



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

PROPIEDADES ANTIMICÓTICAS Y MECÁNICAS DE  
POLIMETILMETACRILATO TRATADO CON ACEITE  
ESENCIAL DE *Mentha spp.*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**C I R U J A N O   D E N T I S T A**

P R E S E N T A:

ARMANDO JUÁREZ GARRIDO

TUTOR: Dr. ENRIQUE ROMO ARÉVALO

ASESOR: Mtra. JUANA PAULINA RAMÍREZ ORTEGA

ASESOR: Mtro. MIKADO ALEJANDRO NIDOME CAMPOS



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, hermana y abuelos...***

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Enrique Romo Arévalo, por brindarme la oportunidad de trabajar con él, brindarme su atención y tiempo, pero, sobre todo, creer en mí.

A la Mtra. Paulina Ramírez Ortega, por darme la oportunidad de trabajar con ella, y dedicarme su tiempo y atención.

Al Mtro. Mikado Alejandro Nidome Campos, por apoyarme a crecer profesionalmente, creer y confiar en mí.

Al Esp. Federico Torres Terán, por ayudarme durante este proceso de adquisición de nuevos conocimientos.

Al T.P.D Ricardo Rodríguez Arredondo por brindarme su apoyo.

A la Mtra. Laura Elena Gómez Lizárraga del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por su apoyo con el Servicio Académico de Microscopia Electrónica de Barrido (SAMEB).

Al Laboratorio de Biología Periodontal de la Facultad de Odontología por otorgarme la oportunidad de trabajar en las instalaciones y proporcionarme del material necesario.

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

## **DEDICATORIAS**

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

A mi madre Marina Garrido Álvarez por ser la luz en mi camino y tenerme un amor incondicional.

A mi padre Armando Hermelo Juárez Nieto por su apoyo absoluto.

A mi hermana Diana Laura Juárez Garrido por ser mi guía y mi apoyo.

A mis abuelos que siempre han creído en mí.

A mis amigos y compañeros que me apoyan a superarme.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
1. MARCO TEÓRICO .....	7
1.1 <i>Candida spp.</i> .....	7
1.2 <i>Candida albicans</i> .....	8
1.3 PATOGENICIDAD .....	9
1.4 BIOPELÍCULAS.....	10
1.5 CANDIDIASIS ORAL.....	11
1.6 ESTOMATITIS PROTÉSICA .....	12
1.7 POLIMETILMETACRILATO (PMMA).....	14
1.8 TRATAMIENTO.....	15
1.9 RESISTENCIA A LOS ANTIMICÓTICOS .....	16
1.10 ACEITES ESENCIALES.....	17
1.11 ACEITE ESENCIAL DE <i>Mentha spp.</i> .....	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPÓTESIS .....	21
5. OBJETIVOS .....	21
5.1 GENERAL .....	21
5.2 ESPECÍFICOS .....	21
6. MATERIALES.....	22

6.1 RECURSOS MATERIALES PARA LA OBTENCIÓN MUESTRAS DE PMMA .....	22
6.2 RECURSOS MATERIALES PARA EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS.....	23
6.3 RECURSOS MATERIALES PARA LA REAZILACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTANDARIZADA .....	23
6.4 RECURSOS MATERIALES PARA PRUEBAS DE INHIBICIÓN MICÓTICA.....	24
6.5 RECURSOS MATERIALES PARA LA FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ACRÍLICO .....	24
6.6 RECURSOS MATERIALES MICROSCOPIA.....	24
6.7 RECURSOS MATERIALES PARA PRUEBAS DE FLEXIÓN Y MÓDULO DE ELASTICIDAD .....	25
7. METODOLOGÍA.....	26
7.1 ELABORACIÓN DE COPIAS EN NEGATIVO DE DISCOS Y LÁMINAS .....	26
7.2 ELABORACIÓN DE DISCOS Y LÁMINAS DE POLIMETILMETACRILATO .....	26
7.3 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Mentha spp.</i> .....	27
7.4 ELABORACIÓN DE CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE <i>Mentha spp</i> .....	28
7.5 PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN ESTANDARIZADA DE <i>Candida albicans</i> RESISTENTE A ANTIMICÓTICOS .....	29
7.6 PRUEBAS DE INHIBICIÓN SOBRE <i>Candida albicans</i> RESISTENTE A LOS ANTIMICÓTICOS.....	31
7.7 FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS DE POLIMETILMETACRILATO .....	31

7.8 ANÁLISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO .....	32
7.9 PRUEBAS DE RESISTENCIA A LA FLEXIÓN Y MÓDULO DE ELASTICIDAD.....	33
8. RESULTADOS .....	36
8.1 DISCOS Y LÁMINAS DE POLIMETILMETACRILATO .....	36
8.2 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Mentha spp</i> .....	37
8.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO .....	38
8.4 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE <i>Candida albicans</i> RESISTENTE A LOS ANTIMICÓTICOS.....	39
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	63
9.1 CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS .....	63
9.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE MÓDULO DE ELASTICIDAD Y RESISTENCIA A LA FLEXIÓN.....	64
10. DISCUSIÓN.....	66
11. CONCLUSIÓN .....	69
12. REFERENCIAS .....	70



## RESUMEN

La candidiasis oral es una infección micótica causada principalmente por *Candida albicans*; una levadura oportunista que pertenece a la microbiota oral normal del ser humano. Dicha enfermedad afecta generalmente a personas inmunocomprometidas, niños y adultos mayores.

Una de las formas más comunes que presenta esta infección es la estomatitis protésica, que afecta principalmente a portadores de prótesis dental removible. Su etiología se relaciona con alteraciones en el estado inmune, propiedades de adhesión a superficies abióticas de los microorganismos y las características microscópicas del polimetilmetacrilato (PMMA), que es el principal material de elaboración de dichas prótesis. Esta problemática, compromete la salud del paciente, la funcionalidad del tratamiento protésico y su vida útil. Por lo tanto, es necesario investigar alternativas profilácticas efectivas, que eviten la colonización de microorganismos al PMMA, sin alterar sus propiedades mecánicas.

El presente estudio fue diseñado para analizar si la aplicación de aceite esencial de *Mentha spp* sobre muestras de PMMA inhibe la adhesión de una cepa de *Candida albicans* resistente a antimicóticos, y determinar si la aplicación del aceite modifica la resistencia y flexibilidad del PMMA.

La metodología consistió en extraer mediante hidrodestilación el aceite esencial de *Mentha spp*. Se realizaron soluciones con distintas concentraciones de aceite esencial (2%, 4%, 8% y 100%) y soluciones control (agua desionizada y Fluconazol a 100 µg/ml), en estas soluciones se sumergieron las muestras de PMMA durante 8 horas. Posteriormente estas muestras se colocaron en un cultivo de *Candida albicans* resistente a antimicóticos (OD 0.8 a 600 nm) y se incubaron durante 24 horas a 37°C en agitación. Se cuantificaron las células adheridas al PMMA mediante microscopía electrónica de barrido.

Para determinar si el aceite esencial de *Mentha spp* afecta las propiedades mecánicas del PMMA, se realizaron pruebas de resistencia a la flexión de tres puntos hasta la fractura, siguiendo la norma ISO 20795-1:2013.

Los resultados demuestran que todas las concentraciones de aceite esencial de *Mentha spp* inhiben la adhesión de la cepa resistente de *Candida albicans* al PMMA. Por el contrario, las muestras incubadas en agua y fluconazol fueron colonizadas por el microorganismo. Las imágenes de microscopia demostraron que el aceite no modifica la superficie del acrílico, mientras que las pruebas mecánicas indican que únicamente, la concentración del 100% de aceite esencial de *Mentha spp* afecta la resistencia a la flexión del PMMA.

Nuestros resultados nos permiten concluir que el aceite esencial de *Mentha spp* puede ser en un tratamiento alternativo efectivo, para prevenir y controlar la colonización por *Candida albicans* al PMMA.

Palabras clave: *Candida albicans*, polimetilmetacrilato, estomatitis protésica, aceite esencial, *Mentha spp*.

## ABSTRACT

The oral candidiasis is a fungal infection caused mainly by *Candida albicans*; an opportunistic yeast that belongs to the normal human oral microbiota. This disease generally affects immunocompromised people, children and elderly.

One of the most common forms of this infection is the prosthetic stomatitis, which mainly affects removable dental prosthesis wearers. Its etiology is related to alterations in the immune system, adhesion properties of microorganisms to abiotic surfaces and the microscopic characteristics of polymethylmethacrylate (PMMA), which is the main material used to manufacture these prostheses.

This problem compromises the patient's health, the functionality of the prosthetic treatment and its useful life. Therefore, it is necessary to investigate effective prophylactic alternatives to avoid the colonization of microorganisms to PMMA, without altering its mechanical properties.

The present study was designed to analyze whether the application of *Mentha spp.* essential oil on PMMA samples inhibits the adhesion of a strain of *Candida albicans* resistant to antifungal agents, and to determine whether the application of the essential oil modifies the strength and flexibility of the PMMA.

Our methodology consisted of extracting essential oil from menta leaves by hydrodistillation. Experimental solutions were made with different concentrations of essential oil (2%, 4%, 8% and 100%) and control solutions (deionized water and Fluconazole at 100 µg/ml); in these solutions, PMMA samples were immersed for 8 hours. The PMMA samples were then placed in an antifungal-resistant *Candida albicans* culture (OD 0.8 at 600 nm) and incubated for 24 hours at 37°C under agitation. Cells adhered to PMMA were quantified by scanning electron microscopy.

To determine whether *Mentha spp* essential oil affects the mechanical properties of PMMA, three-point bending strength tests to fracture were performed following the ISO 20795-1:2013 standard.

The results show that all concentrations of *Mentha spp* essential oil inhibit the adhesion of the resistant strain of *Candida albicans* to PMMA. In contrast, samples incubated in water and fluconazole were colonized by the microorganism. Scanning electron microscopy images showed that the essential oil does not modify the PMMA surface, while mechanical tests indicate that only the 100% *Mentha spp* essential oil concentration affects the *flexural strength of PMMA property*.

We conclude that *Mentha spp.* essential oil can be an alternative treatment applied on PMMA to prevent the colonization of *Candida albicans* to PMMA.

Key words: *Candida albicans*, polymethylmethacrylate, prosthetic stomatitis, essential oil, *Mentha spp.*

## INTRODUCCIÓN

El polimetilmetacrilato (PMMA) es un polímero termoplástico, que es usado como el material de elección para la fabricación de prótesis dental removible parcial y total. Características microscópicas del PMMA como rugosidades y las porosidades superficiales actúan como reservorio de microorganismos (principalmente levaduras), esto aunado a la higiene deficiente de la mucosa y prótesis, la utilización de materiales abrasivos para la limpieza que pueden provocar reservorios microscópicos que favorecen a la acumulación de microorganismos y permiten el establecimiento de biopelículas sobre el PMMA, contribuyen a cambios inflamatorios en la mucosa que soporta a la prótesis y que derivan en el desarrollo de la estomatitis protésica.<sup>1</sup>

Esta es una enfermedad relacionada principalmente con la levadura *Candida albicans* que genera este problema de salud, recurrente para personas portadoras de prótesis dental.<sup>1</sup>

Las levaduras del género *Candida spp* son hongos dimórficos, es decir que tiene principalmente dos formas de crecimiento, estas son: la levadura y la hifa (el crecimiento dependerá del entorno donde se desarrolle). Una de las especies más comunes, es *Candida albicans*, ya que esta se ha aislado en más del 80% de las lesiones bucales asociadas con hongos.<sup>2,3</sup>

Esta levadura se encuentra entre las especies más prevalentes de la microbiota humana, y a su vez tiene la capacidad de colonizar de manera asintomática a individuos no inmunocomprometidos. Las principales zonas del cuerpo donde se encuentra son, el tracto gastrointestinal, desde la cavidad oral hasta el recto, la mucosa vaginal y la piel. El impacto médico-odontológico de *Candida albicans* depende de la capacidad que tiene de formar biopelículas, que son comunidades estrechas de microorganismos unidas por exopolisacáridos que se adhieren a las superficies naturales o artificiales, como lo pueden ser las prótesis.<sup>2</sup>

Los factores locales que predisponen la formación de una infección por *Candida albicans*, son la utilización de prótesis dental removible, inhaladores con corticoesteroides y xerostomía. Mientras que los factores sistémicos incluyen los estados de inmunosupresión, estos como resultado a diversas enfermedades, por ejemplo, el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), leucemia, desnutrición, edad, alteraciones endocrinas como diabetes, tratamientos de quimioterapia, radioterapia y el uso de corticoesteroides sistémicos.<sup>2,3</sup>

La candidiasis puede disminuir la calidad de vida, no siempre es posible eliminar el agente causal, y no suele ser suficiente con una buena higiene, por lo que se opta por utilizar antimicóticos tópicos y/o sistémicos para su tratamiento. Si bien existe una variedad de fármacos, la mayoría de las veces se tienen que usar en altas concentraciones, lo que causa efectos secundarios como náuseas, vómitos dolor abdominal y fatiga. Esto aunado a que se ha incrementado la resistencia a los antimicóticos asociados a *Candida albicans*, lo que incrementa el costos del tratamiento y deriva en resultados negativos para la salud de los pacientes.<sup>2,3</sup>

Por lo tanto, es urgente el desarrollo de nuevos tratamientos, para las infecciones por *Candida albicans*, principalmente, las ocasionadas por cepa resistentes a los antimicóticos de primera elección. En este sentido, se ha demostrado que algunas plantas aromáticas y sus aceites esenciales poseen propiedades antimicóticas y, potencialmente, pueden usarse como segunda opción de tratamiento. Los aceites esenciales con una amplia gama de compuestos bioactivos y de baja toxicidad pueden ser una opción para el cuidado de la salud oral.<sup>4,5</sup>

Se sabe que la *Mentha spp* en la medicina popular tiene efectos antiinflamatorios, y se usa como tratamiento en problemas digestivos y dermatológicos.<sup>6</sup> De igual manera se ha comprobado que también tiene otras aplicaciones que incluyen actividad antifúngica, antimicrobiana, antioxidante e

insecticida. Su potencial antimicrobiano debe estudiarse ya que podría derivar en el desarrollo de alternativas terapéuticas donde los tratamientos convencionales han dejado de ser efectivos, o como agentes profilácticos efectivos en superficies de prótesis dental a base de PMMA.<sup>6,7</sup>

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 *Candida spp*

*Candida spp* es una levadura, asexual, eucariota, que pertenece al reino Fungi. Pueden tener un metabolismo tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, es decir que son microorganismos anaerobios facultativos. Tiene un ambiente de desarrollo idóneo a una temperatura de 37°C.<sup>7,8</sup>

Existen aproximadamente 150 especies, sin embargo, solo algunas especies pueden tener repercusiones en la salud humana. Las especies de *Candida* más comunes que residen en huéspedes no inmunocomprometidos incluyen *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, y *Candida krusei*. Algunas de estas especies pueden pertenecer a la microbiota oral normal en individuos sanos que tienen presencia en aproximadamente un 45-65% de lactantes sanos y el 30-60% de adultos sanos.<sup>7,8,9</sup>

Si bien la zona del cuerpo más común es la cavidad oral, también pueden encontrarse en otras partes del cuerpo, como la vagina y la piel (mayormente en los pliegues cutáneos como axila, ingle, perineo).<sup>7,8,10</sup>

Sin embargo, existen factores predisponentes que modifican el estado comensal, debido a que este microorganismo engloba un grupo de levaduras de carácter oportunista, que afectan principalmente a personas inmunocomprometidas. Estas levaduras tienen la característica de producir enzimas proteolíticas (aspartil proteasas y fosfolipasas) y de igual manera

producir toxinas (micotoxinas), lo cual le va a conferir una mayor capacidad de invasión y colonización de las células y tejidos del huésped.<sup>3,8,11</sup>

## **1.2 *Candida albicans***

A esta especie se les denominó así debido a las túnicas blancas que utilizaban los candidatos al senado romano (*candidatus*), y el término *albicans* deriva de las palabras *albico/albicatus* que significa “ser blanco”.<sup>9</sup>

*Candida albicans* es una especie de levadura, eucariota, polimórfica, asexual. Es la especie fúngica más prevalente en la microbiota humana, que puede tener un crecimiento en forma de levadura (células de forma ovoide), en forma de pseudohifas (células elipsoidales alargadas que presentan constricciones en los septos), y finalmente un crecimiento en forma de hifas (células alargadas de paredes paralelas).<sup>12</sup>

En personas no inmunocomprometidas, en la mayoría de los casos es de tipo inofensivo, se encuentran en equilibrio con otros microorganismos locales y está presente de manera normal en las superficies mucosas. No obstante, cuando se produce una alteración en la microbiota, cuando el sistema inmune se encuentra deprimido, producto de alguna enfermedad sistémica o la existencia de variaciones en el entorno local, puede dar pauta a que *Candida albicans* tenga un crecimiento mayor, tenga mayor reproducción, y a su vez tenga mayor capacidad de infectar y colonizar dispositivos médico-odontológicos, como prótesis dental removible, válvulas cardíacas y catéteres, que puede ocasionar infecciones sistémicas.<sup>13,14,15</sup>

La especie *Candida albicans* puede repercutir de dos formas: infecciones en las zonas superficiales, como candidiasis oral y candidiasis vaginal, que pueden solo afectar a las mucosas, e infecciones hemáticas o sistémicas que son potencialmente mortales.<sup>12,16</sup>



Para la patogenicidad y virulencia, la morfología del hongo (dimorfismo) es de gran importancia. Se ha propuesto que el cambio en la morfología de la levadura a hifas corresponde a un estado de mayor invasividad , y en forma de levadura tiene una mayor capacidad de diseminación.<sup>12</sup>

### **1.3 PATOGENICIDAD**

La patogenia es multifactorial y depende del estado inmune del huésped, la levadura y los factores modificadores del microambiente oral. Los principales factores que intervienen en la patogenia de *Candida albicans* incluyen la expresión de adhesinas e invasinas expresadas por las levaduras para poder tener una adhesión a superficies o células del huésped, así como su tigmotropismo (capacidad que tiene la levadura de crecimiento sobre una superficie, adquiriendo el mismo patrón) <sup>12,17</sup>

En esta etapa de patogenia, la levadura tiene una autoinducción en cambio de morfología, que corresponde al principal factor de patogenicidad que determina los estados de *Candida albicans* entre ser una levadura en su estado comensal o de carácter patógeno que esta dictada por su versatilidad morfológica.<sup>12,18</sup>

Estos factores son los que le van a conferir una mayor invasión a los tejidos, la evasión de células de la inmunidad, y finalmente la adhesión a superficies o células del huésped, para así formar biopelículas, que son de gran relevancia clínica debido a que esta agrupación se presenta en la mayoría de los casos en pacientes inmunocomprometidos o bajo tratamiento médico.<sup>12,16,19</sup>

## 1.4 BIOPELÍCULAS

Una biopelícula es un grupo de microorganismos que se adhieren a una superficie abiótica o biótica. Estos microorganismos están rodeados por una matriz de exopolisacáridos que tiene propiedades diferentes a la parte flotante. Las biopelículas son el patrón que predomina en muchos microorganismos patógenos.<sup>13,14,20</sup>

Una de las características importantes de estas comunidades de microorganismos, en comparación con los que se encuentran de manera individual, es que este grupo tiene una mayor resistencia a las agresiones químicas y físicas. Las células que se encuentran rodeadas por esta matriz de exopolisacáridos autosecretada que le confiere capacidad de adhesión a superficies sólidas, una mayor protección al estrés ambiental, a las células de la inmunidad del huésped y tratamientos con antimicóticos. Lo que deriva en consecuencias de salud y fracasos en el tratamiento médico y por consiguiente resistencia a los fármacos.<sup>14,19</sup>

*Candida albicans* tiene la capacidad de producir biopelículas altamente estructuradas y está compuesta por múltiples tipos celulares. En virtud de su estructura tridimensional y su complejidad, lo hace aún más resistente, aún a altas concentraciones de antimicóticos.<sup>9,14,19</sup>

La biopelícula producida por *Candida albicans* es una estructura heterogénea, es decir, levaduras, pseudohifas e hifas. Estos microorganismos incluyen una estricta respuesta al estrés, la cual está mediada por proteínas de choque térmico, que evitan daños a la levadura. También debe existir una autoinducción de cambio de forma, debe tener una regulación extracelular del pH y finalmente tener una flexibilidad metabólica.<sup>12</sup>

## 1.5 CANDIDIASIS ORAL

Es una infección oportunista causada por el crecimiento excesivo de las levaduras de *Candida albicans* y su penetración a los tejidos, principalmente a las mucosas. Se presenta mayormente en la infancia, debido al paso del recién nacido por la vagina, y en la vejez, por distintos cambios en la microbiota oral, estado inmune, enfermedades sistémicas, y terapia farmacológica. Esta enfermedad afecta por igual a hombres y mujeres.<sup>21,22</sup>

Tiene distintos sinónimos, entre ellos, muguet, algodoncillo y candidosis oral, sin embargo, el término más utilizado es candidiasis oral. Estos términos son comúnmente relacionados con *Candida albicans*. Los distintos cuadros clínicos están establecidos principalmente por la morfología celular. Relacionando que los cuadros clínicos agudos son característicos y correspondientes a la forma y crecimiento de la levadura, mientras que en los estados crónicos hay mayor predominancia de hifas.<sup>9,21</sup>

Los cuadros clínicos fueron clasificados por Holmstrup y Axell en 1990, esta clasificación las va a dividir según su forma clínica y su evolución, en:<sup>23</sup>

1. Formas agudas:
  - Pseudomembranosa
  - Eritematosa
2. Formas crónicas:
  - Pseudomembranosa
  - Eritematosa
  - Hiperplásica
3. Candidiasis relacionada a otros factores:
  - Queilitis angular
  - Glositis romboidal media
  - Estomatitis protésica

## 1.6 ESTOMATITIS PROTÉSICA

Uno de los primeros recursos de tratamiento que se establece para sustituir los órganos dentales de una persona parcial o totalmente edéntula, son las prótesis dentales removibles, debido al bajo costo, durabilidad, estética y alta tasa de éxito del tratamiento. Sin embargo, la utilización de prótesis genera un conjunto de factores locales que pueden favorecer el crecimiento y posterior infección por *Candida albicans*.<sup>24,25</sup>

La estomatitis protésica consiste en un proceso inflamatorio crónico, multifactorial, que afecta a la mayoría de los portadores de prótesis dental (alrededor del 60 - 70%). Es uno de los tipos más frecuentes de candidiasis oral y es la afectación de las mucosas más común en los adultos mayores inmunocomprometidos.<sup>24,25,26</sup>

Esta establecido que la génesis de esta infección está condicionada a diversos factores, locales y sistémicos. Algunos factores locales incluyen, mala higiene, prótesis mal ajustadas y su uso nocturno, que favorecen el crecimiento y colonización de *Candida albicans*.<sup>25</sup>

A esta infección se suma un elemento más, el material con el que está elaborado la prótesis dental (polimetilmetacrilato), que microscópicamente tiene irregularidades y porosidades, que son imperfecciones que contribuyen a la retención de estos microorganismos. Dadas las propiedades de adhesión que tiene *Candida albicans* a las células y las superficies, le confiere mayores características de invasión, de igual manera *Candida albicans* va a estar favorecida del pH bajo, la temperatura de la cavidad oral y el acceso a los nutrientes, ambiente proporcionado por la misma prótesis dental.<sup>25,27</sup>

La estomatitis protésica es el resultado de la colonización del material protésico, aumento de tamaño de la levadura, la proliferación, y el cambio de

forma, formación de biopelículas, adheridas al material de la prótesis y finalmente la invasión a la mucosa que le da soporte a la prótesis.<sup>25</sup>

Clínicamente la estomatitis protésica se manifiesta con una lesión eritematosa localizada o difusa. Sin embargo, esta infección se clasificó por Newton en tres grados.<sup>28</sup>

- Grado 1: Corresponde a un eritema circunscrito y puntiforme. (Fig. 1A)
- Grado 2: Eritema difuso correspondiente al área de la prótesis dental. (Fig.1B)
- Grado 3: Hiperemia de la mucosa con aspecto nodular. (Fig. 1C)

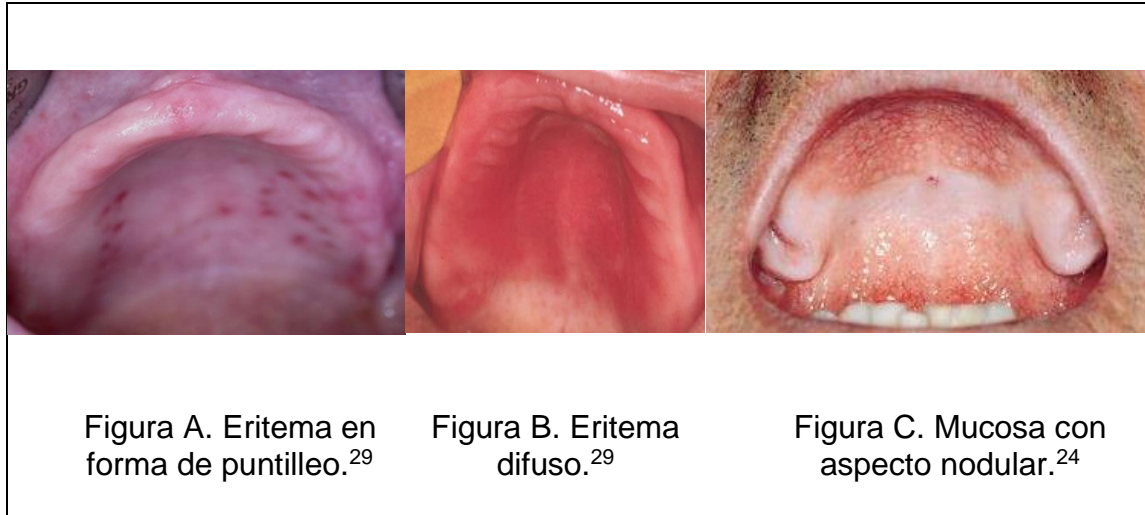


Fig.1 Estomatitis protésica. Clasificación de Newton.

## 1.7 POLIMETILMETACRILATO (PMMA)

El PMMA es un material polimérico rígido, que fue introducido por primera vez por Walter Wright en 1937, y en 1946 se consideró como el material de primera elección para elaboración de prótesis dental, y es el resultado de la polimerización del metacrilato de metilo.<sup>30,31</sup>

Utilizado ampliamente para el tratamiento dental en clínicas de prostodoncia, ortodoncia, cirugía oral y tratamiento a la articulación temporomandibular. El PMMA es un material biocompatible, de fácil manipulación, económico, estético, y de buenas propiedades mecánicas, sin embargo, una gran limitación de este material es que no tiene un efecto antimicrobiano, lo que provoca mayor susceptibilidad a tener distintos padecimientos a los usuarios de prótesis dental.<sup>30,31</sup>

El uso de este material para la fabricación de prótesis dentales proporciona una mayor superficie para la adhesión bacteriana y fúngica, lo que modifica la distribución y función de los microorganismos ya presentes en la cavidad oral, en comparación con personas que no utilizan prótesis que conservan la microbiota normal de un paciente dentado, lo que genera muchos efectos secundarios como inflamación, dolor y ulceración de la mucosa oral.<sup>30</sup>

Los microorganismos colonizan fácilmente el PMMA debido a su características microscópicas, como poros superficiales e irregularidades que son particulares de este material, lo que facilita la adhesión, maduración, y la formación de biopelículas, lo que provoca que la base de la dentadura actúe como sustrato a distintos microorganismos con la capacidad de adherirse a superficies sólidas, tal es el caso de *Candida albicans*.<sup>31,32</sup>

## 1.8 TRATAMIENTO

El tratamiento se basa principalmente en un diagnóstico precoz y oportuno con el reconocimiento de las lesiones causadas por esta infección, la modificación de agentes predisponentes, así como el tratamiento y control de enfermedades sistémicas presentes y una buena elección del fármaco, evaluando el riesgo-beneficio.<sup>34</sup> El manejo de candidiasis oral generalmente es con antimicóticos sistémicos y tópicos que pueden actuar como fungistáticos o fungicidas, las presentaciones tópicas son administradas cuando las lesiones son limitadas, y los antimicóticos sistémicos administrados en lesiones extendidas o en fracasos con tratamientos tópicos.<sup>20,34</sup>

Los principales grupos de fármacos más implementados en infecciones micóticas causada por *Candida albicans* incluyen:

- Polienos: Los principales, Anfotericina B (AmB) y nistatina, que actúan sobre la membrana celular, se une al ergosterol (componente lipídico que le otorga integridad a la membrana celular), forma poros en la membrana, lo que provoca la muerte de los hongos.<sup>33,34</sup>
- Azoles: Algunos ejemplos son el miconazol y ketoconazol (imidazoles) y fluconazol e itraconazol (triazoles) que actúan sobre la membrana celular, inhibe el citocromo P450, encargado de la síntesis de ergosterol, lo que da como resultado un daño en la membrana.<sup>34</sup>
- Pirimidinas: La flucitosina, actúa sobre el núcleo del hongo, que interfiere en la síntesis de ADN, lo que evita su correcta síntesis y replicación.<sup>34</sup>
- Equinocandinas (uso exclusivo intravenoso): Como caspofungina y micafungina, que actúan sobre la pared celular, inhibe la síntesis de glucano, lo que provoca la lisis del hongo, son administradas para candidiasis sistémicas.<sup>34</sup>

## 1.9 RESISTENCIA A LOS ANTIMICÓTICOS

El aumento de la resistencia a los antimicrobianos ha ido en aumento durante los últimos años, lo que ha dado como resultado que los tratamientos farmacológicos tengan una mayor tasa de fracaso, hace más complejo el manejo de infecciones y enfermedades sobre todo en pacientes inmunocomprometidos donde las infecciones suelen tener un carácter más agresivo y pueden resultar fatales.<sup>35</sup>

La resistencia a los antimicóticos es un cambio a la sensibilidad y susceptibilidad a estos fármacos, ocurre cuando un microorganismo patógeno es inhibido con altas concentraciones del agente antimicótico y no con las concentraciones generalmente implementadas, o simplemente el fracaso de este tratamiento.<sup>35,36</sup>

Está establecido que esta condición es de carácter multifactorial, donde intervienen el uso indiscriminado de los antimicóticos, el estado de salud del paciente, debido a que el antimicótico en la mayoría de los casos trabaja en conjunto con las defensas del huésped, los estados de inmunosupresión tales como pacientes oncológicos, VIH, pacientes trasplantados y enfermedades autoinmunes, aumentan la probabilidad de fracaso del tratamiento. Otro factor que intervienen son las características propias del patógeno, *Candida albicans*, que tiene una gran capacidad de adhesión a células y superficies, formando biopelículas, que le otorga defensa aun a altas concentraciones de antimicóticos, además tiene la capacidad de modificar la enzima encargada de la síntesis de ergosterol, enzima diana del antifúngico y cuenta con sistemas de bombeo, que expulsan el fármaco.<sup>36,37</sup>

A esto se le incluye una alta toxicidad para los tejidos y órganos del huésped, que provoca efectos secundarios y sus elevados costos de esta terapia farmacológica, lo que ha orillado a la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento, que superen la efectividad farmacológica y sean accesibles.<sup>20</sup>



## 1.10 ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales o aceites volátiles son sustancias hidrofóbicas, constituidos por una mezcla de compuestos orgánicos, volátiles y bioactivos que se caracterizan por un olor y sabor fuerte. Producidas por aproximadamente 17,500 especies de plantas y surgidas del metabolismo secundario de las mismas. Son sintetizados por todos los órganos de las plantas (hojas tallos, ramas, corteza, etc.) y son almacenados en células secretoras y glándulas.<sup>38,39,40</sup>

Los principales compuestos de los aceites esenciales son terpenoides, que incluyen isoprenos (hidrocarburo de 5 carbonos), monoterpenos (hidrocarburo de 10 carbonos) y sesquiterpenos (hidrocarburo de 15 carbonos). También presentan hidrocarburos alifáticos, ácidos, alcoholes, aldehídos, ésteres, nitrógeno y azufre que le confiere propiedades de defensa a las plantas, debido a que son tóxicos a algunos depredadores y microorganismos.<sup>41,42</sup>

El aceite esencial puede obtenerse de distintas formas, de las cuales la principal, es mediante destilación por arrastre de vapor o hidrodestilación, con el uso del aparato Clevenger implementado por primera vez en 1928, otras formas incluyen, destilación seca, prensado mecánico, fermentación y trituración.<sup>40</sup>

Algunos de los usos más comunes de los aceites esenciales se han enfocado en perfumería o condimentos alimenticios, sin embargo, en la medicina popular también se han implementado debido a sus propiedades biológicas, que incluyen cualidades antimicrobianas, antimicóticas, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias y analgésicas.<sup>40,42</sup>

El mecanismo de acción de los aceites esenciales no está del todo claro de acuerdo con su complejidad, sin embargo, está estrechamente relacionado con un efecto sinérgico de sus componentes, primordialmente terpenoides que

son compuestos liposolubles y solventes orgánicos, que interfieren en los procesos fisiológicos y bioquímicos de la multiplicación y desarrollo de los microorganismos, afectando la actividad enzimática de la membrana celular, lo que causa un daño irreversible en la pared y membrana, provocando la exposición del material intracelular de estos microorganismos, lo que conduce a una fuga de proteínas y ácidos nucleicos (ADN y ARN) y finalmente la lisis de hongos y bacterias principalmente.<sup>43,44</sup>

### **1.11 ACEITE ESENCIAL DE *Mentha spp***

La Organización Mundial de la Salud ha señalado que el estado de salud de la mayoría de la población mundial depende de la medicina tradicional, como atención médica primaria. La utilización de la herbolaria ha sido por muchos años la primera elección como tratamiento de distintas enfermedades. La menta, es una hierba perenne (“que dura mucho”), miembro de la familia *Lamiaceae*. La cual está representado por aproximadamente 30 especies, cultivadas en áreas templadas de todo el mundo. Es una especie de difícil identificación debido a su plasticidad morfológica y variabilidad genética.<sup>45</sup>

*Mentha spp* es una de las hierbas con usos desde la antigüedad, conocidas por sus características medicinales y aromáticas. Implementada en distintas afecciones debido a sus características antiinflamatorias, carminativas (“que favorece la expulsión de gases”), antieméticas, diaforéticas, antiespasmódicas, analgésicas y anticatarrales, destacando sus propiedades antivirales, antibacterianas y antifúngicas.<sup>45</sup>

El mecanismo de acción del aceite esencial de *Mentha spp* ha sido establecido por ser hidrofóbico y lipofílico, principal característica de los terpenoides, propiedades que desestabilizan la membrana, que deriva como en una mayor permeabilidad en la membrana celular, lo que resulta en un tratamiento

efectivo contra distintos microorganismos de importancia médica, uno de ellos *Candida albicans* que a pesar de sus métodos de protección y la formación de biopelículas para evadir los mecanismos de defensa y tratamientos farmacológicos, ha demostrado eficacia. <sup>43,44,45,46</sup>

Por lo tanto, tomando en cuenta los antecedentes, los estudios realizados anteriormente y la eficacia médica, se implementó el aceite esencial de *Mentha spp*, en busca de un tratamiento alternativo para pacientes portadores de prótesis dentales, parciales o totales, enfocándonos en disminuir la colonización y desarrollo de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos, sin que este modifique las propiedades mecánicas del polimetilmetacrilato, el principal material de elaboración de las prótesis dentales.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La estomatitis protésica es una infección micótica multifactorial, que afecta a la mayoría de los portadores de prótesis dental y compromete la salud del paciente, la funcionalidad y el tiempo de vida útil de la prótesis.

*Candida albicans* tiene una gran capacidad de adhesión y formación de biopelículas en estructuras abióticas, lo que complica el éxito de un tratamiento con antimicóticos, adicionando que la arquitectura del polimetilmetacrilato tiene irregularidades y porosidades a nivel microscópico, que le proporciona un ambiente idóneo para su colonización y desarrollo.

Esto ha convertido a esta infección en un gran desafío terapéutico, que involucra distintos retos médicos y odontológicos para encontrar alternativas de tratamiento, por lo que es de interés de esta investigación exponer los efectos antimicóticos del aceite esencial de *Mentha spp* aplicado sobre el principal material del que están hechas las prótesis dentales removibles.

## 3. JUSTIFICACIÓN

El fracaso de los tratamientos con fármacos convencionales y el aumento a la resistencia antimicótica ha obligado a la búsqueda de nuevas alternativas para controlar infecciones causadas por *Candida albicans*, lo que ha implicado la utilización de distintos recursos. El aceite esencial que consideramos como alternativa de tratamiento, es el aceite esencial de *Mentha spp*, ya que ha demostrado tener un efecto inhibitorio, aún en especies resistentes a los antimicóticos.

Nuestros resultados pudieran ser de importancia y derivar en nuevas alternativas de tratamientos naturales, para evitar el desarrollo y colonización de estos microorganismos en dispositivos y materiales médicos y odontológicos, sin alterar sus propiedades físicas y mecánicas.

## 4. HIPOTESIS

La aplicación de aceite esencial de *Mentha spp* sobre polimetilmetacrilato inhibe la adhesión de *Candida albicans*, lo que da un efecto profiláctico a las prótesis dentales.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 GENERAL

1. Determinar si es aceite esencial de *Mentha spp* inhibe la adhesión de una cepa de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos, aplicado en polimetilmetacrilato, sin afectar sus propiedades mecánicas.

### 5.2 ESPECÍFICOS

1. Obtener mediante hidrodestilación el aceite esencial a partir de hojas frescas de *Mentha spp*.
2. Elaborar discos de polimetilmetacrilato termopolimerizable por horno de microondas, de 10 mm de diámetro y 0.5 mm de grosor.
3. Elaborar soluciones con distintas concentraciones de aceite esencial de *Mentha spp* (2%, 4%, 8%, 100%) y dos grupos control (H<sub>2</sub>O destilada y Fluconazol 100µg/ml).
4. Realizar las pruebas de inhibición de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos en discos de polimetilmetacrilato.
5. Analizar la morfología de las levaduras mediante microscopia electrónica de barrido.
6. Cuantificar el efecto inhibitorio obtenido a partir de las imágenes obtenidas por el microscopio electrónico de barrido.

7. Elaborar placas de polimetilmetacrilato termopolimerizable por horno de microondas, 64 mm de largo,  $10 \pm 0.2$  mm de ancho y  $3.3 \pm 0.2$  mm de grosor.
8. Determinar si las diferentes soluciones de estudio modifican la resistencia mecánica del polimetilmetacrilato mediante pruebas de resistencia a la flexión y módulo de elasticidad.

## **6. MATERIALES**

### **6.1 RECURSOS MATERIALES PARA LA OBTENCIÓN MUESTRAS DE PMMA**

- Muflas para microondas, no metálicas, TECNOFLASK®.
- Yeso tipo III.
- Separador yeso acrílico IVOCLAR VIVADENT® Lot. X44363.
- Silicón por condensación, específico para laboratorio, ZETALABOR®.
- Patrones en cera correspondientes a cada prueba, discos de 10 mm de diámetro y 0.5 mm de grosor; placas de 64 mm de largo, 10 mm de ancho y 3.3 mm de grosor.
- Acrílico termopolimerizable OPTI-CRYL® VR1 Lot. TR 420322.
- Prensa para muflas.
- Horno de microondas con una potencia mínima de 800 watts y máxima de 1300 watts, con cronómetro programable en minutos y plato giratorio.
- Limpiador ultrasónico VWR® 97043-988.

## **6.2 RECURSOS MATERIALES PARA EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS**

- Muestra de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos proporcionada por el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).
- Ultra congelador (-80 °C).
- Autoclave.
- Matraz Erlenmeyer de 500 ml.
- Medio de cultivo estéril Dextrosa Sabouraud BD DIFCO™ Lot. 8155577.
- Tubos Falcon de 50 ml.
- Campana de flujo laminar AIR SCIENCE™.
- Micropipeta con capacidad de 1000 µl.
- Incubadora microbiológica orbital con control de temperatura MRC® TU-400.

## **6.3 RECURSOS MATERIALES PARA LA ELABORACIÓN DE LA SOLUCIÓN ESTANDARIZADA**

- Tubos Falcon de 50 ml.
- Centrifugadora. KENDRO LABORATORY PRODUCTS. MULTIFUGE 3 S-R.
- Medio de cultivo estéril Dextrosa Sabouraud.
- Espectrofotómetro de luz visible y UV. THERMO SCIENTIFIC® GENESYS 150.
- Vortex. THERMO SCIENTIFIC® M37615.
- Celdas para espectrofotómetro de 1cm de paso óptico.

#### **6.4 RECURSOS MATERIALES PARA PRUEBAS DE INHIBICIÓN MICÓTICA**

- Campana de flujo laminar AIR SCIENCE™.
- Solución estandarizada de *Candida albicans*.
- Frascos de vidrio autoclavables.
- Aceite esencial de *Mentha spp.*
- Discos de PMMA de 10mm de diámetro.
- Micropipeta con capacidad de 1000 µl.
- Pinzas estériles.
- Incubadora orbital con control de temperatura MRC® TU-400.
- Fluconazol (F8929 Sigma Aldrich)

#### **6.5 RECURSOS MATERIALES PARA LA FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ACRÍLICO**

- Placa de cultivo celular de 24 pocillos.
- Medio de cultivo estéril Dextrosa Sabouraud BD DIFCO™ Lot. 8155577.
- Etanol al 100%.
- Micropipeta con capacidad de 1000 µl.
- Pastillero con 7 celdas.
- Deshumidificador. (DRY HOME)

#### **6.6 RECURSOS MATERIALES MICROSCOPIA**

- Ionizadora JEOL JFC-1100.
- Porta muestras de aluminio para microscopio electrónico de barrido.
- Cinta de carbono.
- Holders para montaje de muestras.
- Microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6360LV.



## **6.7 RECURSOS MATERIALES PARA PRUEBAS DE FLEXIÓN Y MODULO DE ELASTICIDAD**

- Concentraciones de aceite esencial de *Mentha spp* al 2%, 4%, 8%, 100%.
- Grupos control H<sub>2</sub>O y Fluconazol 100µg/ml.
- Incubadora orbital con control de temperatura MRC® TU-400.
- Placas de acrílico OPTI-CRYL® VR1 Lot. TR 420322.
- Vernier calibrado en milímetros (mm).
- Sistema de ensayo universal INSTRON 5567 ID 5567P7728.

## **7. METODOLOGÍA**

### **7.1 ELABORACIÓN DE COPIAS EN NEGATIVO DE DISCOS Y LÁMINAS**

Se elaboraron patrones en cera de forma circular de 10 mm de diámetro y 0.5 mm de grosor, de igual manera se elaboraron patrones en cera en forma rectangular siguiendo las medidas 64 mm de largo,  $10 \pm 0.2$  mm de ancho y  $3.3 \pm 0.2$  mm de grosor.

La parte interna de la mufla se aisló con petrolato (vaselina), esto para evitar que el yeso tenga una adhesión a la misma. Posteriormente en la base de la mufla se colocó yeso tipo III, y se colocaron los patrones en cera, dejando fraguar el yeso, aproximadamente 1 hora. Una vez fraguado, con el silicón por condensación ZETALABOR®, se adoso a la superficie cubriendo la parte expuesta de la cera, haciendo así una copia en negativo de cada una de las estructuras. Se aplicó vaselina al yeso ya fraguado, se colocó la contramufla y conjuntamente se pusieron los tornillos de fijación, se le vertió yeso tipo III. Se dejó fraguar por 2 horas, para finalmente separar las muflas y retirar la cera, con los patrones ya replicados, se limpió para eliminar residuos de yeso y silicón.

### **7.2 ELABORACIÓN DE DISCOS Y LÁMINAS CON POLIMETILMETACRILATO**

Obtenidos los moldes, se procedió con la elaboración de las copias en positivo, con acrílico OPTI.CRYL® Lot. TR420322 termopolimerizable, por horno de microondas.

De acuerdo con la ficha técnica y a las indicaciones del fabricante se elaboró una mezcla con proporciones 3:1, polímero-monómero, en un recipiente cerámico con tapa, para evitar la inclusión de aire en la mezcla.

Se procedió a mezclar el acrílico en forma de cruz durante 30 segundos para poder incorporar todas las partículas del polímero con el monómero y que se evite la generación de aire, se tapa el recipiente y se espera a que llegue a la fase plástica para poder manipularla, una vez que el acrílico está en la etapa plástica se colocó sobre los patrones y se procedió a prensar la mufla con una presión de 2000 psi para quitar los excedentes del acrílico y que se obtengan las muestras con material uniforme.

Se colocaron los tornillos de fijación y la mufla fue llevada al horno de microondas, para tener una cocción por 4 minutos a una potencia de 1000 – 1100 watts (80% de la potencia máxima). Posteriormente se retiró del horno de microondas y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar en agua a una temperatura de 23°C durante 15 minutos. Con la mufla y las muestras frías se continuó a abrir las muflas y obtener las muestras de acrílico. Cada una de las muestras se recortó con discos de carburo y la eliminación de bordes se realizó con piedras rosas, cada corte se realizó con irrigación.

Los discos y láminas fueron limpiados por baño ultrasónico (VWR® 97043-988), para eliminar contaminantes visibles presentes en la superficie acrílica. Los discos se esterilizaron por autoclave para su posterior uso en las pruebas de inhibición microbiológica.

### **7.3 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Mentha spp***

El procedimiento por seguir, para la extracción del aceite esencial a partir de hojas de menta es la hidrodestilación, que consiste en la colecta de 600 gramos de biomasa (hojas frescas de *Mentha spp*) las cuales se lavaron previamente con agua bidestilada para eliminar contaminantes.

A continuación, los 600 gramos de biomasa fueron llevados a un matraz de Kitasato con 300 ml de agua desionizada y con un mechero bunsen, fue llevada a ebullición durante 45 minutos.

El aceite esencial es arrastrado junto con el vapor generado durante la ebullición, el cual se dirige a un condensador de vidrio, con serpentín refrigerado con agua a 4 °C que tendrá la función de enfriar la mezcla de agua-aceite y la conduce a una bureta de separación, que, debido a las densidades de los líquidos, se extrajo por pipeteo.

Finalmente, el aceite se almacenó en tubos Eppendorf de 1.5 ml en un ambiente oscuro para no alterar sus propiedades. Se almacena hasta su uso en las pruebas experimentales.

#### **7.4 ELABORACIÓN DE CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL DE *Mentha spp***

En frascos de vidrio autoclavables se realizaron distintas concentraciones de aceite esencial de *Mentha spp* con agua bidestilada estéril, haciendo una dilución al 2%, 4%, 8% y 100%, respectivamente. Estas soluciones corresponden a los grupos experimentales. También se implementaron dos grupos controles con H<sub>2</sub>O destilada estéril y otro con Fluconazol a 100µg/ml.

En cada una de estas soluciones se sumergieron los discos de polimetilmetacrilato, y se introdujeron en una incubadora microbiológica orbital con control de temperatura, durante 8 horas a 37 °C a 220 rpm.

## 7.5 PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN ESTANDARIZADA DE *Candida albicans* RESISTENTE A ANTIMICÓTICOS

En este trabajo, se implementó una cepa de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos donada por el Área de Investigación en Virología y Micología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

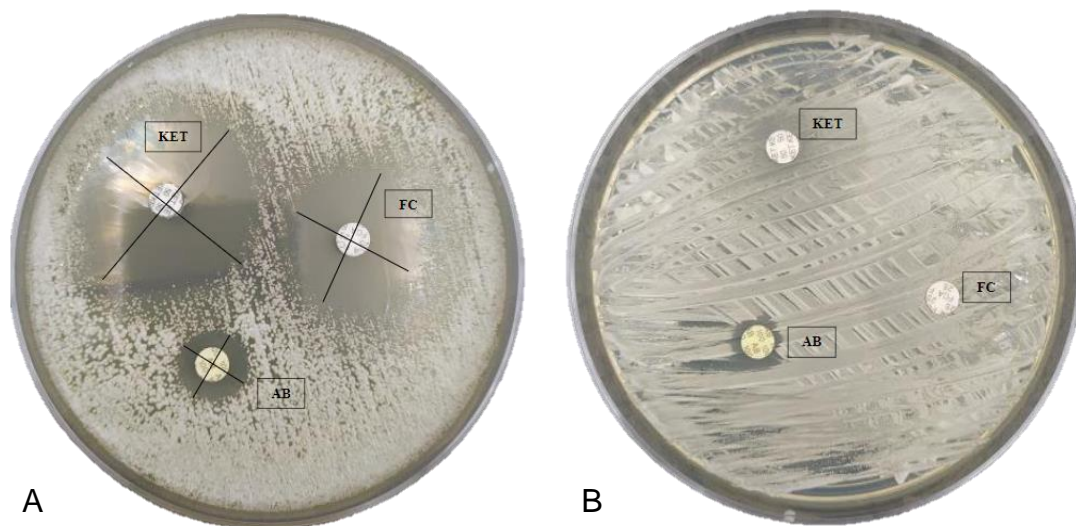


Fig.2 Antibiograma con distintos antimicóticos Ketoconazol (KET) [25 $\mu$ g], Fluconazol (FC) [50 $\mu$ g], Anfotericina B (AB) [100 $\mu$ g]. A. Cepa de *Candida albicans* sensible a antimicóticos, presenta halos de inhibición. B. Cepa de *Candida albicans* resistente a lo antimicóticos, con ausencia de halos de inhibición con KET Y FC, presenta un pequeño halo de inhibición con AB. La cepa resistente a los antimicóticos fue la implementada en este estudio.

(Fotografía tomada de Prado Castillo (El efecto antimicótico del aceite esencial de *Mentha spp* y *Rosmarinus officinalis* en una cepa de *Candida albicans* resistente a antimicóticos / 2021)

El procedimiento se realizó dentro de la campana de flujo laminar (AIR SCIENCE™), el cual nos proporciona un medio estéril, y previene la contaminación de las muestras.

Se elaboró una suspensión de 47µl de cultivo de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos en 6 ml de medio de cultivo estéril Dextrosa Sabouraud (BD DIFCO™ Lot. 8155577). La solución se dejó en una incubadora microbiológica orbital con control de temperatura durante 8 horas a 37 °C y 220 rpm. Concluido el periodo de incubación se procedió a la recolección de la biomasa, mediante centrifugación, a 6500 rpm a 4 °C durante 10 minutos.

Para proceder a realizar nuestra suspensión de trabajo, el espectrofotómetro de luz visible y UV. (THERMO SCIENTIFIC® GENESYS 150) se configuró con una longitud de onda de 600 nm.

En la celda para espectrofotómetro se colocaron 1000 µl de medio estéril Dextrosa Sabouraud, para hacer una lectura blanco, dando como resultado de lectura de una Densidad Óptica de 0 células/ml ( $10^8$ ).

Posteriormente se eliminó el sobrenadante, resultado de la centrifugación. El precipitado celular fue resuspendido con medio estéril Dextrosa Sabouraud (BD DIFCO™ Lot. 8155577) homogenizando la suspensión con un Vortex (THERMO SCIENTIFIC® M37615), hasta ajustar la suspensión a una Densidad Óptica de 0.8 células/ml ( $10^8$ ).

## **7.6 PRUEBAS DE INHIBICIÓN SOBRE *Candida albicans* RESISTENTE A LOS ANTIMICÓTICOS**

Dentro de la campana de flujo laminar (AIR SCIENCE™) se colocaron en seis frascos de vidrio estériles, los discos de polimetilmetacrilato previamente incubados durante 8 horas en distintas soluciones (H<sub>2</sub>O, Fluconazol (100µg/ml), aceite esencial de *Mentha spp* al 2%, 4%, 8% y 100%). Posteriormente con una micropipeta se le vertieron 3 ml de la solución estandarizada a cada uno de los frascos.

Las muestras se introdujeron a una incubadora microbiológica orbital con control de temperatura durante 24 horas a 37 °C a 220 rpm.

## **7.7 FIJACIÓN DE LAS MUESTRAS DE POLIMETILMETACRILATO**

Concluido el tiempo de incubación, (24 horas) fueron fijadas las muestras para su posterior visualización y análisis por microscopía electrónica de barrido. Los discos se retiraron de los frascos de vidrio con pinzas estériles, y se colocaron en una placa de cultivo celular de 24 pocillos, se enjuagó cada uno de los discos, durante 5 minutos con 2000 µl de medio de cultivo estéril Dextrosa Sabouraud (BD DIFCO™ Lot. 8155577), auxiliándonos con una micropipeta con una capacidad de 1000 µl. Transcurrido el tiempo de enjuagado, se procedió a fijar las muestras. Con una micropipeta se colocaron 2000 µl de etanol al 100 %, y se sumergieron los discos durante 5 minutos. Una vez terminado el tiempo de fijación, con pinzas estériles se sacaron los discos y se colocaron en un pastillero con celdas individuales, cada una de ellas con una cama de deshumidificador. Se dejó cerrado herméticamente durante 48 horas, para eliminar cualquier rastro de humedad de las muestras, requisito indispensable para el procesamiento en microscopía electrónica de barrido.

## **7.8 ANALISIS POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO**

Los discos de polimetilmetacrilato del grupos control (H<sub>2</sub>O y Fluconazol 100µg/ml) y los grupos experimentales (concentraciones de aceite esencial de *Mentha spp* 2%, 4%, 8% y 100%) previamente incubados y fijados, fueron llevados al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología que cuenta con el Servicio Académico de Microscopía Electrónica de Barrido (SAMEB).

Las muestras de polimetilmetacrilato se montaron en portamuestras de aluminio y se cubrieron con oro en una Ionizadora (JEOL JFC-1100) para aumentar la conductividad de la muestra, la cual mejora la emisión de electrones secundarios y ayuda a la captación de imágenes de mejor resolución, y análisis de detalles estructurales. Una vez con las muestras cubiertas con oro, se introdujeron al Microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6360LV) con detectores de electrones secundarios y alto vacío. Se observaron las muestras de polimetilmetacrilato a distintos aumentos (100x, 750x, 1500x y 10000x).

Se emplearon estos aumentos para el análisis de la superficie del polimetilmetacrilato y el análisis de la morfología y la cuantificación de levaduras presentes.



## 7.9 PRUEBAS DE RESISTENCIA A LA FLEXIÓN Y MÓDULO DE ELASTICIDAD

En esta prueba de implementaron 36 láminas de acrílico OPTI.CRYL® Lot. TR420322, y se dividieron en seis muestras por cada grupo experimental. Las láminas de polimetilmetacrilato se pulieron con papel de carburo de silicio de diferentes granos (600, 1000, 1200 y 2000), al pulir se empleó irrigación para evitar el sobrecalentamiento de las muestras acrílicas. Esto se realizó para conseguir una superficie uniforme y tersa, respetando las medidas, 64 mm de largo,  $10 \pm 0.2$  mm de ancho y  $3.3 \pm 0.2$  mm de grosor, tal como lo dicta la norma ISO 20795-1:2013.

Las muestras se sumergieron en agua bidestilada durante 42 horas en un sistema hermético, se incubaron a una temperatura de 37 °C y 150 rpm. Posterior a este tiempo se extrajeron del agua bidestilada y se sumergieron en las distintas soluciones, H<sub>2</sub>O, Fluconazol 100µg/ml, correspondientes al grupo control y en concentraciones de aceite esencial de *Mentha spp* al 2%, 4%, 8%, y 100% respectivamente, se almacenaron durante 8 horas a una temperatura de 37 °C a 150 rpm.

Concluido el tiempo de incubación, se retiraron las láminas y se clasificaron, posteriormente con una vernier calibrado en milímetros, se midieron las láminas en tres puntos (dos medidas distales y una medida central), tanto de ancho como de grosor, estas medidas se promediaron y se ingresaron en el Sistema de ensayo universal INSTRON 5567 ID 5567P7728. Que es una máquina que incluye sistemas electromecánicos e hidráulicos para la realización de pruebas estáticas, diseñado para la caracterización de las propiedades mecánicas.

Posteriormente se sometió cada una de las 36 muestras de polimetilmetacrilato a una prueba de tres puntos hasta la fractura, para medir la flexión y el módulo de elasticidad.

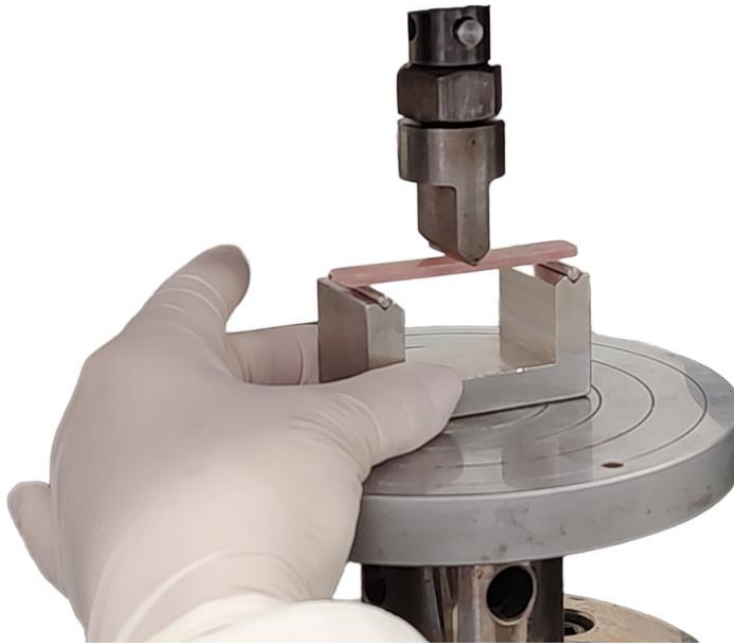


Fig. 3



Fig. 4

Fig. 3 y 4. Colocación y fijación de las muestras de polimetilmetacrilato en el sistema de tres puntos



Fig. 5

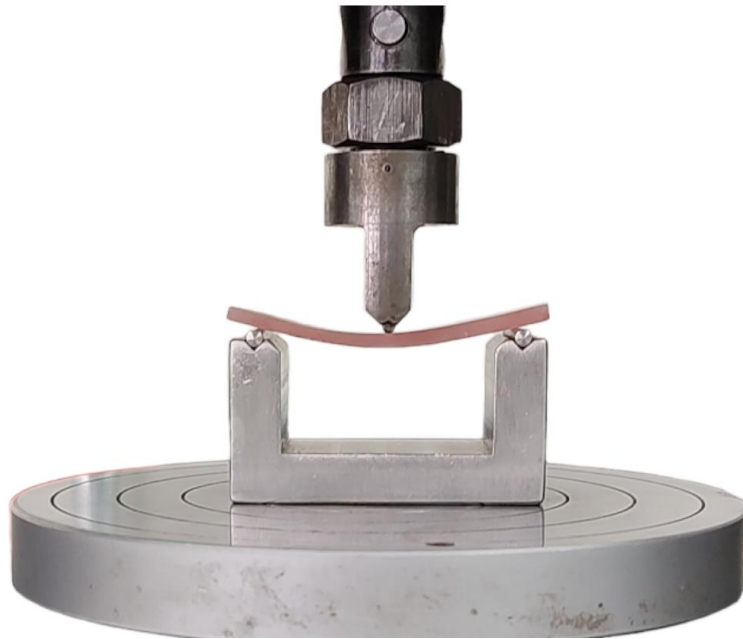


Fig. 6

Fig. 5 y 6. Compresión de las muestras de polimetilmetacrilato hasta su fractura.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 DISCOS Y LÁMINAS DE POLIMETILMETACRILATO

Se obtuvieron discos de polimetilmetacrilato (OPTI-CRYL® VR1 Lot. TR 420322) de medidas de 10 mm de diámetro y 0.5 mm de grosor. Los bordes irregulares y excedentes de acrílico, fueron eliminados y recortados con irrigación para evitar la modificación de sus propiedades.

Se obtuvieron láminas de polimetilmetacrilato (OPTI-CRYL® VR1 Lot. TR 420322) con medias 64 mm de largo,  $10 \pm 0.2$  mm de ancho y  $3.3 \pm 0.2$  mm de grosor. Estas medidas establecidas por la norma ISO 20795-1:2013, que especifica los requisitos para los polímeros para base de dentadura.

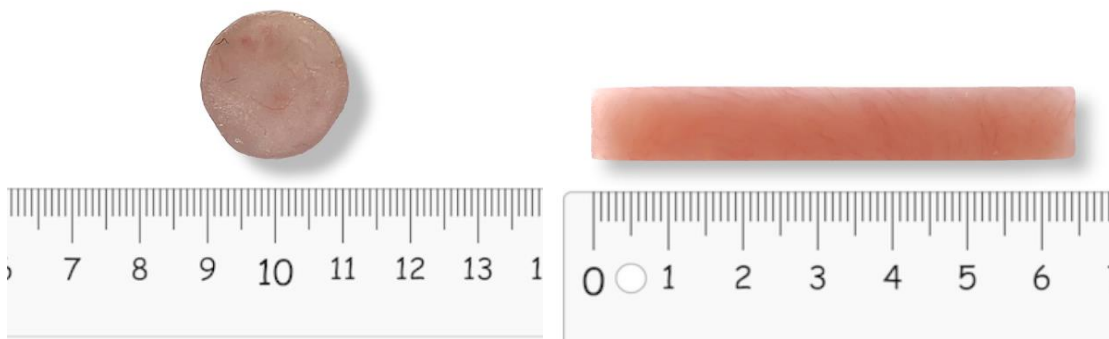


Fig. 7 y 8. Disco de polimetilmetacrilato de 10 mm de diámetro y 5 mm de grosor. Placa de polimetilmetacrilato de 64 mm de largo,  $10 \pm 0.2$  mm de ancho y  $3.3 \pm 0.2$  mm de grosor.

## 8.2 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Mentha spp*

Mediante hidrodestilación o destilación por arrastre de vapor, a partir de 600 gramos de biomasa (hojas de *Mentha spp* limpias) se obtuvieron 1.5 ml de aceite esencial de *Mentha spp*.



Fig. 9. Sistema de hidrodestilación. a) Matraz de Kitasato con hojas de *Mentha spp* y agua desionizada que se llevan a ebullición con un mechero de Bunsen. b) El vapor y el aceite es arrastrado a un condensador donde se enfría la mezcla. c) Agua de enfriamiento que circula por una bomba peristáltica. d) Se obtiene el aceite esencial de *Mentha spp*.

(Fotografía tomada de Prado Castillo (El efecto antimicótico del aceite esencial de *Mentha spp* y *Rosmarinus officinalis* en una cepa de *Candida albicans* resistente a antimicóticos / 2021)

### 8.3 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Se implementaron distintos aumentos (100x, 750x, 1500x y 10000x), para el análisis superficial del polimetilmetacrilato y el análisis y cuantificaciones de los microorganismos presentes. El aumento a 100x nos sirvió para observar la topografía característica del PMMA que corresponde a glóbulos de aproximadamente 5 a 50 micras, la cual permanece sin modificaciones en los grupos control y los grupos experimentales. A mayores aumentos, podemos observar en los grupos controles (H<sub>2</sub>O y Fluconazol), la presencia de microorganismos, correspondientes a levaduras e hifas de *Candida albicans*. Sin embargo, en los grupos experimentales destaca la ausencia de microorganismos adheridos a superficies lisas ni rugosas, determinando la eficacia del aceite esencial de *Mentha spp* sobre *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

Se cuantificaron los microorganismo presentes en los grupos control utilizando el aumento a 750x.

## 8.4 PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS DE *Candida albicans* RESISTENTE A LOS ANTIMICÓTICOS

### POLIMETILMETACRILATO INCUBADO EN H<sub>2</sub>O (GRUPO CONTROL)

Los discos de PMMA se incubaron en agua bidestilada estéril durante 8 horas y posteriormente se incubaron en la solución estandarizada con la cepa de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

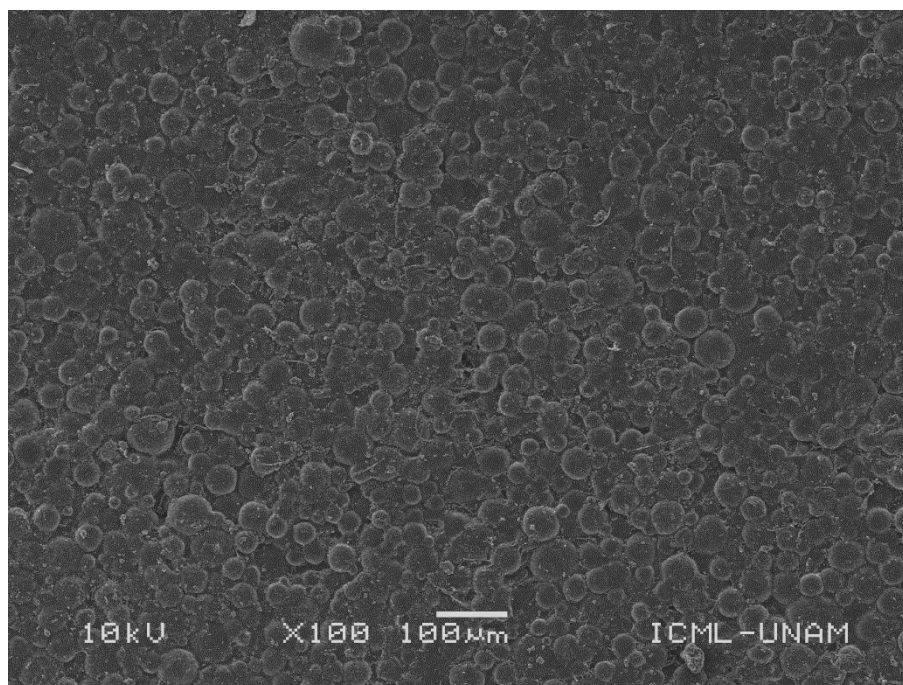


Fig. 10. Microfotografía a un aumento de 100x de polimetilmetacrilato en agua bidestilada estéril durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos. Se observa una topografía de tipo empedrado, correspondientes a glóbulos que van de 5 a 50 micras.

Observación después de 24 horas de incubación.

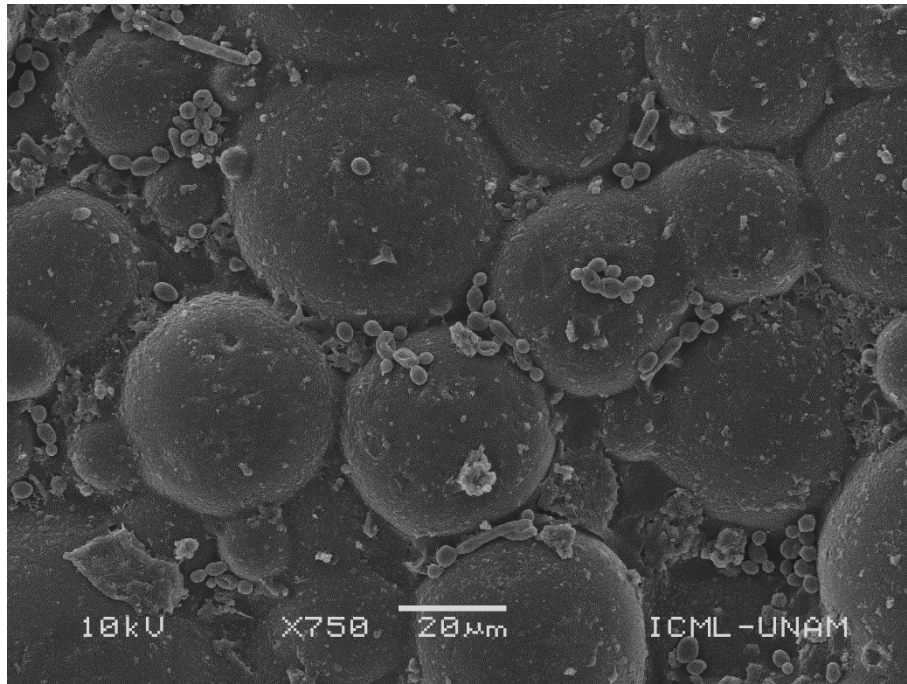


Fig. 11

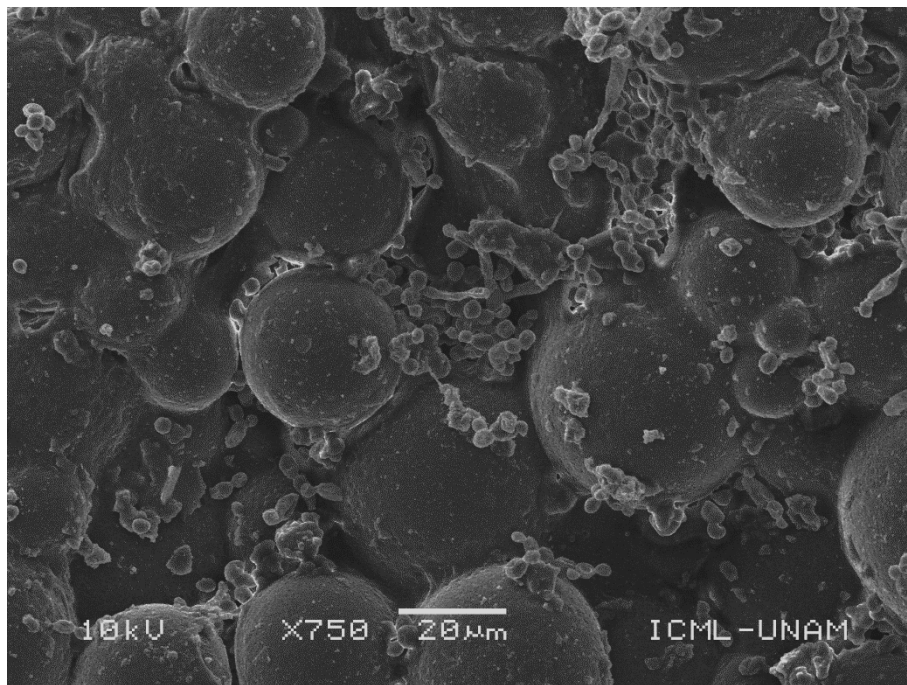


Fig.12



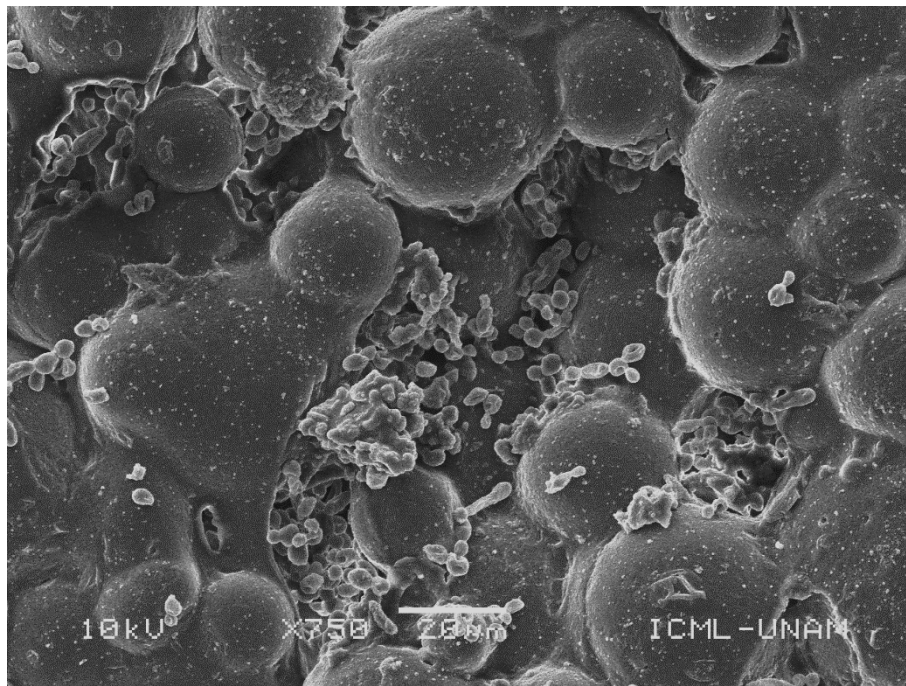


Fig. 13

Fig. 11, 12 y 13. Microfotografías a un aumento de 750x de polimetilmetacrilato en agua bidestilada estéril durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos. Se observa presencia de levaduras e hifas de un tamaño aproximado de 3 a 8 micras.

Observación después de 24 horas de incubación.

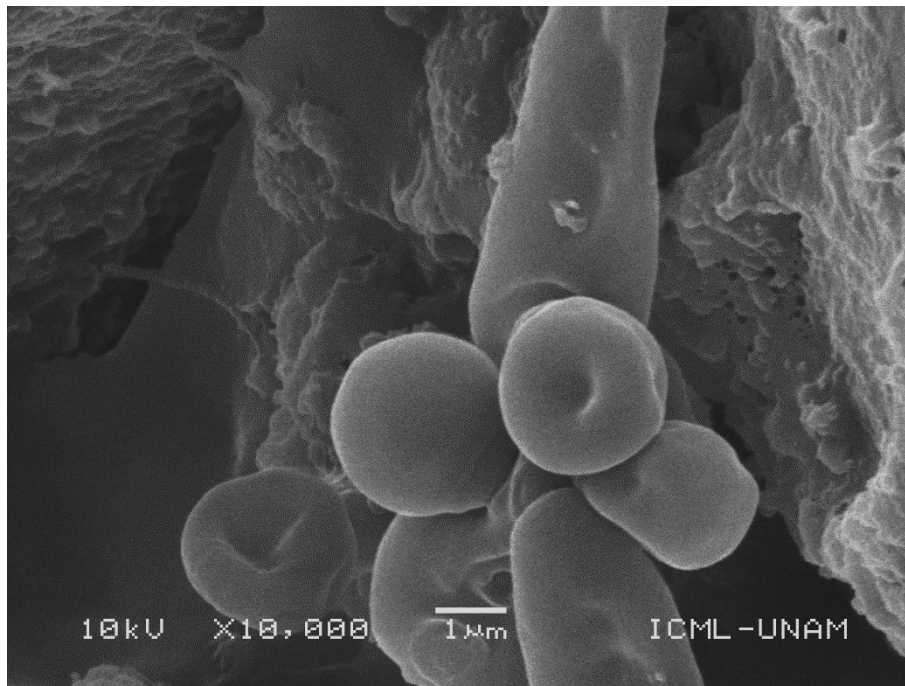


Fig. 14. Microfotografía a un aumento de 10,000x de polimetilmetacrilato en agua bidestilada estéril durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos. Se observa a detalle la morfología de las levaduras e hifas, adheridas en un área retentiva.

Observación después de 24 horas de incubación.

## POLIMETILMETACRILATO INCUBADO EN FLUCONAZOL 100 $\mu$ g/ml (GRUPO CONTROL)

Los discos de PMMA se incubaron en una solución de fluconazol durante 8 horas y posteriormente se incubaron en la solución estandarizada con la cepa de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

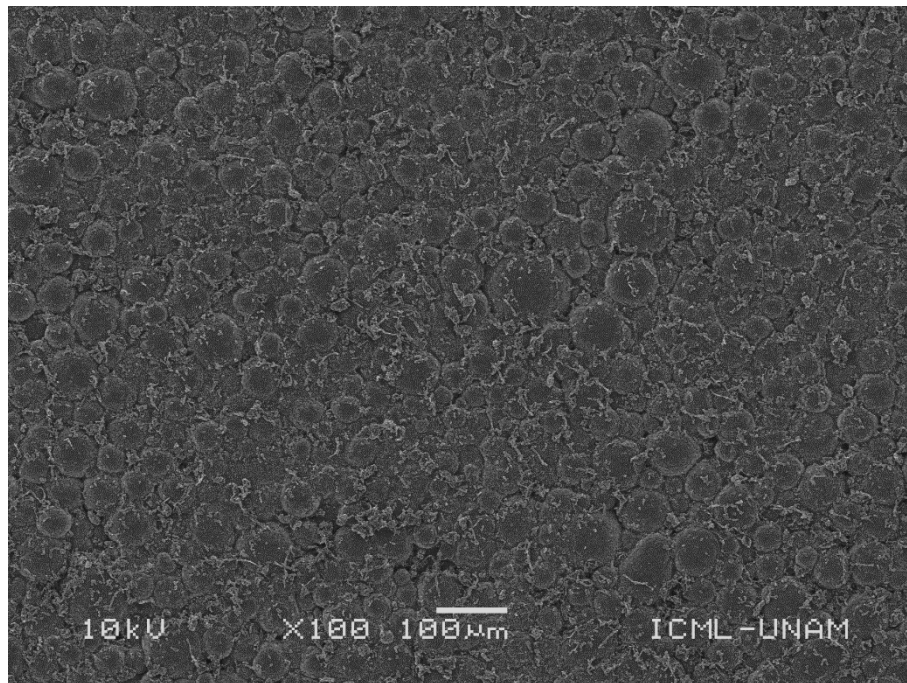


Fig. 15. Microfotografía a un aumento de 100x de polimetilmetacrilato en Fluconazol durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos. Se observa una topografía de tipo empedrado, correspondientes a glóbulos que van de 5 a 50 micras.

Observación después de 24 horas de incubación.

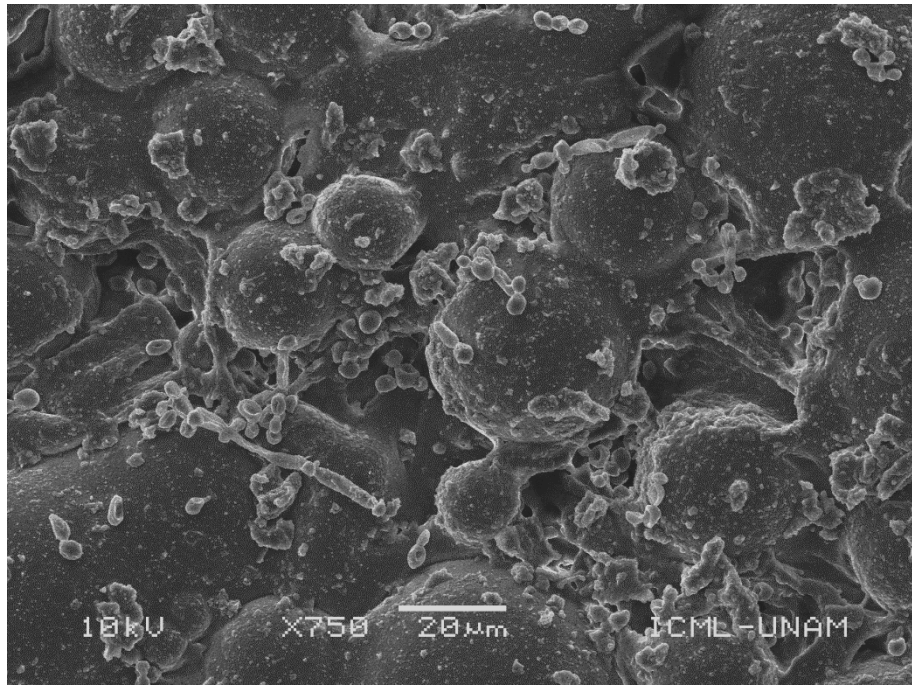


Fig. 16

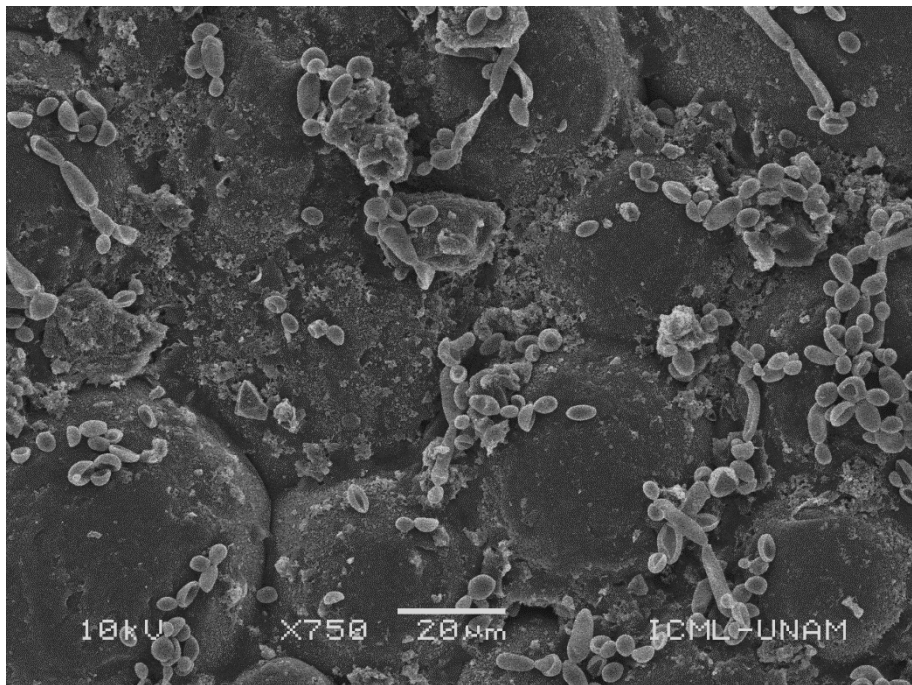


Fig. 17

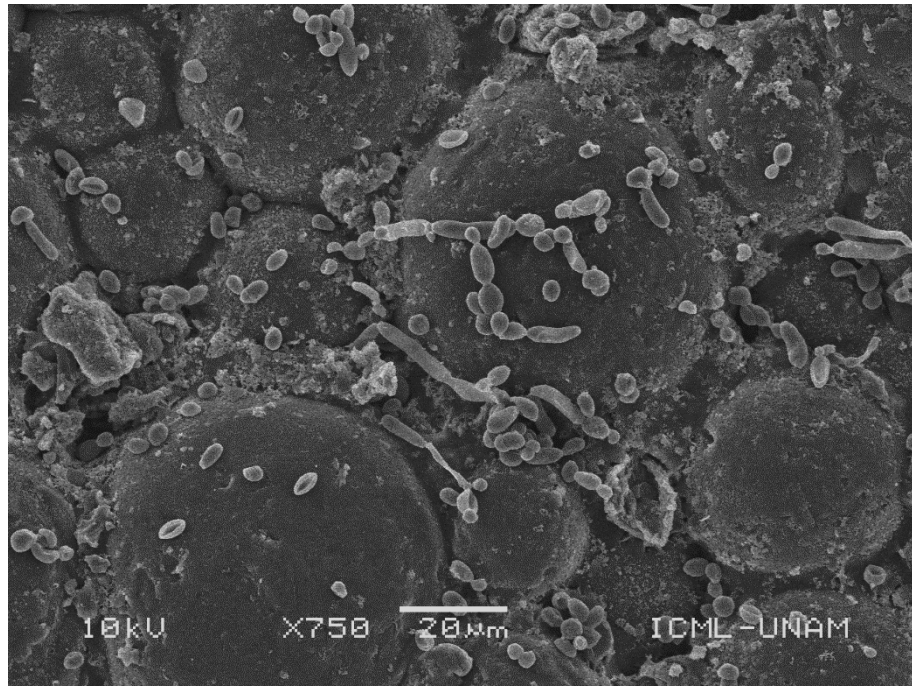


Fig. 18

Fig. 16, 17 y 18. Microfotografías a un aumento de 750x de polimetilmetacrilato en Fluconazol 100µg/ml durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos. Se observa presencia de levaduras de un tamaño aproximado de 3 a 8 micras e hifas que tienen un tamaño aproximado de 25 micras de largo.

Observación después de 24 horas de incubación.

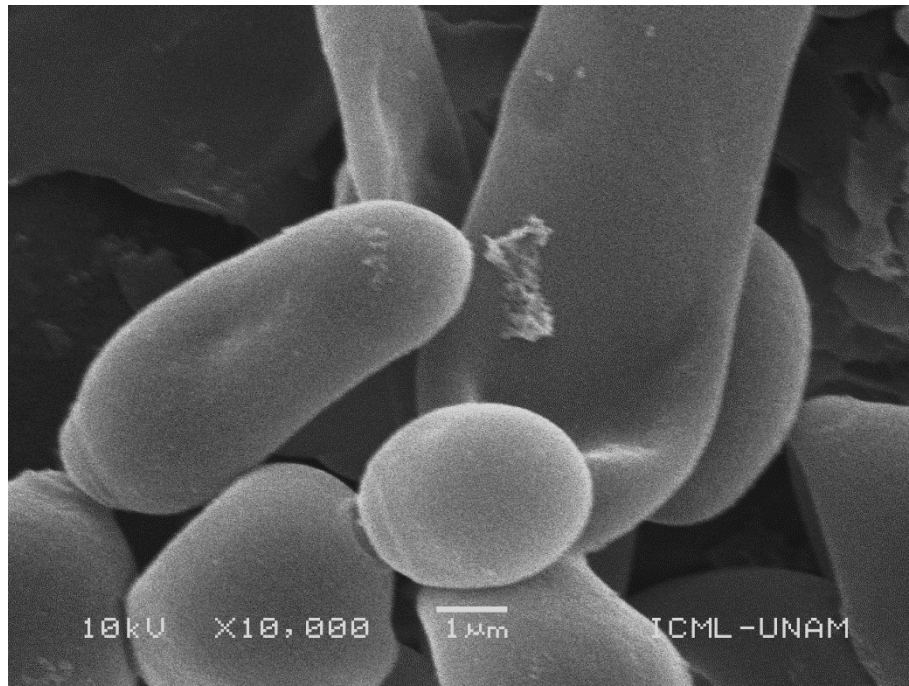


Fig. 19. Microfotografías a un aumento de 10,000x de polimetilmetacrilato en Fluconazol 100μg/ml durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos. Se observa la formación de una estructura tridimensional y la variación en la morfología de las levaduras a hifas. Formas características de este microorganismo.

Observación después de 24 horas de incubación.

## **POLIMETILMETACRILATO INCUBADO EN ACEITE ESENCIAL DE *Mentha spp* AL 2%**

Los discos de PMMA se incubaron en una solución de aceite esencial de *Mentha spp* a una concentración de 2% diluida con agua bidestilada estéril, durante 8 horas y posteriormente se incubaron en la solución estandarizada con la cepa de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

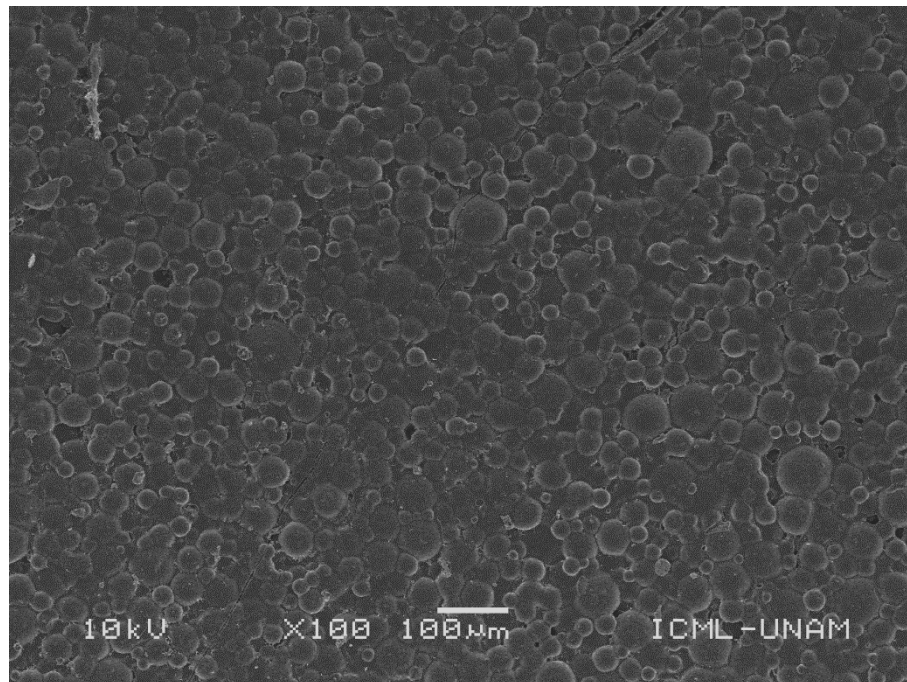


Fig. 20. Microfotografía a un aumento de 100x de polimetilmetacrilato en aceite esencial de *Mentha spp* al 2% durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

Se observa una topografía de tipo empedrado, correspondientes a glóbulos que van de 5 a 50 micras.

Observación después de 24 horas de incubación.

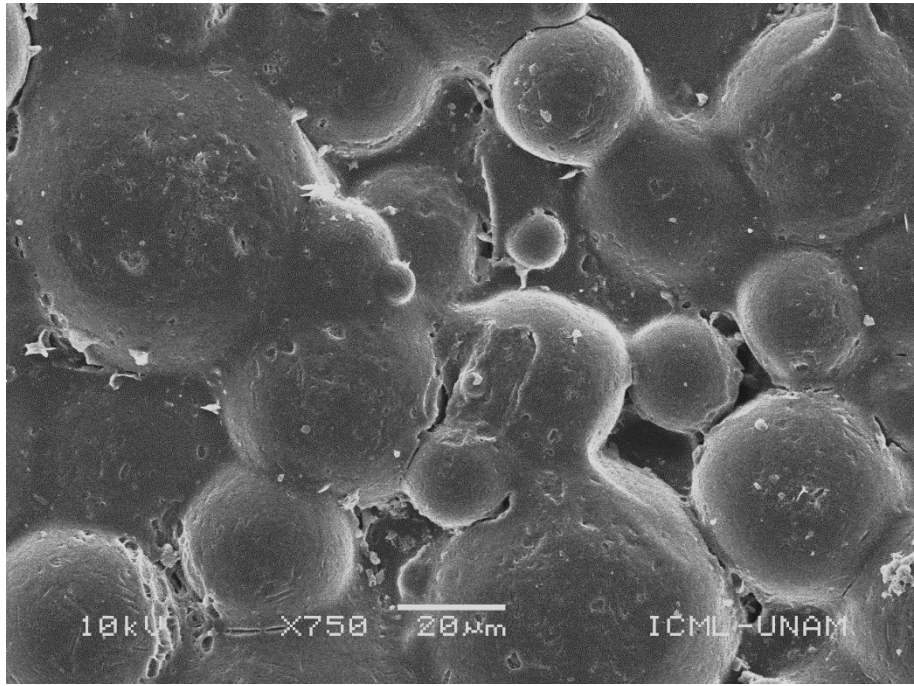


Fig. 21

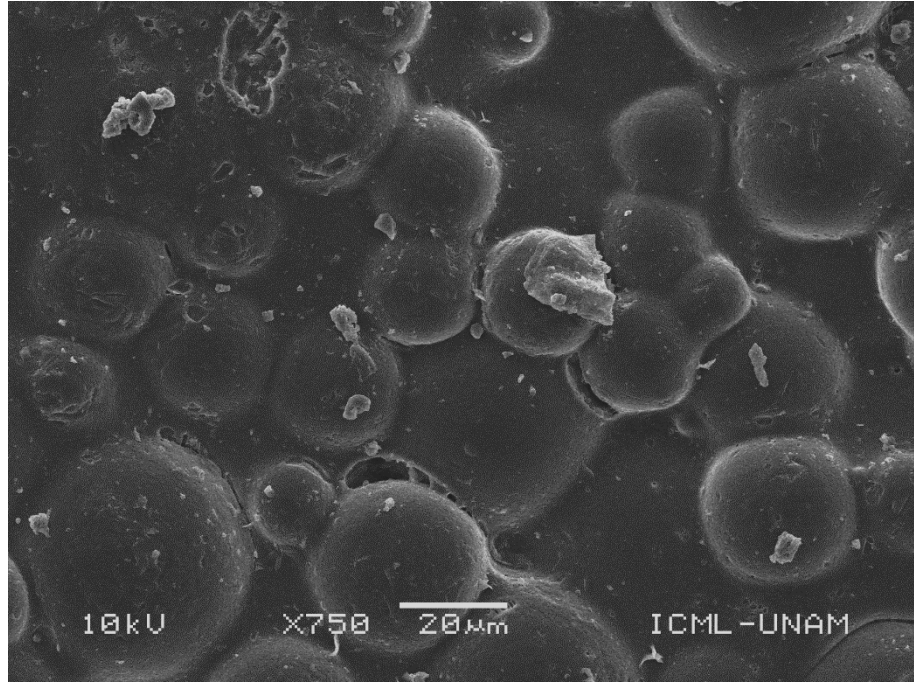


Fig. 22



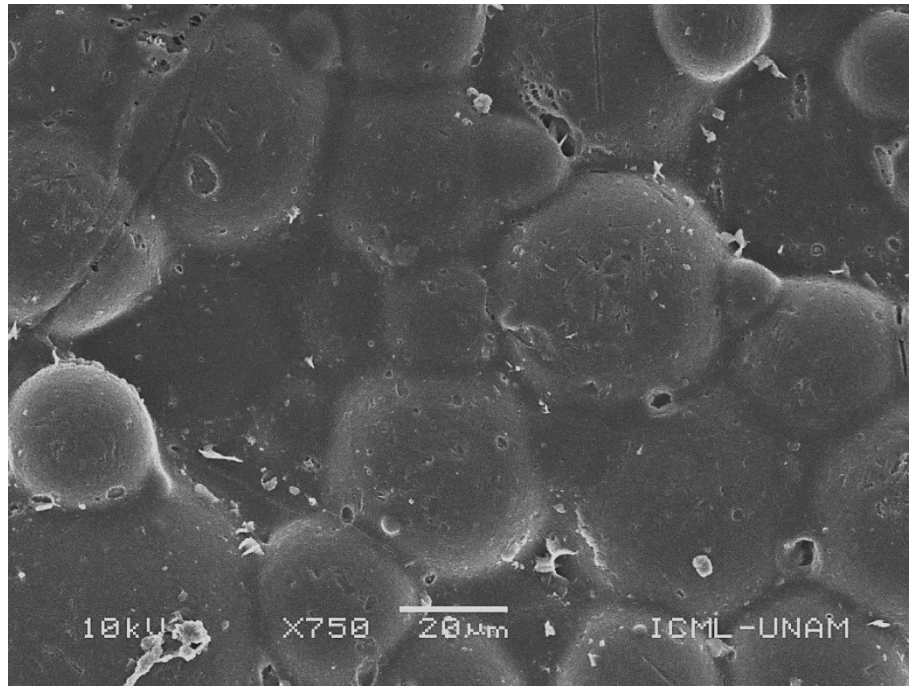


Fig. 23

Fig. 21, 22 y 23. Microfotografías a un aumento de 750x de polimetilmetacrilato en aceite esencial de *Mentha spp* al 2% durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

Observación después de 24 horas de incubación.

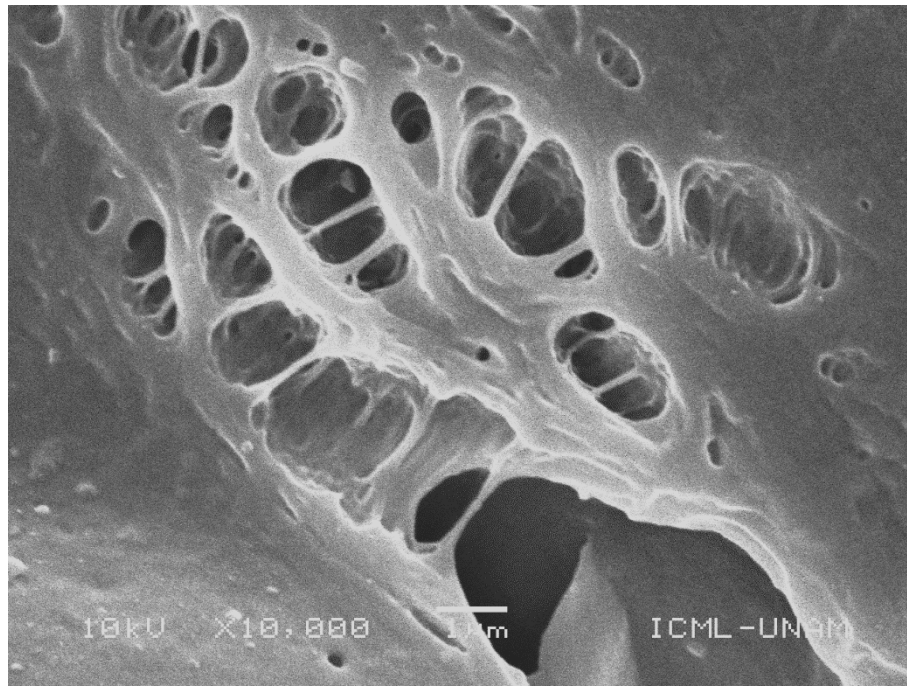


Fig. 24. Microfotografías a un aumento de 10,000x de polimetilmetacrilato en aceite esencial de *Mentha spp* al 2% durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

Se observan zonas retentivas y defectos propios del PMMA sin presencia de microorganismos.

Observación después de 24 horas de incubación.

## **POLIMETILMETACRILATO INCUBADO EN ACEITE ESENCIAL DE *Mentha spp* AL 4%**

Los discos de PMMA se incubaron en una solución de aceite esencial de *Mentha spp* a una concentración de 4% diluida con agua bidestilada estéril, durante 8 horas y posteriormente se incubaron en la solución estandarizada con la cepa de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

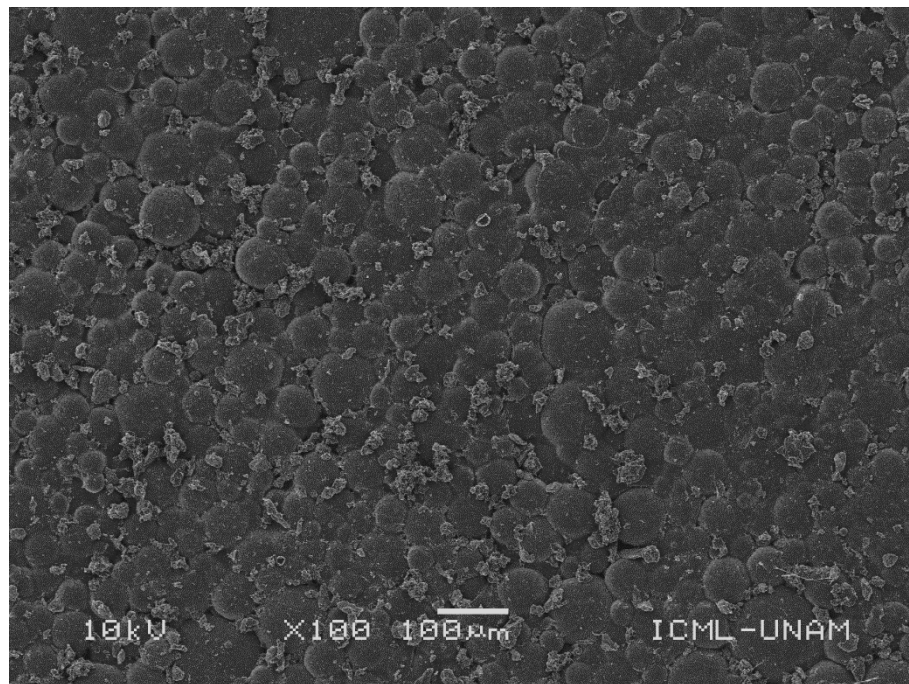


Fig. 25. Microfotografías a un aumento de 100x de polimetilmetacrilato en aceite esencial de *Mentha spp* al 4% durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

Se observa una topografía de tipo empedrado, correspondientes a glóbulos que van de 5 a 50 micras.

Observación después de 24 horas de incubación.

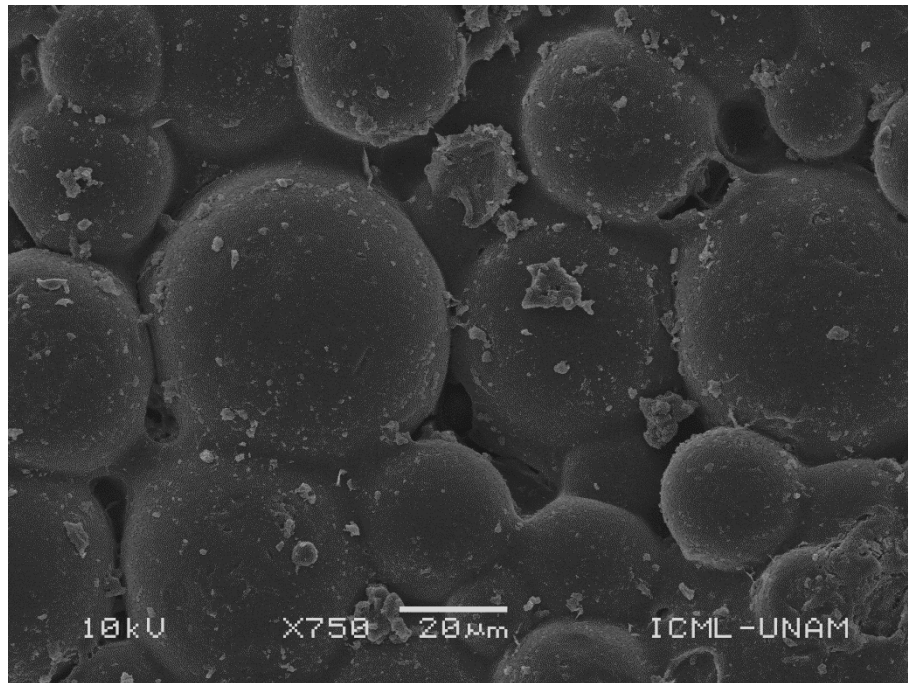


Fig. 26

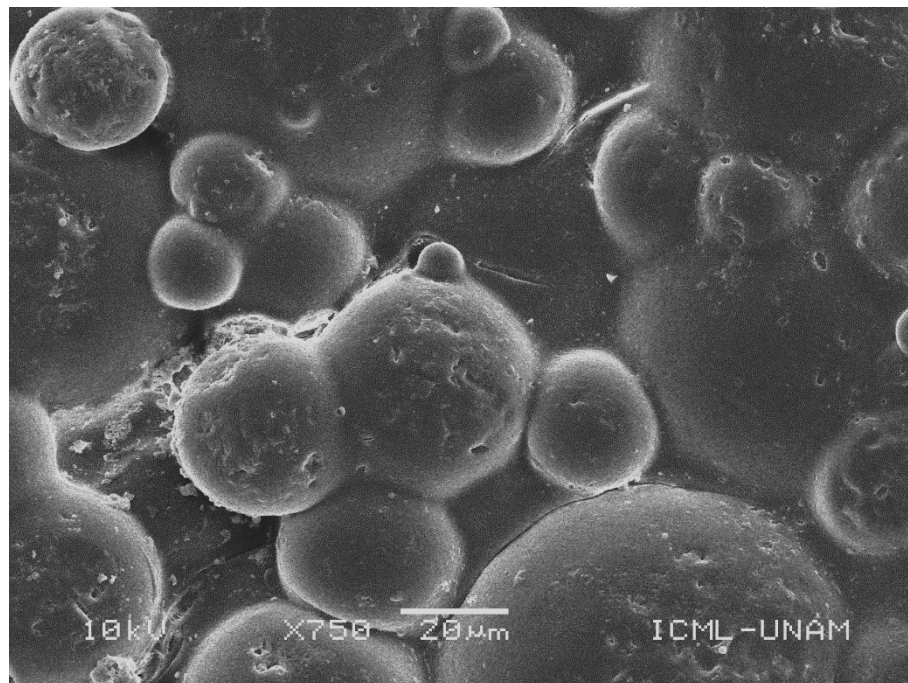


Fig. 27

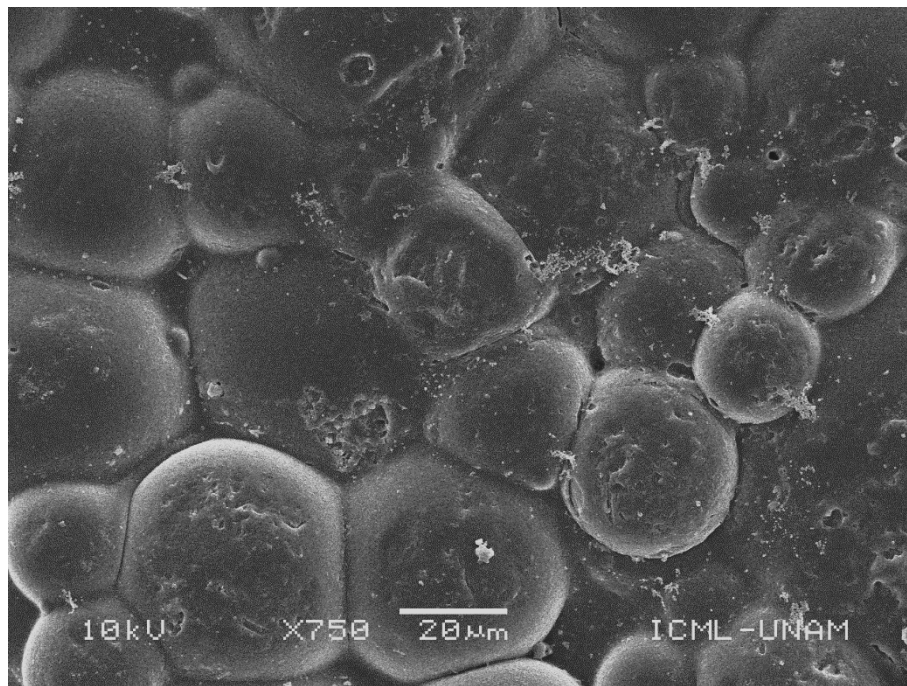


Fig. 28

Fig. 26, 27 y 28. Microfotografías a un aumento de 750x de polimetilmetacrilato en aceite esencial de *Mentha spp* al 4% durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

Observación después de 24 horas de incubación.

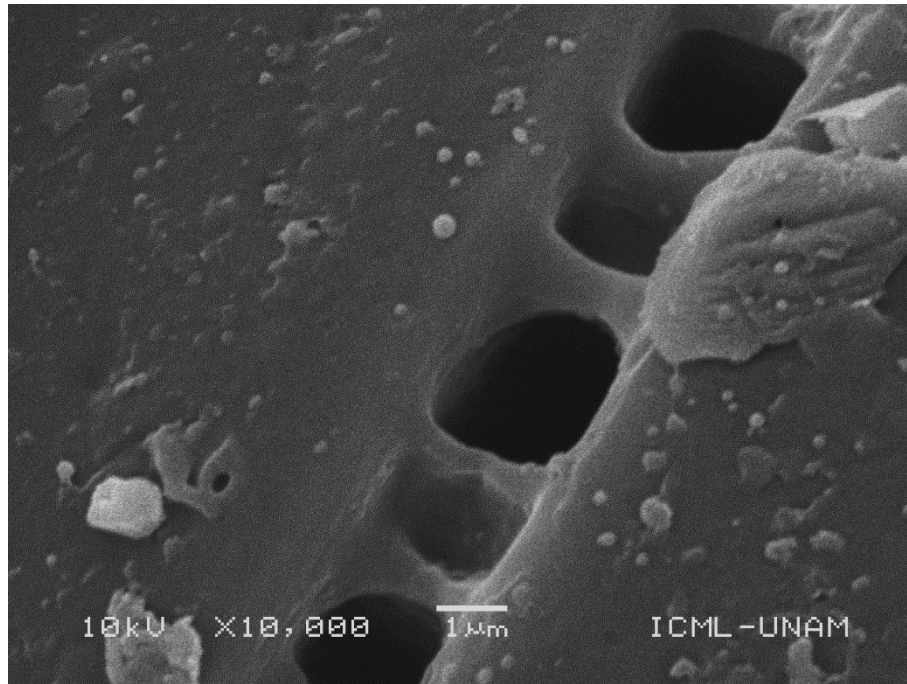


Fig. 29. Microfotografía a un aumento de 10,000x de polimetilmetacrilato en aceite esencial de *Mentha spp* al 4% durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

Se observan zonas retentivas y defectos propios del PMMA sin presencia de microorganismos.

Observación después de 24 horas de incubación.

## **POLIMETILMETACRILATO INCUBADO EN ACEITE ESENCIAL DE *Mentha spp* AL 8%**

Los discos de PMMA se incubaron en una solución de aceite esencial de *Mentha spp* a una concentración de 8%, diluida con agua bidestilada estéril, durante 8 horas y posteriormente se incubaron en la solución estandarizada con la cepa de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

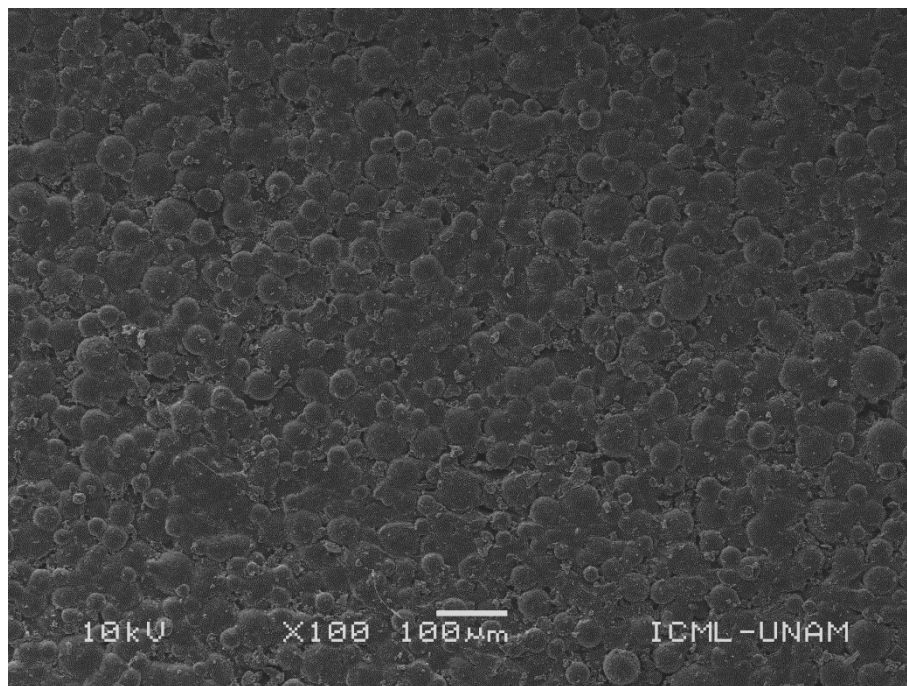


Fig. 30. Microfotografía a un aumento de 100x de polimetilmetacrilato en aceite esencial de *Mentha spp* al 8% durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

Se observa una topografía de tipo empedrado, correspondientes a glóbulos que van de 5 a 50 micras.

Observación después de 24 horas de incubación.

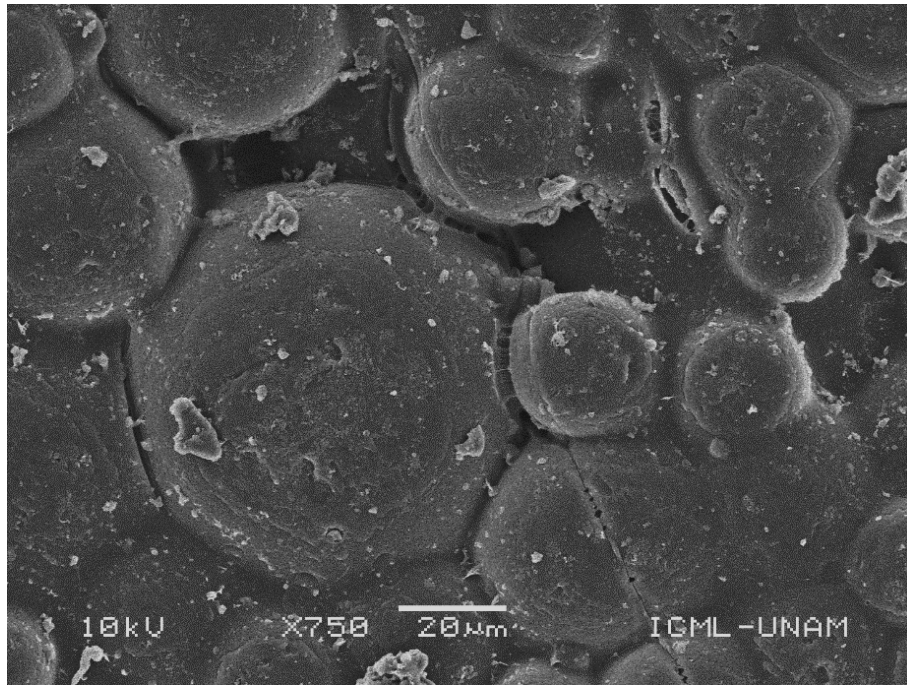


Fig. 31

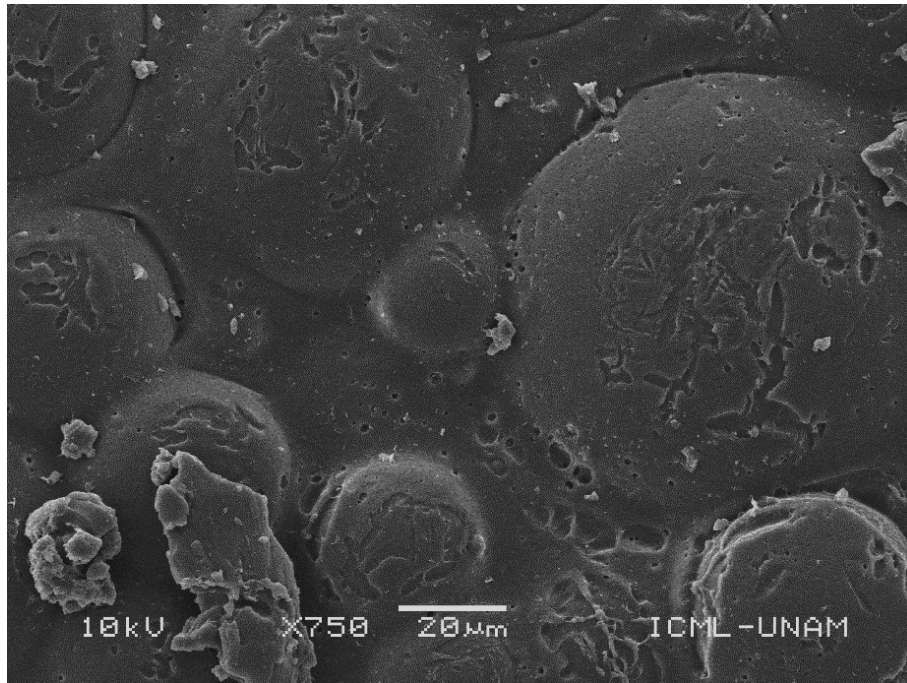


Fig. 32



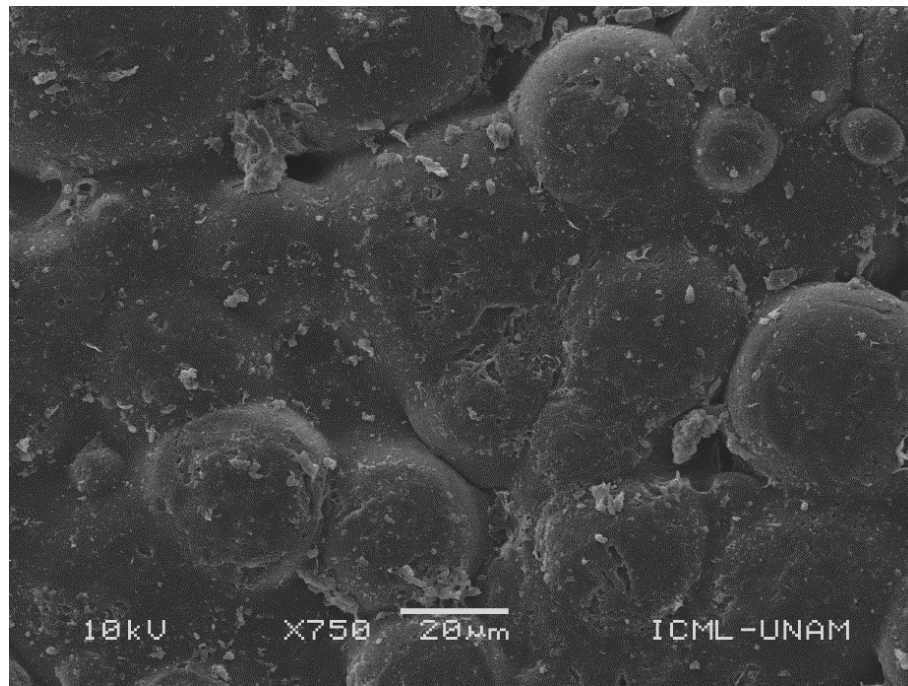


Fig. 33

Fig. 31, 32 y 33. Microfotografías a un aumento de 750x de polimetilmetacrilato en aceite esencial de *Mentha spp* al 8% durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

Observación después de 24 horas de incubación.

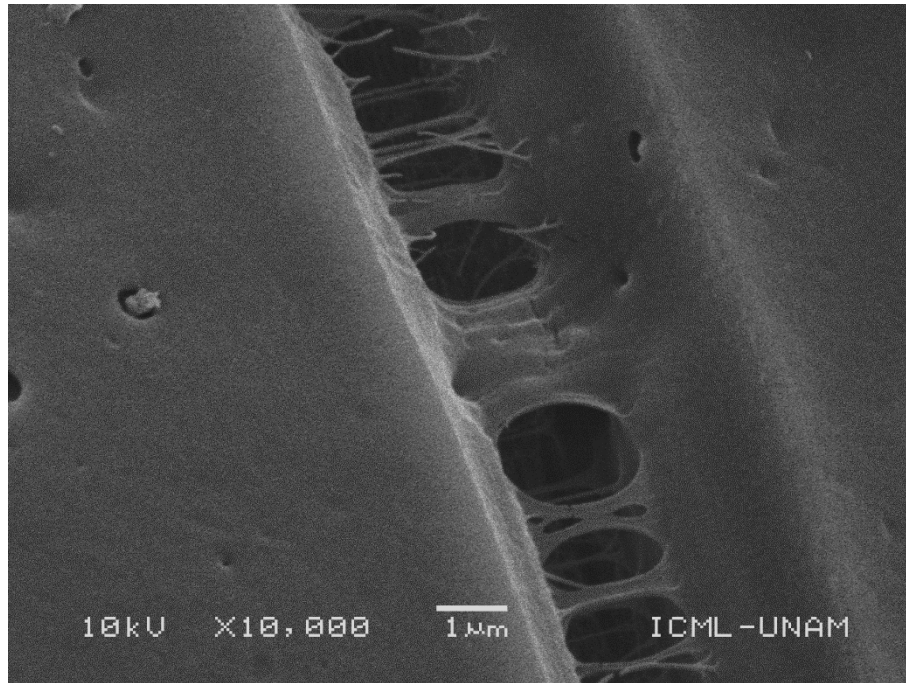


Fig. 34. Microfotografía a un aumento de 10,000x de polimetilmetacrilato en aceite esencial de *Mentha spp* al 8% durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

Se observan zonas retentivas y defectos propios del PMMA sin presencia de microorganismos.

Observación después de 24 horas de incubación.

## **POLIMETILMETACRILATO INCUBADO EN ACEITE ESENCIAL DE *Mentha spp* AL 100%**

Los discos de PMMA se incubaron en una solución de aceite esencial de *Mentha spp* a una concentración de 100%, durante 8 horas y posteriormente se incubaron en la solución estandarizada con la cepa de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

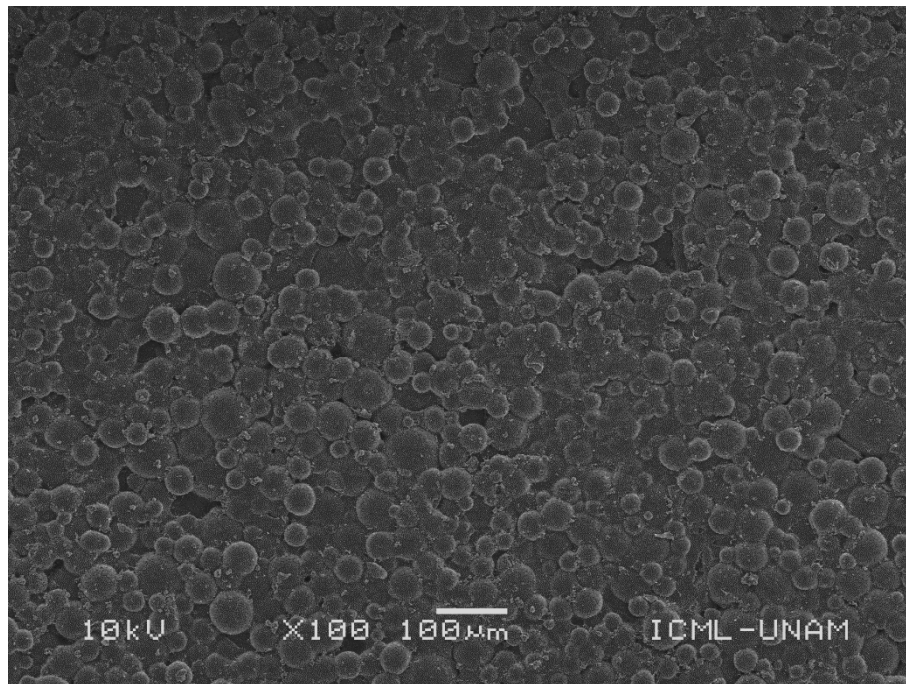


Fig. 35. Microfotografía a un aumento de 100x de polimetilmetacrilato en aceite esencial de *Mentha spp* al 100% durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

Se observa una topografía de tipo empedrado, correspondientes a glóbulos que van de 5 a 50 micras.

Observación después de 24 horas de incubación.

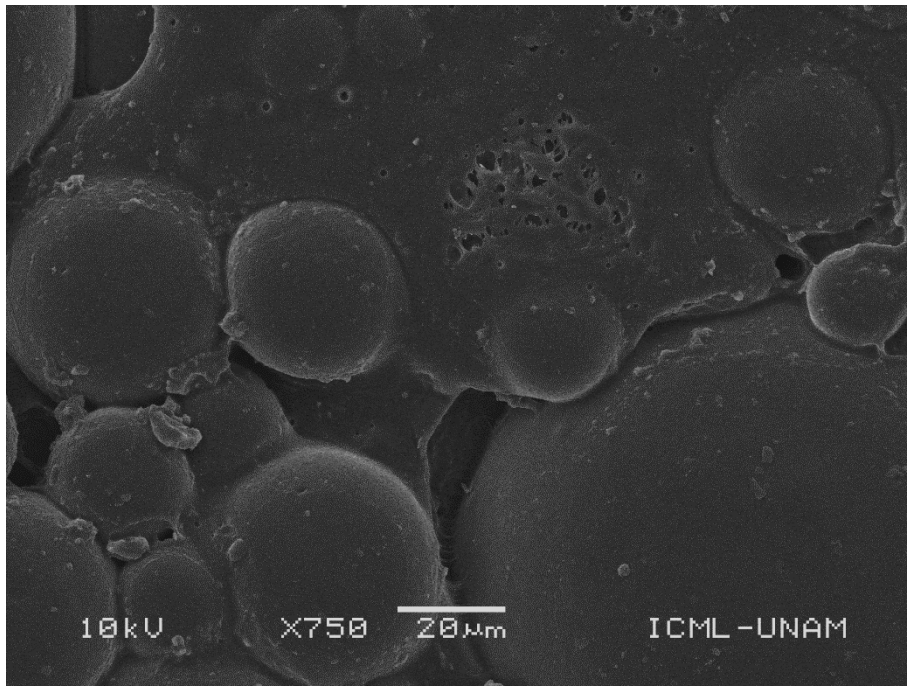


Fig. 36

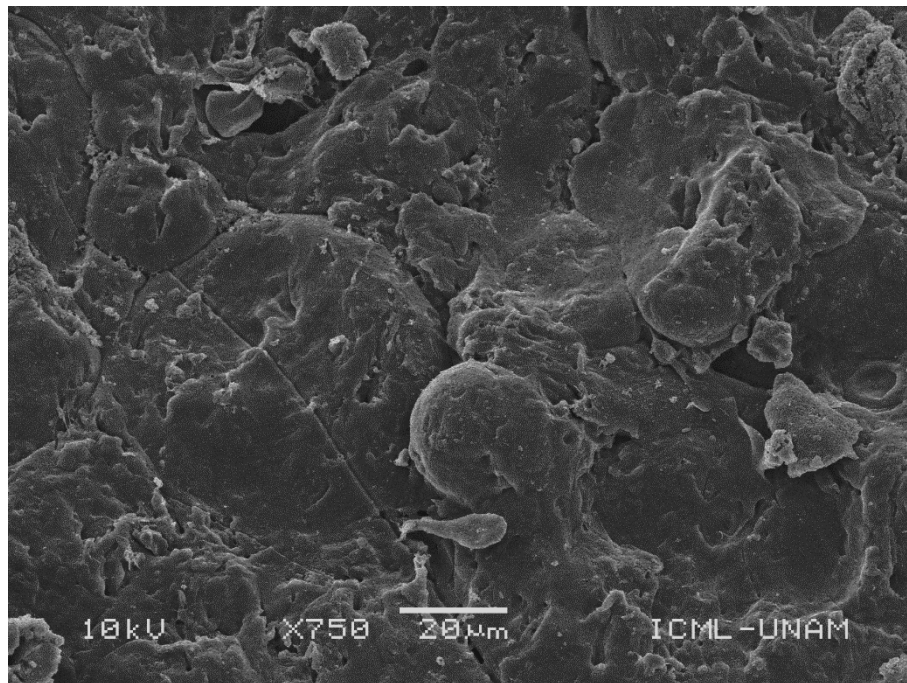


Fig. 37

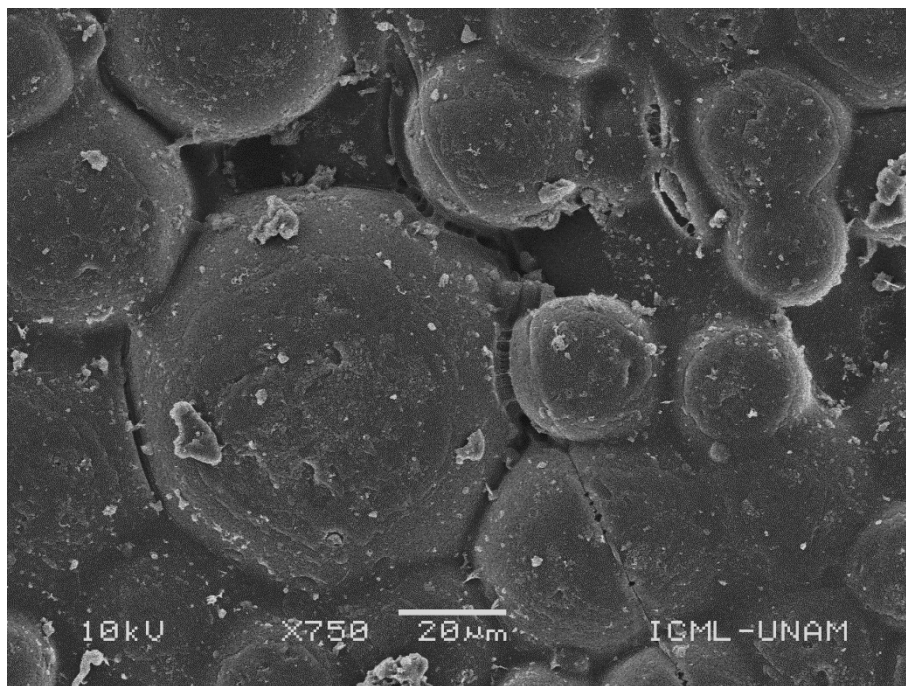


Fig. 38

Fig. 36, 37 y 38. Microfotografías a un aumento de 750x de polimetilmetacrilato en aceite esencial de *Mentha spp* al 100% durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

Observación después de 24 horas de incubación.

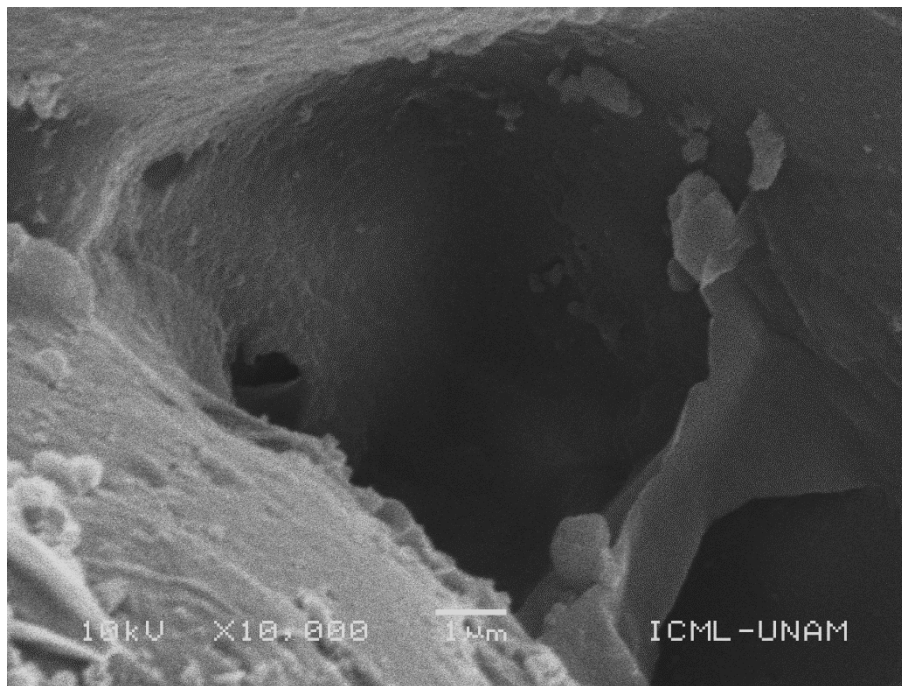


Fig. 39. Microfotografía a un aumento de 10,000x de polimetilmetacrilato en aceite esencial de *Mentha spp* al 100% durante 8 horas e incubadas con *Candida albicans* resistente a los antimicóticos.

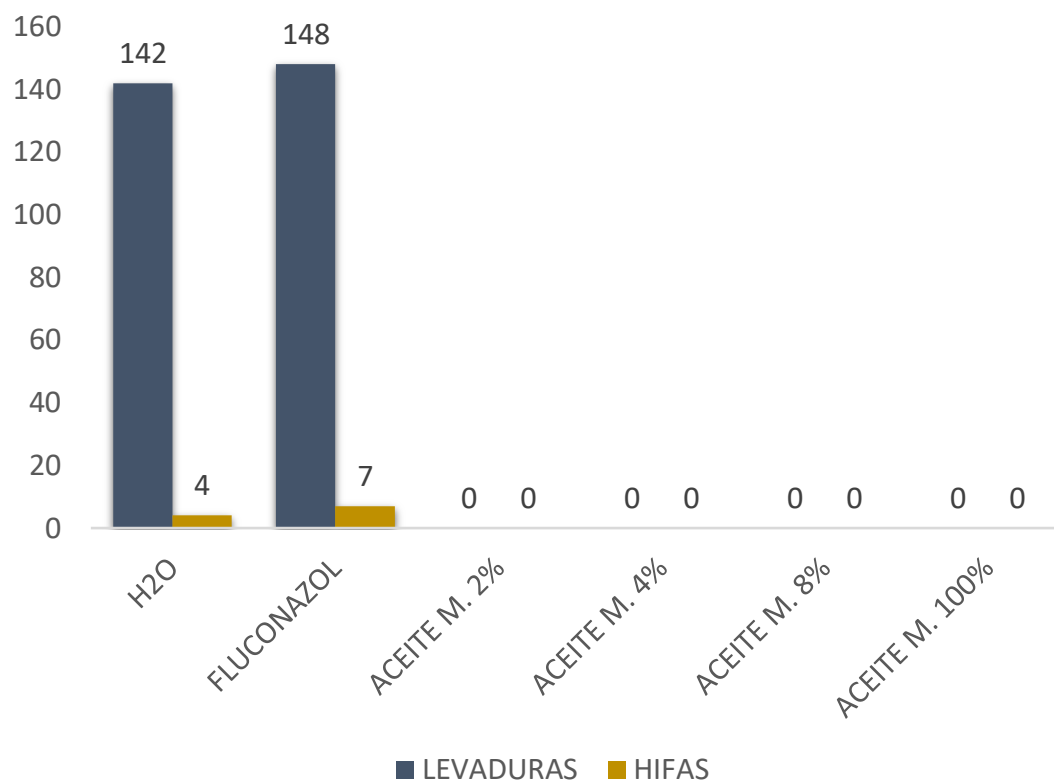
Se observan zonas retentivas y defectos propios del PMMA sin presencia de microorganismos.

Observación después de 24 horas de incubación.

## 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 9.1 CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

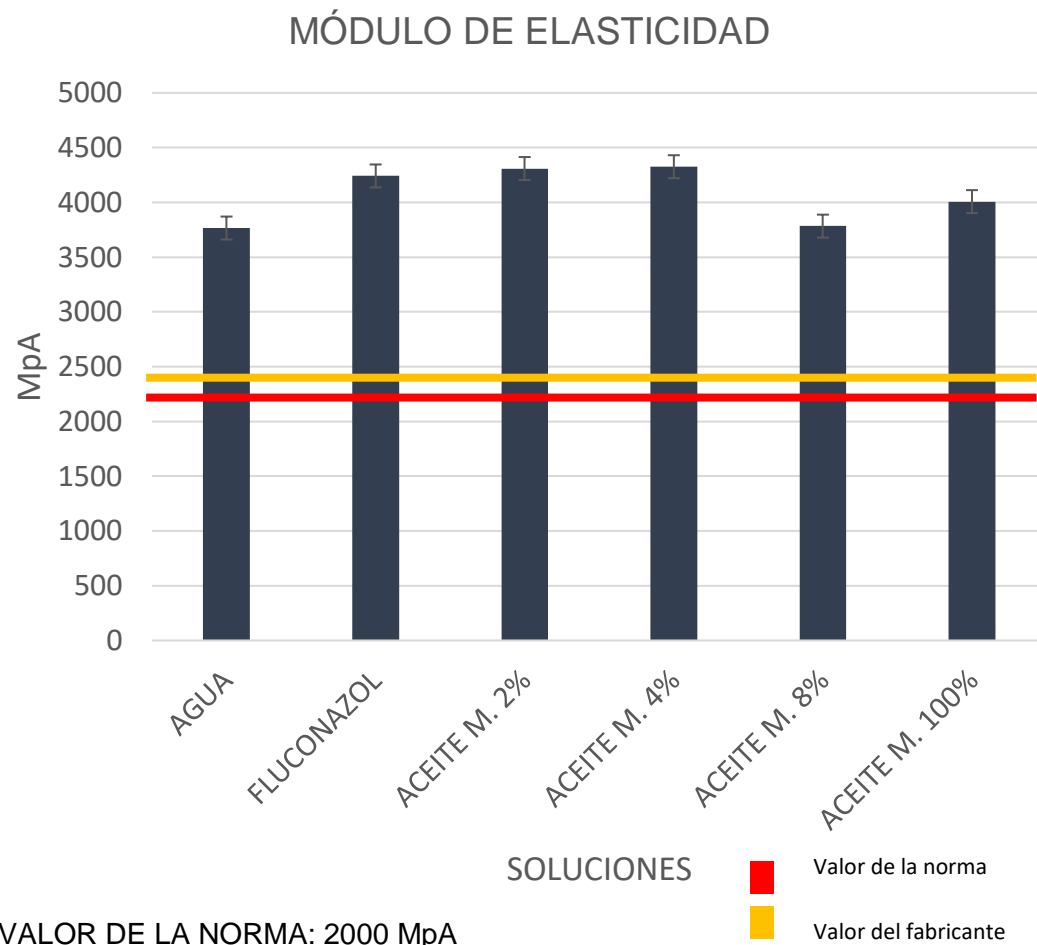
Los microorganismos presentes en la superficie del polimetilmetacrilato fueron cuantificados y promediados en dos grupos (levaduras e hifas). Este conteo se realizó por triplicado, correspondiente a cada imagen a 750x, obtenidas por microscopía electrónica de barrido.



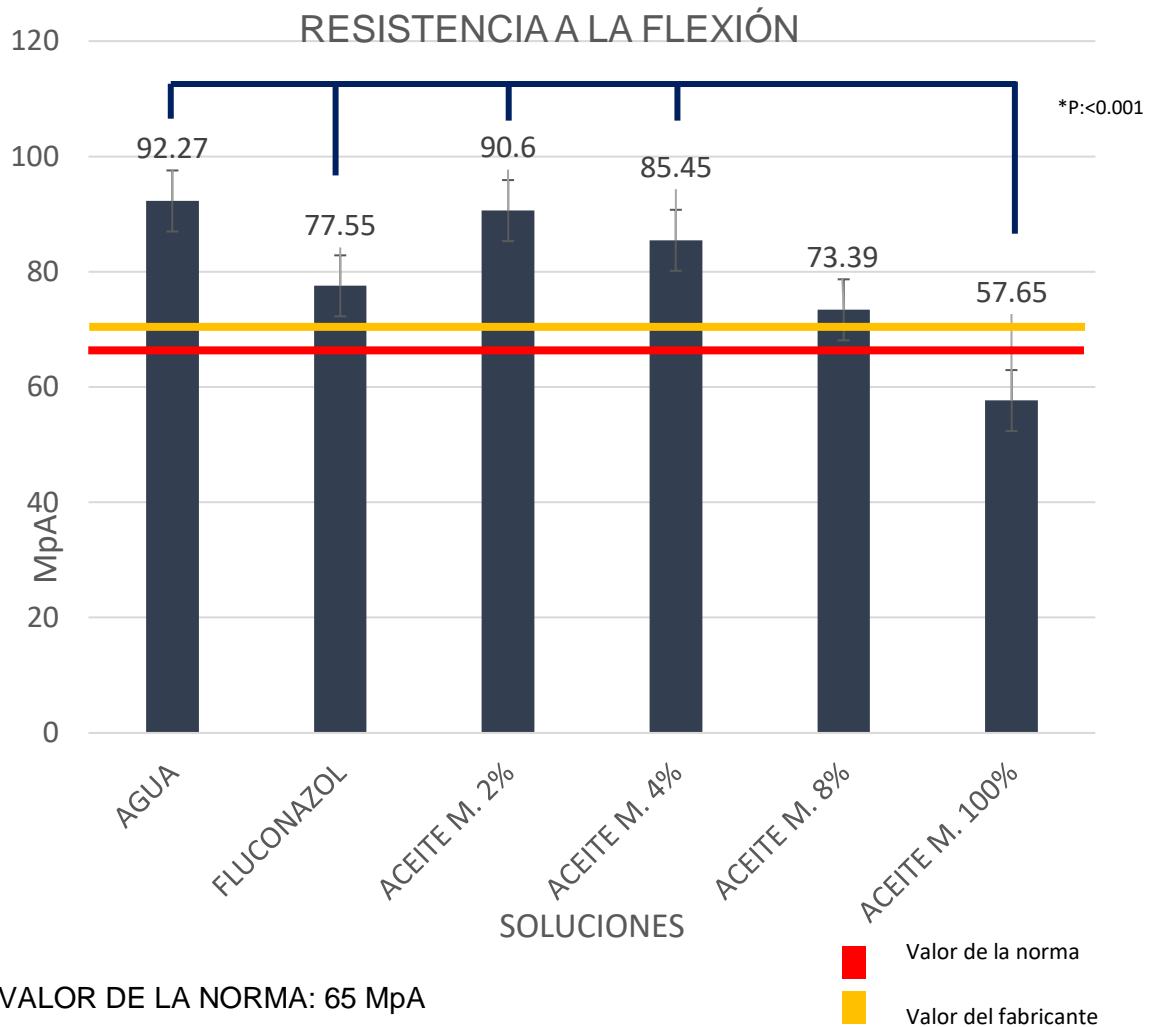
Se determinó la efectividad antimicótica del aceite esencial de *Mentha spp*, ya que inhibe la adhesión de una cepa de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos al polimetilmetacrilato, donde únicamente hubo presencia de microorganismos en los grupos controles (H<sub>2</sub>O, Fluconazol), a comparación de los grupos experimentales, donde se cuantificaron cero levaduras y cero hifas.

## 9.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE MÓDULO DE ELASTICIDAD Y RESISTENCIA A LA FLEXIÓN

Cada una de las placas de polimetilmetacrilato se sometieron a pruebas de tres puntos posterior a un tratamiento de 42 hrs en agua desionizada y 8 horas en las distintas concentraciones de los grupos controles y experimentales, arrojándonos distintos valores cada una de ellas. Estos valores se promediaron y se realizó un análisis ANOVA de una vía.







VALOR DE LA NORMA: 65 MpA

VALOR DEL FABRICANTE (OPTI-CRYL®): 73.29 MpA

Se determinó que el polimetilmetacrilato conserva sus propiedades mecánicas tratado con aceite esencial de *Mentha spp* a una concentración de 2%, 4% y 8%, sin embargo, existe una diferencia estadísticamente significativa con la concentración de aceite esencial de *Mentha spp* al 100%, concluyendo que es la única concentración no viable para un futuro tratamiento.

## 10. DISCUSIÓN

El principal objetivo de este estudio fue comprobar la eficacia antimicótica del aceite esencial de *Mentha spp* sobre una especie de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos, aplicado sobre polimetilmetacrilato, principal material de elaboración de prótesis dentales removibles. Demostramos el efecto inhibitorio que ejerce el aceite esencial de menta sobre esta levadura, principal causante de infecciones orales. Asimismo, realizamos pruebas mecánicas, que nos permitieron analizar los cambios provocados al PMMA posterior al tratamiento con aceite esencial de *Mentha spp*, para finalmente determinar que concentraciones de aceite esencial pueden dar pauta a un futuro uso como tratamiento antimicótico.

En investigaciones publicadas previamente por Katarzyna Rajkowska (2017)<sup>47</sup>, Annarita Stringaro (2018)<sup>42</sup> Chahrazed Benzaid (2019)<sup>48</sup>, Prado Patricia (2021)<sup>49</sup> se demostró que el aceite esencial de *Mentha spp* tiene un efecto antimicótico en contra de especies de *Candida albicans* inhibiendo el crecimiento de este microorganismo y por consecuencia la inhibición de formación de biopelículas, comprobando así la eficacia de este aceite esencial.

Meraz Alan (2022)<sup>50</sup> demostró que el aceite esencial de *Mentha spp* aplicado sobre polimetilmetacrilato no modifica la estructura a nivel microscópico ni su composición elemental. Sin embargo, en la literatura no hay registro de pruebas mecánicas realizadas sobre polimetilmetacrilato posterior a un tratamiento con aceites esenciales, por lo que para nuestra investigación fue de gran utilidad demostrar si surgen cambios mecánicos en este material protésico ya que sería de gran relevancia para un futuro uso clínico.

En evidencias experimentales como la publicada por Vivian Tullio (2019)<sup>51</sup> donde su metodología experimental *in vitro* consistió en la implementación de aceite esencial de *Mentha piperita* obtenida mediante hidrodestilación, el

aceite esencial fue diluido en etanol al 2%, de igual manera implementaron antimicóticos como Fluconazol, Itraconazol y Ketoconazol, que fueron utilizados para obtener un efecto sinérgico junto con el aceite esencial en contra de distintas especies de *Candida* entre ellas, *Candida albicans* que fueron incubadas en Dextrosa Sabouraud durante 72 horas a 35 °C antes de las pruebas experimentales. Concluyendo en la efectividad que tiene el aceite esencial de *Mentha piperita* en combinación con antimicóticos.

De acuerdo con el análisis de resultados del trabajo experimental realizado por Vivian Tullio (2019)<sup>51</sup> y el análisis de nuestra investigación, se coincide en el efecto antimicótico que tiene el aceite esencial de *Mentha spp*, en contra de especies de *Candida spp*, sin embargo, en nuestro estudio implementamos una especie de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos, en donde nuestro grupo control de Fluconazol a una concentración de 100 µg/ml no demostró efecto alguno en contra de nuestra cepa de estudio, a comparación de esta investigación donde se implementaron especies sensibles a estos fármacos.

Un punto a destacar en donde concuerdan las investigaciones, es en la importancia de los componentes que constituyen los aceites esenciales, principalmente terpenos, que como lo menciona Vivian Tullio (2019)<sup>51</sup>, los componentes principales son los monoterpenos oxigenados, mentol y mentona, sin embargo, aún no está del todo esclarecido si el conjunto de estos compuestos volátiles son los que le otorgan al aceite esencial de menta esta propiedad antimicótica debido a sus características lipofílicas, que pueden penetrar la membrana de las células, o son los monoterpenos de mayor presencia los que tienen este efecto en contra de las levaduras.

Debido a los resultados en común destaca la importancia que tiene el aceite esencial de menta, que ha comprobado ser eficaz en contra estos microorganismos, además de demostrar eficacia aún en especies resistentes

a los antimicóticos, inhibiendo su crecimiento, de igual manera su adhesión a estructuras bióticas y abióticas y finalmente la formación de biopelículas, que es una de las principales características de patogenicidad de *Candida albicans*, que le confiere propiedades, como protección, tal como la investigación realizada por Mohammad Jamal (2012)<sup>52</sup> que es relevante debido a su metodología experimental *in vitro* que consistió en la extracción de aceite esencial de *Mentha piperita* mediante hidrodestilación, para determinar su uso antimicótico en contra de especies de *Candida spp* tanto sensibles como resistentes a los antimicóticos, estas incubadas en Dextrosa Sabouraud durante 48 horas a 30 °C. Se implemento un grupo control con Fluconazol a una concentración de 0.25-128 µg/ml y las concentraciones del aceite esencial de *Mentha piperita* fueron de 1, 2 y 8 µl/ml. Concluyendo que no hubo cambios significativos entre las concentraciones del aceite esencial de menta, en la inhibición de microorganismos entre especies sensibles y especies resistentes a los antimicóticos, debido a su carácter fungicida, a comparación de las especies tratadas con Fluconazol. También cabe mencionar que Mohammad Jamal (2012)<sup>52</sup> demostró la inhibición de biopelículas formadas por *Candida albicans* mediante un ensayo de inhibición de biopelícula, determinando que este aceite inhibe por completo la formación de estas.

Este ensayo y el nuestro han demostrado y determinado que una de las características principales del aceite esencial de menta es la inhibición de microorganismos, principalmente especies de *Candida*. Esto debido al mecanismo de acción que es diferente al mecanismo de acción de los antimicóticos. Pudiendo derivar en distintos tratamientos para controlar infecciones causadas por *Candida albicans*, que es el principal patógeno de interés medico y odontológico.

## 11. CONCLUSIÓN

El aceite esencial de *Mentha spp* demostró tener una eficacia antimicótica aplicado sobre polimetilmetacrilato, inhibiendo la adhesión de microorganismos de una cepa de *Candida albicans* resistente a los antimicóticos, sin importar que el microorganismo contara con un sustrato adecuado para su adhesión, retención y maduración.

Las concentraciones bajas del aceite esencial de *Mentha spp* tiene el mismo efecto inhibitorio que la concentración del 100% y no afectan las propiedades mecánicas del acrílico, esto puede derivar en nuevas alternativas de tratamientos profilácticos o coadyuvantes con fármacos, lo que será de gran ayuda para personas que padecen de infecciones causadas por *Candida albicans*.

## 12. REFERENCIAS

1. Gad MM, Al-Thobity AM, Shahin SY, Alsaqer BT, Ali AA. Inhibitory effect of zirconium oxide nanoparticles on *Candida albicans* adhesion to repaired polymethyl methacrylate denture bases and interim removable prostheses: a new approach for denture stomatitis prevention. *Int J Nanomedicine*. 2017 Jul 28;12:5409-5419. doi: 10.2147/IJN.S142857. PMID: 28814859; PMCID: PMC5546774.
2. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2018 Jan;16(1):19-31. doi: 10.1038/nrmicro.2017.107. Epub 2017 Oct 3. PMID: 29062072; PMCID: PMC5726514.
3. Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. *Clin Dermatol*. 2016 Jul-Aug;34(4):487-94. doi: 10.1016/j.clindermatol.2016.02.022. Epub 2016 Mar 2. PMID: 27343964.
4. Piras A, Porcedda S, Falconieri D, Maxia A, Gonçalves M, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of essential oil from *Mentha spicata* L. and *Mentha pulegium* L. growing wild in Sardinia island (Italy). *Nat Prod Res*. 2021 Mar;35(6):993-999. doi: 10.1080/14786419.2019.1610755. Epub 2019 Jul 19. PMID: 31321997.
5. Shafiei Z, Rahim ZHA, Philip K, Thurairajah N, Yaacob H. Potential effects of *Psidium sp.*, *Mangifera sp.*, *Mentha sp.* and its mixture (PEM) in reducing bacterial populations in biofilms, adherence and acid production of *S. sanguinis* and *S. mutans*. *Arch Oral Biol*. 2020 Jan;109:104554. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104554. Epub 2019 Sep 20. PMID: 31563709.
6. Aimad A, Sanae R, Anas F, Abdelfattah EM, Bourhia M, Mohammad Salamatullah A, Alzahrani A, Alyahya HK, Albadr NA, Abdelkrim A, El Barnossi A, Nouredine E. Chemical Characterization and Antioxidant, Antimicrobial, and Insecticidal Properties of Essential Oil from *Mentha*

- pulegium* L. Evid Based Complement Alternat Med. 2021 Oct 15;2021:1108133. doi: 10.1155/2021/1108133. PMID: 34691201; PMCID: PMC8536417.
7. Lim CS, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Jan;31(1):21-31. doi: 10.1007/s10096-011-1273-3. Epub 2011 May 5. PMID: 21544694.
  8. van der Meer JW, van de Veerdonk FL, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. Severe *Candida spp.* infections: new insights into natural immunity. Int J Antimicrob Agents. 2010 Dec;36 Suppl 2:S58-62. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.11.013. Epub 2010 Dec 3. PMID: 21129931.
  9. Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. Head Neck Pathol. 2019 Mar;13(1):25-32. doi: 10.1007/s12105-019-01004-6. Epub 2019 Jan 29. PMID: 30693459; PMCID: PMC6405794.
  10. Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: An overview. J Oral Maxillofac Pathol. 2014 Sep;18(Suppl 1):S81-5. doi: 10.4103/0973-029X.141325. PMID: 25364186; PMCID: PMC4211245.
  11. Pereira R, Dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Moraes SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. J Appl Microbiol. 2021 Jul;131(1):11-22. doi: 10.1111/jam.14949. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33249681.
  12. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. Virulence. 2013 Feb 15;4(2):119-28. doi: 10.4161/viru.22913. Epub 2013 Jan 9. PMID: 23302789; PMCID: PMC3654610.
  13. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. Microbes Infect. 2016 May;18(5):310-21. doi: 10.1016/j.micinf.2016.01.002. Epub 2016 Jan 22. PMID: 26806384; PMCID: PMC4860025.

14. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol.* 2015;69:71-92. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330. PMID: 26488273; PMCID: PMC4930275.
15. Poulain D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Crit Rev Microbiol.* 2015 Jun;41(2):208-17. doi: 10.3109/1040841X.2013.813904. Epub 2013 Aug 20. PMID: 23962107.
16. Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakraborty S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control - An update. *Microb Pathog.* 2018 Apr;117:128-138. doi: 10.1016/j.micpath.2018.02.028. Epub 2018 Feb 16. PMID: 29454824.
17. Quatresooz P, Piérard-Franchimont C, Noël F, Piérard GE. Thigmotropism of malignant melanoma cells. *Dermatol Res Pract.* 2012;2012:362784. doi: 10.1155/2012/362784. Epub 2011 Nov 17. PMID: 22203839; PMCID: PMC3235666.
18. Coronado-Castellote L, Jiménez-Soriano Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent.* 2013 Dec 1;5(5):e279-86. doi: 10.4317/jced.51242. PMID: 24455095; PMCID: PMC3892259.
19. Wall G, Montelongo-Jauregui D, Vidal Bonifacio B, Lopez-Ribot JL, Uppuluri P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2019 Dec;52:1-6. doi: 10.1016/j.mib.2019.04.001. Epub 2019 May 11. PMID: 31085405; PMCID: PMC6842673.
20. Rajeshkumar R, Sundararaman M. Emergence of *Candida spp.* and exploration of natural bioactive molecules for anticandidal therapy--status quo. *Mycoses.* 2012 May;55(3):e60-73. doi: 10.1111/j.1439-0507.2011.02156.x. Epub 2011 Nov 25. PMID: 22118661.
21. R AN, Rafiq NB. Candidiasis. 2022 May 30. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan—. PMID: 32809459.



22. Coronado-Castellote L, Jiménez-Soriano Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent*. 2013 Dec 1;5(5):e279-86. doi: 10.4317/jced.51242. PMID: 24455095; PMCID: PMC3892259.
23. Holmstrup P, Axéll T. Classification and clinical manifestations of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*. 1990 Feb;48(1):57-9. doi: 10.3109/00016359009012734. PMID: 2181811.
24. Bengel W. Candidiasis orales. Parte 1: Cuadro clínico, epidemiología y etiología. Quintessence [Internet]. 2010 [citado el 5 de septiembre de 2022];23(10):510–7. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-quintessence-9-articulo-candidiasis-orales-parte-1-cuadro-X0214098510886703>
25. Sugio CYC, Garcia AAMN, Albach T, Moraes GS, Bonfante EA, Urban VM, Neppelenbroek KH. *Candida*-Associated Denture Stomatitis and Murine Models: What Is the Importance and Scientific Evidence? *J Fungi (Basel)*. 2020 May 23;6(2):70. doi: 10.3390/jof6020070. PMID: 32456172; PMCID: PMC7344758.
26. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, Guida A, Petruzzi M, Serpico R. *Candida*-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Mar 1;16(2):e139-43. doi: 10.4317/medoral.16.e139. PMID: 20711156.
27. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci*. 2008 Mar-Apr;16(2):86-94. doi: 10.1590/s1678-77572008000200002. PMID: 19089197; PMCID: PMC4327625.
28. Ayuso-Montero R, Torrent-Collado J, López-López J. Estomatitis protésica: puesta al día. RCOE [Internet]. 2004 [citado el 13 de septiembre de 2022];9(6):645–52. Disponible en: [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1138-123X2004000600004](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1138-123X2004000600004)

29. Prevalencia de Estomatitis Subprotésica en un grupo de pacientes venezolanos. Estudio clínico transversal [Internet]. Actaodontologica.com. [citado el 13 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2013/4/art-8/>
30. Fang J, Wang C, Li Y, Zhao Z, Mei L. Comparison of bacterial adhesion to dental materials of polyethylene terephthalate (PET) and polymethyl methacrylate (PMMA) using atomic force microscopy and scanning electron microscopy. *Scanning*. 2016 Nov;38(6):665-670. doi: 10.1002/sca.21314. Epub 2016 Mar 15. PMID: 26991988.
31. Montoya C, Kurylec J, Baraniya D, Tripathi A, Puri S, Orrego S. Antifungal Effect of Piezoelectric Charges on PMMA Dentures. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021 Oct 11;7(10):4838-4846. doi: 10.1021/acsbomaterials.1c00926. Epub 2021 Oct 1. PMID: 34596379; PMCID: PMC9228501.
32. An S, Evans JL, Hamlet S, Love RM. Incorporation of antimicrobial agents in denture base resin: A systematic review. *J Prosthet Dent*. 2021 Aug;126(2):188-195. doi: 10.1016/j.prosdent.2020.03.033. Epub 2020 Aug 13. PMID: 32800329.
33. Garcia-Cuesta C, Sarrion-Pérez MG, Bagán JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *J Clin Exp Dent*. 2014 Dec 1;6(5):e576-82. doi: 10.4317/jced.51798. PMID: 25674329; PMCID: PMC4312689.
34. Quindós G, Gil-Alonso S, Marcos-Arias C, Sevillano E, Mateo E, Jauregizar N, Eraso E. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019 Mar 1;24(2):e172-e180. doi: 10.4317/medoral.22978. PMID: 30818309; PMCID: PMC6441600.
35. Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chem Rev*. 2021 Mar 24;121(6):3390-3411. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199. Epub 2020 May 22. PMID: 32441527; PMCID: PMC8519031.

36. Frías-De-León MG, Hernández-Castro R, Conde-Cuevas E, García-Coronel IH, Vázquez-Aceituno VA, Soriano-Ursúa MA, Farfán-García ED, Ocharán-Hernández E, Rodríguez-Cerdeira C, Arenas R, Robledo-Cayetano M, Ramírez-Lozada T, Meza-Meneses P, Pinto-Almazán R, Martínez-Herrera E. *Candida glabrata* Antifungal Resistance and Virulence Factors, a Perfect Pathogenic Combination. *Pharmaceutics*. 2021 Sep 22;13(10):1529. doi: 10.3390/pharmaceutics13101529. PMID: 34683822; PMCID: PMC8538829.Org.mx. [citado el 11 de octubre de 2022]. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-84472016000300127#:~:text=La%20resistencia%20a%20los%20antif%C3%BAngicos,mayor%20resistencia%20son%20los%20azoles.](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-84472016000300127#:~:text=La%20resistencia%20a%20los%20antif%C3%BAngicos,mayor%20resistencia%20son%20los%20azoles.)
37. Achimón F, Brito VD, Pizzolitto RP, Ramirez Sanchez A, Gómez EA, Zygadlo JA. Chemical composition and antifungal properties of commercial essential oils against the maize phytopathogenic fungus *Fusarium verticillioides*. *Rev Argent Microbiol*. 2021 Oct-Dec;53(4):292-303. doi: 10.1016/j.ram.2020.12.001. Epub 2021 Feb 2. PMID: 33546971.
38. Mérillon, J.-M.; Rivière, C. *Natural Antimicrobial Agents*; Springer International Publishing AG: Cham, Switzerland, 2018.
39. Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. Essential Oils as Antimicrobial Agents-Myth or Real Alternative? *Molecules*. 2019 Jun 5;24(11):2130. doi: 10.3390/molecules24112130. PMID: 31195752; PMCID: PMC6612361.
40. Sharopov FS, Zhang H, Wink M, Setzer WN. Aromatic Medicinal Plants from Tajikistan (Central Asia). *Medicines (Basel)*. 2015 Feb 17;2(1):28-46. doi: 10.3390/medicines2010028. PMID: 28933380; PMCID: PMC5532974.

41. Bassolé IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*. 2012 Apr 2;17(4):3989-4006. doi: 10.3390/molecules17043989. PMID: 22469594; PMCID: PMC6268925.
42. Stringaro A, Colone M, Angiolella L. Antioxidant, Antifungal, Antibiofilm, and Cytotoxic Activities of *Mentha spp.* Essential Oils. *Medicines (Basel)*. 2018 Oct 21;5(4):112. doi: 10.3390/medicines5040112. PMID: 30347861; PMCID: PMC6313564.
43. Valdivieso-Ugarte M, Gomez-Llorente C, Plaza-Díaz J, Gil Á. Antimicrobial, Antioxidant, and Immunomodulatory Properties of Essential Oils: A Systematic Review. *Nutrients*. 2019 Nov 15;11(11):2786. doi: 10.3390/nu11112786. PMID: 31731683; PMCID: PMC6893664.
44. Božović M, Pirolli A, Ragno R. *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) Essential Oil and Its Main Constituent Piperitenone Oxide: Biological Activities and Chemistry. *Molecules*. 2015 May 13;20(5):8605-33. doi: 10.3390/molecules20058605. PMID: 25985361; PMCID: PMC6272761.
45. Aguayo S, Marshall H, Pratten J, Bradshaw D, Brown JS, Porter SR, Spratt D, Bozec L. Early Adhesion of *Candida albicans* onto Dental Acrylic Surfaces. *J Dent Res*. 2017 Jul;96(8):917-923. doi: 10.1177/0022034517706354. Epub 2017 May 1. PMID: 28460191.
46. McManus BA, Coleman DC. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. *Infect Genet Evol*. 2014;21:166-178. doi:10.1016/j.meegid.2013.11.008
47. Rajkowska K, Otlewska A, Kunicka-Styczyńska A, Krajewska A. *Candida albicans* Impairments Induced by Peppermint and Clove Oils at Sub-Inhibitory Concentrations. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 19;18(6):1307. doi: 10.3390/ijms18061307. PMID: 28629195; PMCID: PMC5486128.
48. Benzaid C, Belmadani A, Djeribi R, Rouabhia M. The Effects of *Mentha x piperita* Essential Oil on *C. albicans* Growth, Transition, Biofilm Formation, and the Expression of Secreted Aspartyl Proteinases Genes.

- Antibiotics (Basel). 2019 Jan 30;8(1):10. doi: 10.3390/antibiotics8010010. PMID: 30704020; PMCID: PMC6466576.
49. 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.
50. Meraz Hernández, Alan Jocsan, sustentante Efecto antimicótico del aceite esencial de *Mentha spp* sobre polimetilmetacrilato / 2022.
51. 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 Aug 29;24(17):3148. doi: 10.3390/molecules24173148. PMID: 31470602; PMCID: PMC6749244.
52. Saharkhiz MJ, Motamedi M, Zomorodian K, Pakshir K, Miri R, Hemyari K. Chemical Composition, Antifungal and Antibiofilm Activities of the Essential Oil of *Mentha piperita* L. *ISRN Pharm*. 2012;2012:718645. doi: 10.5402/2012/718645. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23304561; PMCID: PMC3532871.