) a 5000 aumentos. En A) parece que las células están cubiertas por el desinfectante y la densidad de este no permite observarlas claramente, sin embargo, existe presencia de ellas por aglomerados. En las imágenes B) y C) se pueden observar células dismórficas y crecidas de la talla normal, que miden aproximadamente 7 micras.

8.3.4 Grupo 4. Hipoclorito de sodio al 5% aplicado por 30 minutos.



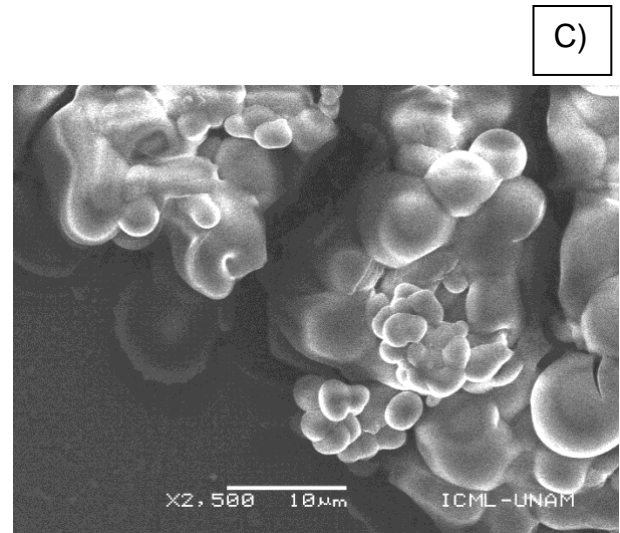
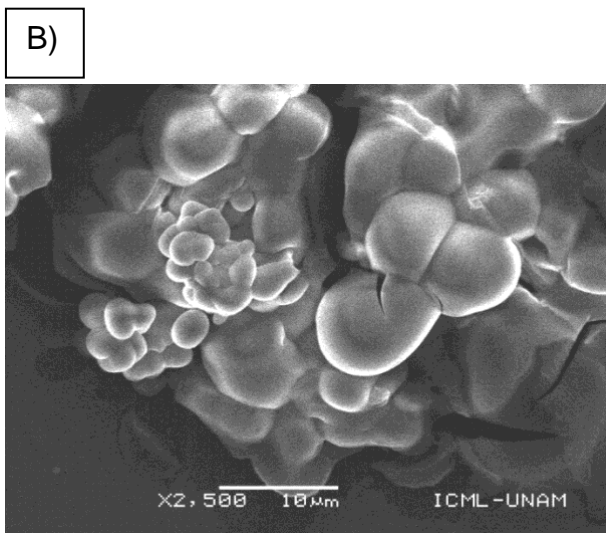
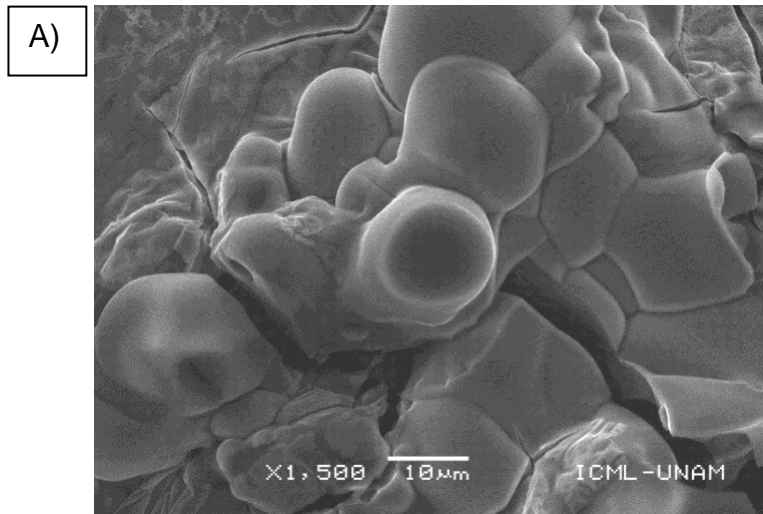
Imágenes del Grupo 4. A) a 300 aumentos, B) a 300 aumentos y C) a 300 aumentos. En las imágenes A) y B) se pueden observar células dismórficas y con aumento de tamaño, que miden aproximadamente 50 micras, en la imagen C) se observan cristales de sal derivados del NaClO.

8.3.5 Grupo 5. Hipoclorito de sodio al 0.5% aplicado por 15 minutos.



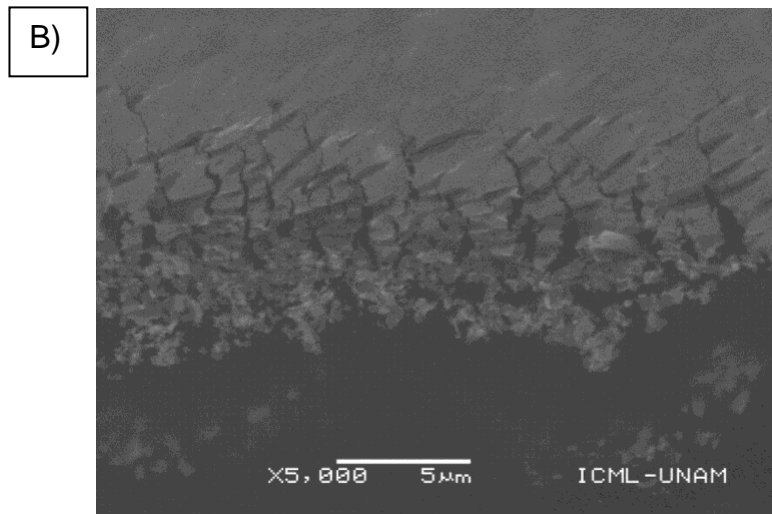
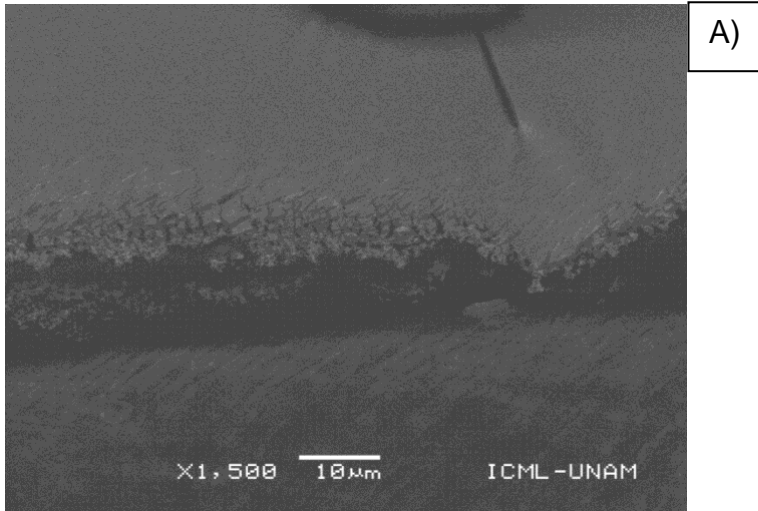
Imágenes del Grupo 5. A) a 300 aumentos, B) a 1500 y C) a 1500 aumentos. En la imagen A) se pueden observar células dismórficas, supercrecidas midiendo aproximadamente 50 micras y la muestra parece estar agrietada, la B) es un aumento para observar las grietas, en la C) se observa un conglomerado dismórfico de células y cristales de sal.

8.3.6 Grupo 6. Hipoclorito de sodio al 0.5% aplicado por 30 minutos.



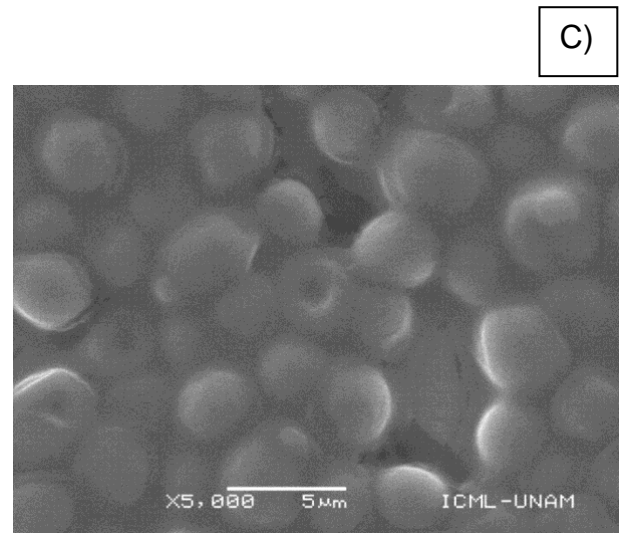
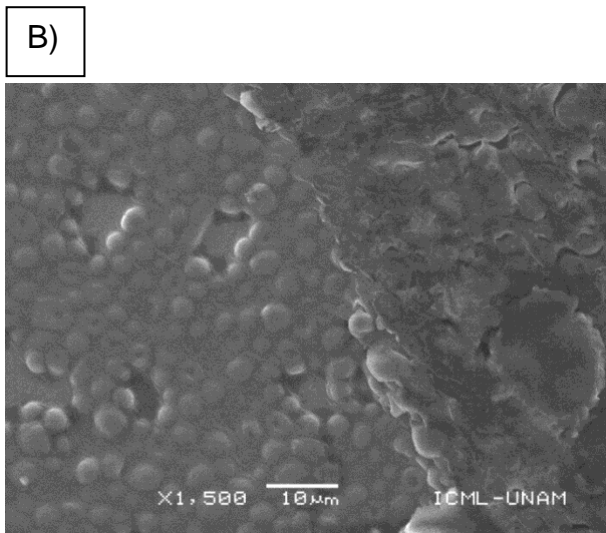
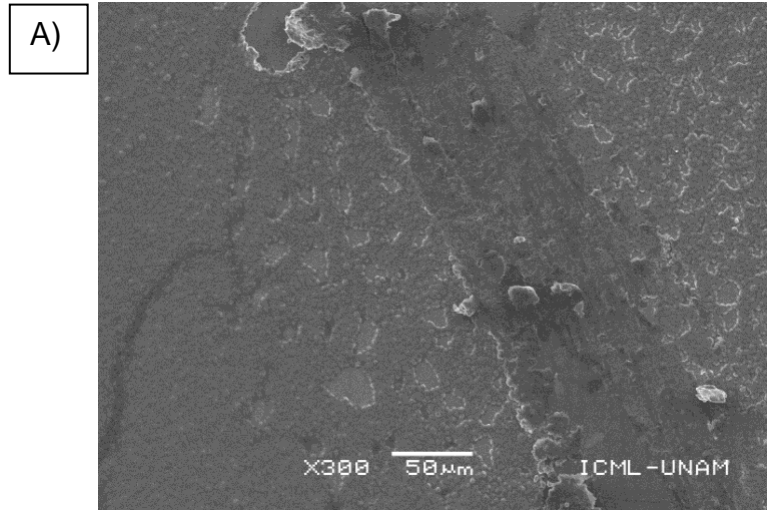
Imágenes del Grupo 6. A) a 1500 aumentos y B) a 2500 En la imagen A) se pueden observar células dismórficas y supercrecidas, además de observar una grieta o separación en la muestra, y en la B) se observa un conglomerado de células dismórficas, unas tienen un tamaño normal y otras están supercrecidas.

8.3.7 Grupo 7. Aceite esencial de eucalipto al 100% aplicado por 30 minutos.



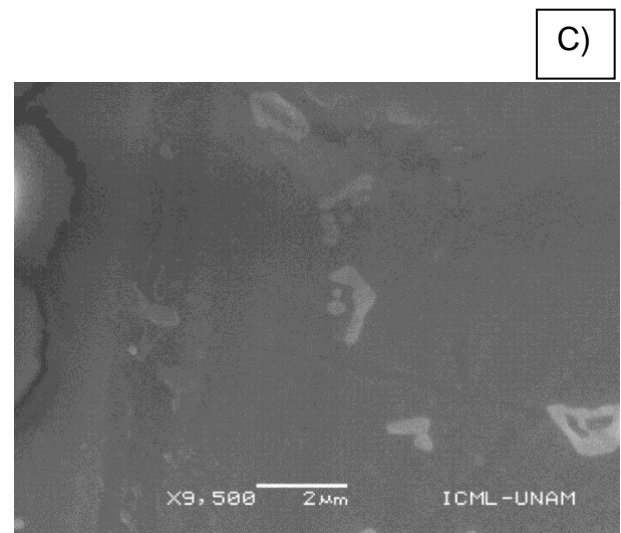
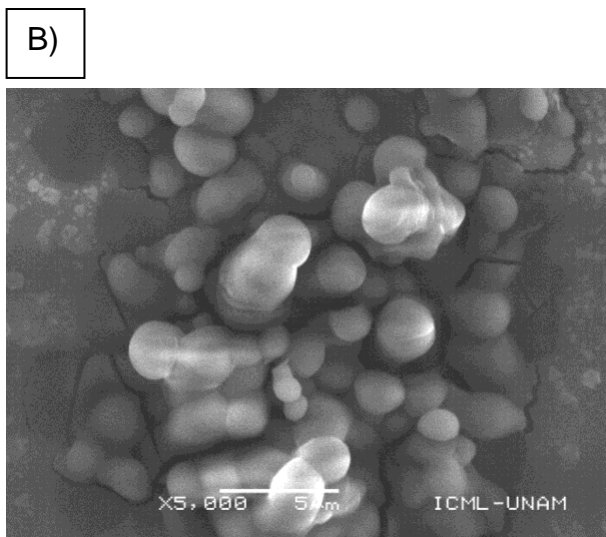
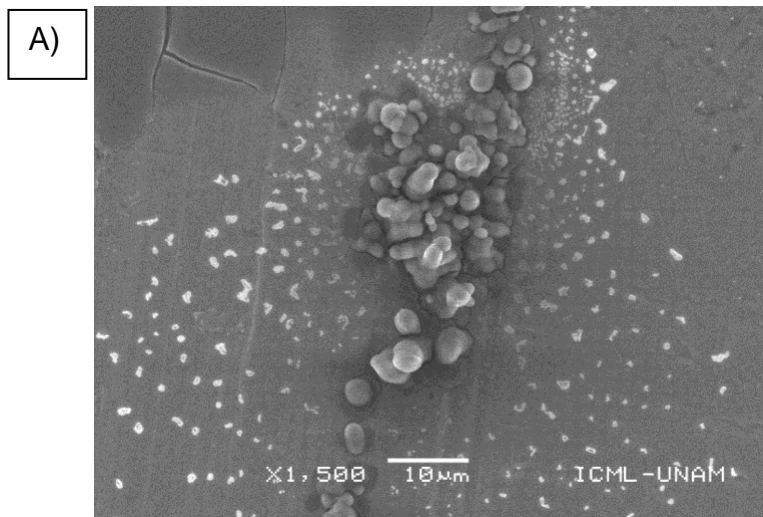
Imágenes del Grupo 7. A) a 1500 aumentos y B) a 5000 En ninguna imagen existen cuerpos celulares, solo se pueden observar grietas que parecen corresponder a los restantes del AEE.

8.3.8 Grupo 8. Aceite esencial de eucalipto al 2% aplicado por 15 minutos.



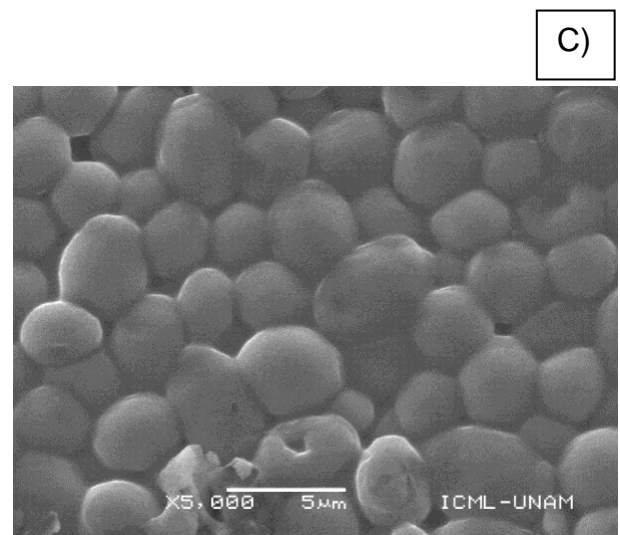
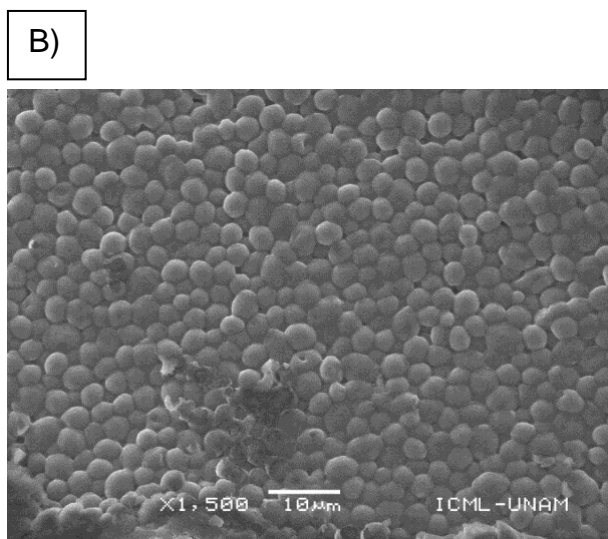
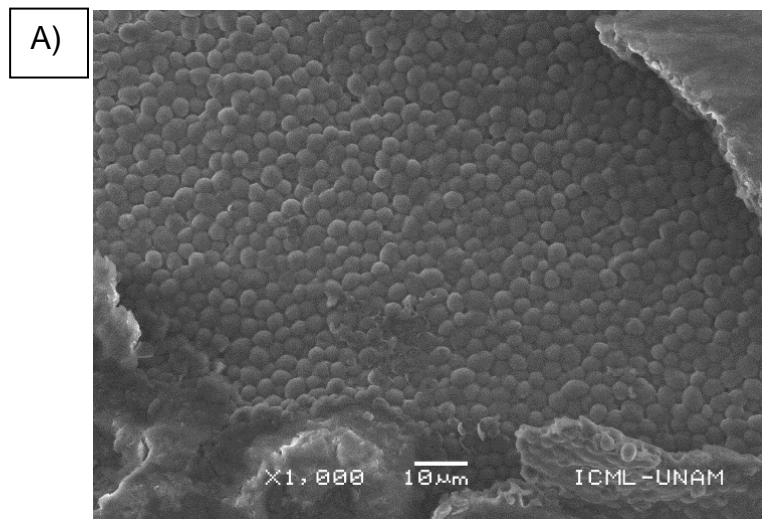
Imágenes del Grupo 8. A) a 300 aumentos, B) a 1500 y C) a 5000. En la imagen A) se puede observar células de tamaño normal y partes donde parece que la muestra se perdió. En las imágenes B) y C) se miran células de tamaño y formas normales, pero también células dismórficas y con un ligero aumento de tamaño.

8.3.9 Grupo 9. Aceite esencial de eucalipto al 2% aplicado por 30 minutos.



Imágenes del Grupo 9. A) a 1500 aumentos, B) a 5000 y C) a 9500. En la imagen A) y B) se puede observar células de tamaño normal y unas pequeñas, en la periferia parece haber restos celulares que son aún más pequeños. En C) se observa aumento de estos restos celulares.

8.3.10 Grupo 10. Solución estandarizada de *Candida albicans* resistente a antimicóticos (control).



Imágenes del Grupo 10. A) a 1000 aumentos, B) a 1500 y C) a 5000. En las tres imágenes podemos observar células de *Candida albicans* sin ningún tratamiento desinfectante, se observan de forma y tamaño normales.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Candida albicans* CON LOS DIFERENTES DESINFECTANTES

Con la información cualitativa que se obtuvo de los cultivos de *Candida albicans* resistente a antimicóticos inhibidos con los diferentes desinfectantes, se realizó la siguiente tabla.

X Mal efecto (creció incontable número de colonias)

✓ Efecto regular (de 1 a 10 colonias)

✓✓✓ Excelente efecto (no existe ninguna colonia)

Tabla 5. Efecto de la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* inhibido con desinfectantes a las 24 horas. Se tomó en cuenta los datos arrojados por 2 de 3 cajas de cultivo.

Desinfectante	Concentración	Tiempo	Efecto
AEE	1%	15'	X
AEE	1%	30'	✓
AEE	2%	15'	X
AEE	2%	30'	✓✓✓
NaClO	0.25%	15'	X
NaClO	0.25%	30'	X
NaClO	0.5%	15'	✓✓✓
NaClO	0.5%	30'	✓✓✓
Clorhexidina	0.06%	15'	✓✓✓
Clorhexidina	0.06%	30'	✓✓✓
Clorhexidina	0.12%	15'	✓✓✓
Clorhexidina	0.12%	30'	✓✓✓

Tabla 6. Efecto de la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* inhibido con desinfectantes a las 48 horas. Se tomó en cuenta los datos arrojados por 2 de 3 cajas de cultivo.

Desinfectante	Concentración	Tiempo	Efecto
AEE	1%	15'	x
AEE	1%	30'	✓
AEE	2%	15'	x
AEE	2%	30'	✓
NaClO	0.25%	15'	x
NaClO	0.25%	30'	x
NaClO	0.5%	15'	✓
NaClO	0.5%	30'	✓✓✓
Clorhexidina	0.06%	15'	✓✓✓
Clorhexidina	0.06%	30'	✓✓✓
Clorhexidina	0.12%	15'	✓✓✓
Clorhexidina	0.12%	30'	✓✓✓

*Existe disminución de la efectividad a las 48 horas

Cuando se comparó el crecimiento de las colonias del grupo control con las cajas de cultivo que tenían desinfectantes, se puede observar que todas las sustancias agregadas, a cualquier concentración y tiempo, tienen un efecto de inhibición del crecimiento de la cepa de *Candida albicans* resistente a antimicóticos, como se mencionó en la hipótesis, no obstante, este efecto puede ser casi nulo o muy bueno.

El AEE arrojó datos que indican que tanto la concentración como el tiempo (2%,30') son variables sumamente importantes para la efectividad ya que entre más elevados se encuentren estos datos, se obtienen los mejores resultados. Además, este desinfectante disminuye su efectividad a las 48 horas, debido a que permitió un mayor crecimiento del cultivo al pasar este tiempo, por lo tanto, se obtiene que a estas concentraciones y tiempos es fungistático.

Por otro lado, a las 24 horas el NaClO demostró dos puntos importantes; el primero es que a concentraciones bajas (0.25%) no tiene buen efecto contra *Candida albicans* resistente a antimicóticos y el segundo, el tiempo no es estrictamente importante, ya que tiene efectos similares a concentraciones de 0.5%, sin importar si se aplica a 15 o 30 minutos. A las 48 horas se ve disminuida la eficacia del NaClO al 0.5% 15 minutos, pero no es muy grande la diferencia que de las 24 horas. Lo anterior demuestra que el NaClO a estas concentraciones y tiempos es fungistático.

Respecto a la clorhexidina evidenció ser el desinfectante con mayor eficiencia, debido a que a las condiciones a las que se utilizó no son relevantes, a las concentraciones y tiempos más bajos (0.06%, 15') obtuvo un excelente efecto de la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* resistente a antimicóticos, así mismo resultó tener un efecto de sustentividad a las 48 horas en este cultivo.

Finalmente, con la información obtenida de cada prueba se determinó que la clorhexidina a las concentraciones de 0.06% y 0.12% es indudablemente el mejor desinfectante utilizado en este estudio, ya que demostró diferentes cualidades como la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* y sustentividad ya que a las 48 horas no permitió el crecimiento de colonias, cumpliéndose así el objetivo general.

RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LOS DIFERENTES DESINFECTANTES SOBRE LA MORFOLOGÍA DE *Candida albicans*, MEDIANTE MEB

Las muestras donde se aplicó clorhexidina y AEE no se alcanzaron a observar con extrema calidad, parece ser que estas sustancias forman una capa densa que no permite enfocar muy bien la imagen. En las concentraciones más altas de estos desinfectantes, 2% y 100% respectivamente, no se lograron ver cuerpos celulares, por lo que se puede decir que estas sustancias son degradantes del material orgánico a estas concentraciones. Aunque el hipoclorito de sodio también alcanza este efecto, a bajas concentraciones (0.5%) puede dar como resultado el

supercrecimiento celular, ya que consiguió aumentar hasta 50 micras algunas células fúngicas.

Todas las sustancias dieron como resultado un grado de dismorfia celular, además de provocar un aumento del tamaño celular. A sus concentraciones más altas, los desinfectantes demostraron degradar el material orgánico, en la muestra AEE al 2% se lograron ver lo que parecen restos celulares, de forma y volumen muy pequeño.

9. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue comparar el efecto antifúngico del aceite esencial de eucalipto, hipoclorito de sodio y clorhexidina contra *Candida albicans* resistente a antimicóticos, lo que demostró que la concentración que brinda un efecto inhibitorio es diferente en cada desinfectante. En el trabajo para titulación de López Castillo S. menciona que la concentración efectiva de AEE contra *C. albicans* es de 1% dejando actuar al aceite durante 5 minutos ³³, sin embargo, esa concentración no tiene efectividad en este estudio, además de observar que los aceites esenciales tienen mejor efecto cuando el tiempo es mayor, se encontró que la concentración óptima de AEE es al 2% aplicándola durante 30 minutos. Por otro lado, Bazán Santracruz y Pérez Lujan evaluaron la actividad antifúngica del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* al 50%, 75% y 100% frente a *Candida albicans* mediante el método microbiológico de difusión en pozo, encontraron que todas las concentraciones tuvieron efecto antifúngico y la mayor concentración obtuvo mejores resultados ³⁴, no obstante, en las pruebas realizadas en este trabajo se demostró que no es necesario utilizar concentraciones tan grandes de AE, por lo que resulta sobrado aplicar tales condiciones.

En un ensayo de susceptibilidad *in vitro* de Castillo Saucedo y colaboradores, sometieron a prueba diferentes concentraciones de NaClO (0.062%, 0.125%, 0.25% y 0.5%), donde indicaron que todas tuvieron un efecto inhibitorio del crecimiento de *Candida albicans* aislada de prótesis dentales. Las concentraciones lograron un

halo de inhibición en los cultivos, la concentración más baja tuvo un halo de 13 mm mientras que la más alta obtuvo un halo promedio de 27 mm. Por el contrario, en este estudio la concentración de 0.25% no fue eficaz para inhibir el crecimiento de *C. albicans*, esto puede deberse al método de cultivo que se empleó, sin embargo, la literatura reporta que la concentración efectiva de NaClO para desinfección de prótesis dental es al 0.5% eso coincide con los resultados obtenidos en esta investigación.³⁴

En otro estudio Ucar Barroeta y otros, utilizaron NaClO al 2% durante 5 minutos para la desinfección de PMMA, lo que dio un resultado efectivo contra el crecimiento de *Candida albicans*.⁵, otro punto es que W. Rudd y otros, señalan que la inmersión de prótesis totales libres de metal en una solución de NaClO al 5.25% durante 5 minutos da como resultado la esterilización de la misma y que no hay cambios físicos visibles ya que probaron que al sumergir una prótesis total durante 15 horas en una solución de NaClO sin diluir no es posible notar cambios físicos aparentes por lo que argumentan que su método es efectivo y no causa daños a los materiales protésicos.³⁶ Estos estudios invitan a utilizar NaClO a altas concentraciones, reportando que no habrá efectos adversos, no obstante, los resultados eficaces descritos en este trabajo proporcionan efectividad aplicándolo al 0.5, con lo que podemos indicar que no es necesario aplicar este desinfectante a altas concentraciones y con esto generar daño a las prótesis y/o daños a la salud del paciente por irritación o intoxicación.

Finalmente, en diferentes investigaciones se ha reportado el uso de clorhexidina al 0.2%, 0.5% y al 2% como cantidades efectivas que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos^{5,37}, sin embargo, en este estudio se demostró que una concentración aún más baja de clorhexidina (0.06%) es altamente efectiva contra *Candida albicans* resistente a antimicóticos, se concluye, al igual que los desinfectantes anteriores, que no es necesario el uso de concentraciones más altas.

Las concentraciones efectivas para inhibir el crecimiento de *Candida albicans*, reportadas en la literatura, son concentraciones elevadas en comparación con las reportadas en este estudio, dando como resultado un desperdicio de las sustancias

por lo que se propone disminuir las concentraciones y aumentar el tiempo de acción de estas, logrando así efectos similares a las concentraciones más altas.

10. CONCLUSIÓN

Los diferentes desinfectantes utilizados en esta investigación demuestran ser efectivos al inhibir el crecimiento de una cepa de *Candida albicans* resistente a antimicóticos; siempre que se utilicen concentraciones y, principalmente, se mantenga en solución el tiempo suficiente para obtener el efecto antimicótico.

Además, nuestros datos proporcionan información valiosa sobre el posible mecanismo de acción que tienen los agentes desinfectantes para evitar el desarrollo del microorganismo.

Finalmente, esta investigación establece diversas opciones para el control del desarrollo de *Candida albicans* y da pauta para su posible aplicación en el área clínica, así como la posibilidad de plantear en el futuro, un plan de control para evitar el desarrollo de la estomatitis protésica.

11. REFERENCIAS

1. Detección de Especies de *Candida* en Pacientes con Estomatitis Sub-Protésica. Acta Odontol Venez [Internet]. 2001 [citado el 11 de septiembre de 2023];39(3):32–44. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652001000300006
2. López López J, Jané Salas E, Chimenos Küstner E, Roselló Llabrés X. Actualización de la candidiasis oral. Arch Odonto Estomatol [Internet]. 1997 [citado el 11 de septiembre de 2023]; Disponible en: <https://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/158138>
3. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. Annu Rev Microbiol [Internet]. 2015;69(1):71–92. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
4. Pardi G. “Determinantes de Patogenicidad de *Candida albicans*”: (Revisión Bibliográfica). Acta Odontol Venez [Internet]. 2002 [citado el 11 de septiembre de 2023];40(2):185–92. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652002000200016
5. Ucar Barroeta A, Rojas de Méndez G, Ballester Lelis A. Acción de agentes químicos en la eliminación de *Candida albicans* sobre prótesis dentales. Acta Odontol Venez [Internet]. 2007 [citado el 11 de septiembre de 2023];45(2):172–7. Disponible en: <https://biblat.unam.mx/es/revista/acta-odontologica-venezolana/articulo/accion-de-agentes-quimicos-en-la-eliminacion-de-candida-albicans-sobre-protesis-dentales>
6. Lee Muñoz X, Cajas Cajas N, Gómez Carranza L, Vergara Núñez C, Ivankovic Silva M, Astorga Bustamante E. Ocurrencia de levaduras del género *Candida* y estomatitis protésica antes y después del tratamiento rehabilitador basado en prótesis removible. Rev clín periodoncia implantol rehabil oral [Internet]. 2015 [citado el 11 de septiembre de 2023];8(1):31–7.

- Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0719-01072015000100005&script=sci_arttext
7. Valenzuela-Ramos MR, Gonzales-Aedo NO, Huamán-Espinoza GR, Chacaltana-Limaco RD, Campos-Coronado CD, Canales-Sermeño GU. Factores asociados al nivel de conocimiento de la población sobre el uso, cuidado e higiene en pacientes portadores de Prótesis Dentales Removibles. *Av Odontoestomatol* [Internet]. 2022 [citado el 11 de septiembre de 2023];38(4):137–42. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852022000400002
 8. De F, Humana M, Gil De B, Cruz L, Alejandro O. UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO [Internet]. Edu.pe. [citado el 11 de septiembre de 2023]. Disponible en: https://repositorio.upao.edu.pe/bitstream/20.500.12759/8081/1/REP_ESTO_OSCAR.GIL_NIVEL.CONOCIMIENTO.HIGIENE.ORAL.PACIENTES.PR%3%93TESIS.DENTALES.REMOVIBLES.ATENDIDOS.CENTRO.ODONTOL%3%93GICO.UPAO.2019.pdf
 9. Escobal L, Jessenia J. EFICACIA DE LOS DESINFECTANTES ORALES PARA PROTESIS DENTALES EN EL CENTRO ODONTOLOGICO VIDA, HUANUCO – 2019. 2021 [citado el 11 de septiembre de 2023]; Disponible en: https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UDHR_ca6bcddd2323fa46d7e_dfa0eedcb3719/Details
 10. Cova Bustamante O, Paredes Troncos LG, Piscoya de Zebrauskas AP, Rojas Leandro KC, Henckell Sime CL del C. ANTISÉPTICOS ORALES: CLORHEXIDINA, FLÚOR Y TRICLOSÁN. *Salud & Vida Sipanense* [Internet]. 2020 [citado el 11 de septiembre de 2023];7(1):4–16. Disponible en: <https://revistas.uss.edu.pe/index.php/SVS/article/view/1280>
 11. Dolatabadi S, Salari Z, Mahboubi M. Antifungal effects of *Ziziphora tenuior*, *Lavandula angustifolia*, *Cuminum cyminum* essential oils against clinical isolates of *Candida albicans* from women suffering from vulvovaginal

- candidiasis. Infectio [Internet]. 2019 [citado el 19 de octubre de 2023];23(3):222. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-93922019000300222&script=sci_abstract&tlng=es
12. Salazar E, Inés G. | Micología General CATALOGACIÓN EN LA PUBLICACIÓN [Internet]. Edu.co. [citado el 11 de septiembre de 2023]. Disponible en: https://repositorio.ucm.edu.co/jspui/bitstream/10839/2654/1/Micologia_general.pdf
13. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. Microbes Infect [Internet]. 2016 [citado el 11 de septiembre de 2023];18(5):310–21. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26806384/>
14. Merino Guzmán G, Cedillo Ramírez L, Silva Andrade F, Muñoz García AA, Castañeda Roldán EI. Análisis morfológico de biopelículas de *Candida albicans* producidas en diferentes condiciones de pH y temperatura analizadas por microscopía óptica y de fuerza atómica. Rev Mex Micol [Internet]. 2011 [citado el 19 de octubre de 2023];33:1–8. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802011000100002
15. Cárdenas-Bahena Á, Sánchez-García S, Tinajero-Morales C, Manuel González-Rodríguez V, Baires-Várguez L. Hipoclorito de sodio en irrigación de conductos radiculares: Sondeo de opinión y concentración en productos comerciales [Internet]. Medigraphic.com. [citado el 11 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/odon/uo-2012/uo124d.pdf>
16. Fórmula: NO. HOJA DE SEGURIDAD XXII HIPOCLORITO DE SODIO [Internet]. Unam.mx. [citado el 11 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://quimica.unam.mx/wp-content/uploads/2016/12/22hipocloritona.pdf>

17. Vázquez Lizama G, Ramos Pazos N, Yefi Carrasco R. Desinfectantes convencionales y alternativas sobre el desarrollo de *Candida albicans*: Efecto *in vitro*. revTECHNO [Internet]. 2023;13(3):1–12. Disponible en: <https://journals.eagora.org/revTECHNO/article/download/4807/3111>
18. Aguado Pérez B. Efectividad de antisépticos en la eliminación de biopelículas polimicrobianas. Universidad de Granada; 2017. [citado el 11 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=125413#:~:text=Hipoclorito%20s%C3%B3dico%20al%202%2C5,cetrimida%20al%200%2C2%25>.
19. Maya JJ, Ruiz SJ, Pacheco R, Valderrama SL, Villegas MV. Papel de la clorhexidina en la prevención de las infecciones asociadas a la atención en salud. Infectio [Internet]. 2011;15(2):98–107. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0123939211707494>
20. Bascones A, Morante S. Antisépticos orales: Revisión de la literatura y perspectiva actual. Av Periodoncia Implantol Oral [Internet]. 2006 [citado el 12 de septiembre de 2023];18(1):21–9. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852006000100004
21. Escamilla Gallegos O. Valoración biológica del aceite esencial de *Eucalyptus tereticornis* para su aplicación odontológica. Universidad Autónoma de Nuevo León; 2018. [citado el 11 de septiembre de 2023]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/18347/>
22. Borio AB. Determinación del pH de diferentes presentaciones comerciales de clorhexidina utilizadas en la terapia endodóntica [Internet]. Edu.ar. [citado el 11 de septiembre de 2023]. Disponible en: <http://www.fodonto.uncuyo.edu.ar/upload/investigacion-11.pdf>
23. Pomacóndor-Hernández C. Papel de la clorhexidina en la odontología restauradora. Odontol Sanmarquina [Internet]. 2014 [citado el 11 de septiembre de 2023];13(2):46. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/odont/article/view/28>

24. Nolzco Cama D, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú., Villanueva-Quejia E, Hatta Sakoda B, Tellez Monzon L, Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú., et al. Extracción y caracterización química del aceite esencial de Eucalipto obtenido por microondas y ultrasonido. *Rev Investig Altoandinas - J High Andean Res* [Internet]. 2020 [citado el 11 de septiembre de 2023];22(3):274–84. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2313-29572020000300274&script=sci_arttext
25. López-De Ávila LM, Castaño-Peláez HI, Mejía-Gómez CE. EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Salvia officinalis* L. SOBRE MICROORGANISMOS PATÓGENOS TRANSMITIDOS POR ALIMENTOS. *Actual Biol* [Internet]. 2013 [citado el 12 de septiembre de 2023];35(98):77–83. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-35842013000100007
26. Brochot A, Guilbot A, Haddioui L, Roques C. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *Microbiologyopen* [Internet]. 2017;6(4):e00459. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/mbo3.459>
27. Jordán N, Israel J. Evaluación de tres insecticidas naturales a base de aceites esenciales de: eucalipto, menta y canela para el control de hormigas en las colmenas de abejas de la empresa Ambamiel. Escuela Superior Politécnica de Chimboraz.[Internet]2022. [citado el 11 de septiembre de 2023]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/18129>
28. Martínez A, Profesor A, Martínez M. UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA [Internet]. *Med-informatica.com*. [citado el 11 de septiembre de 2023]. Disponible en: https://www.med-informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf
29. Moreno J, López G, Siche R. Modeling and optimization of extraction process of eucalyptus essential oil (*Eucalyptus globulus*). *Sci Agropecu* [Internet].

- 2010 [citado el 11 de septiembre de 2023];1(2):147–54. Disponible en: <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/27>
30. Quispe G, Palomino G. Efecto insecticida del aceite esencial de eucalipto y altamisa contra el kcona kcona del cultivo de la quinua. Rev Ciencia Agraria [Internet]. 2022 [citado el 11 de septiembre de 2023];1(2):17–28. Disponible en: <https://cienciaagraria.com/index.php/rca/article/view/7>
31. Montero-Recalde M, Morocho-Núñez MJ, Avilés-Esquivel D, Carrasco-Cando Á, Erazo-Gutierrez R. Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus spp*) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus*. Rev Investig Vet Perú [Internet]. 2019 [citado el 11 de septiembre de 2023];30(2):932–8. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1609-91172019000200042&script=sci_arttext&tlng=en
32. 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 [Internet].2021 [citado el 12 de septiembre de 2023]. Disponible en: https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/QR5KY935X16GRJRCRNB6N7VRHUNC6BJNQ36QJN7GJHH92BGAQG-18609?func=full-set-set&set_number=688121&set_entry=000008&format=999
33. López Castillo S. Eficacia del aceite esencial de *Eucalyptus globulus* en la inhibición de crecimiento de *Candida albicans* sobre superficies de polimetilmetacrilato. Unam.mx. [citado el 22 de septiembre de 2023]. Disponible en: https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/SJXPXA5IMJ7SUINA6CXCH329P3MFK49DLQXGNU8U7MLFGR4SRK-36068?func=full-set-set&set_number=058263&set_entry=000001&format=999
34. Bazan Santacruz E, Pérez Luján CC. Actividad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Eucalyptus globulus* (eucalipto) frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *in vitro*. Universidad María Auxiliadora; 2022. [citado

el 22 de septiembre de 2023]. Disponible en:
<https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/6522381>

35. Castillo Saucedo DM, Tello Zavala MC, Sánchez Vargas LO, Gómez Gutiérrez MB, Nava-Zárate N, Aranda-Romo S. Susceptibilidad in vitro de *Candida albicans* y no *albicans* Aisladas de Prótesis Dentales de Pacientes con Estomatitis Protésica a Tres Sustancias de Desinfección. *Int J Odontostomatol* [Internet]. 2015 [citado el 22 de septiembre de 2023];9(3):373–7. Disponible en:
https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2015000300004
36. Rudd RW, Senia ES, McCleskey FK, Adams ED Jr. Sterilization of complete dentures with sodium hypochlorite. *J Prosthet Dent* [Internet]. 1984 [citado el 22 de septiembre de 2023];51(3):318–21. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6584598/>
37. Álvarez-Chupillón HA, Portocarrero-Mondragón JP, Pardo-Aldave K. Comparación de la actividad antifúngica in vitro del gluconato de clorhexidina 2% e hipoclorito de sodio 5,25% contra *Candida albicans*. *Av Odontoestomatol* [Internet]. 2022 [citado el 22 de septiembre de 2023];38(2):85–9. Disponible en:
https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0213-12852022000200007