



Available online
<https://www.atrss.dz/ajhs>



Article Original

Formulation et évaluation d'un gel buccal à base d'huile essentielle d'arbre à thé pour le traitement des candidoses buccales

Formulation and evaluation of a tea tree oil-based buccal gel for treatment of oral candidiasis

Asma SIFOUR¹, Mohamed DJEBBAR¹, Roukaya MANSOUR² et Nacéra CHAFFAI¹

¹ Laboratoire de Pharmacie galénique, Faculté de Médecine, Université Badji Mokhtar, Annaba

² Laboratoire de Parasitologie, Centre Hospitalier Universitaire Ibn Rochd, Annaba

Asma SIFOUR¹ et Mohamed DJEBBAR¹ sont les auteurs principaux

RESUME

Introduction : Les candidoses buccales sont des affections opportunistes courantes en médecine dentaire. En raison de la résistance aux antifongiques de synthèse de certaines espèces du genre *Candida*, les patients s'orientent vers des traitements naturels à base d'huiles essentielles (HE). L'objectif de ce travail est de développer et d'évaluer un gel buccal à base d'HE à visée anti-candidosique. **Matériel et méthodes :** Afin de choisir l'HE la plus puissante, l'activité antifongique de trois HE, *Melaleuca alternifolia*, *Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* chémotype géraniole a été évaluée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) contre des espèces du genre *Candida*, selon la méthode de dilution en milieu solide. Ensuite, le comportement rhéologique de dispersions aqueuses de trois dérivés cellulose (CMC Na, HPMC 4000 et HEC 300), utilisés à différentes concentrations, a été étudié afin de sélectionner les formulations, type gel buccal, les mieux adaptées pour la réalisation de l'étude. Enfin, trois formulations de gels buccaux, F₁ (CMC Na), F₂ (HPMC), F₃ (HEC) ont été préparées et évaluées pour leurs paramètres physiques (aspect, pH, densité apparente, viscosité, extrudabilité, étalement), la teneur en HE, l'activité anti-candidosique *in vitro* et la stabilité à 40°C et à température de laboratoire. **Résultats :** L'HE d'arbre à thé a manifesté l'activité anti-candidosique la plus puissante. L'étude rhéologique des gels cellulose a permis de choisir trois formulations : (2% CMC Na), (4% HPMC) et (6% HEC). Le gel buccal à l'HE d'arbre à thé, F₃ a montré des propriétés organoleptiques et physicochimiques satisfaisantes avec une teneur élevée en actif naturel et une meilleure activité antifongique contre les levures de *Candida albicans*. F₃ a également démontré une stabilité physicochimique dans les conditions de l'étude. **Conclusion :** Il a été conclu que le gel buccal F₃ semble être une formulation prometteuse dans la prise en charge des mycoses buccales.

MOTS CLES: Mycoses buccales, gel buccal, huile essentielle d'arbre à thé, dérivés cellulose.

ABSTRACT

Introduction: Oral candidiasis is a common opportunistic condition in dentistry. Due to the resistance to synthetic antifungals of some species of the genus *Candida*, patients are turning to natural treatments based on essential oils (EO). The objective of this work is to develop and evaluate an EO-based oral gel for anti-candidus treatment. **Material and methods:** In order to choose the most potent EO, the antifungal activity of three EOs, *Melaleuca alternifolia*, *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris* chemotype geraniol was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) against species of the genus *Candida*, according to the method of dilution in solid medium. Then, the rheological behavior of aqueous dispersions of three cellulose derivatives (CMC Na, HPMC 4000 and HEC 300), used at different



concentrations, was studied in order to select the formulations, buccal gel type, the most adapted for the realization of the study. Finally, three oral gel formulations, F₁ (CMC Na), F₂ (HPMC), F₃(HEC) were prepared and evaluated for their physical parameters (appearance, pH, bulk density, viscosity, extrudability, spreadability), HE content, *in vitro* anti-candidus activity and stability at 40°C and laboratory temperature. **Results:** Tea tree EO showed the most potent anti-candidosis activity. The rheological study of cellulose gels allowed us to choose three formulations: (2% CMC Na), (4% HPMC) and (6% HEC). The oral gel with tea tree EO, F₃ showed satisfactory organoleptic and physicochemical properties with a high content of natural active ingredient and a better antifungal activity against *Candida albicans* yeasts. F₃ also showed physicochemical stability under the conditions of the study. **Conclusion:** It was concluded that F₃ oral gel seems to be a promising formulation in the management of oral mycoses.

KEYWORDS: ORAL MYCOSIS, ORAL GEL, TEA TREE ESSENTIAL OIL, CELLULOSE DERIVATIVES

* Auteur Corredpondant. Tel.:+213 797 238 997;
Adresse E-mail: mohamed_djebbar@yahoo.fr

Date de soumission : 02/10/2022
Date de révision : 12/12/2022
Date d'acceptation : 06/02/2023

DOI : 10.5281/zenodo.7613503

Introduction

Les candidoses sont des infections fongiques dues à des levures ubiquitaires appartenant au genre *Candida* [1,2]. Ces levures opportunistes font partie de la flore normale de la plupart des individus et vivent en commensales des muqueuses : buccale, du tube digestif, des voies urogénitales ou du revêtement cutané [3,4]. Suite à un déséquilibre de la flore normale (antibiothérapie, diabète mal contrôlé, radiothérapie...), les *Candida* se comportent en agents pathogènes responsables de mycoses superficielles ou profondes parfois potentiellement mortelles chez les sujets immunodéprimés [5,6]. Par ailleurs, il convient aussi de souligner que les candidoses buccales sont des affections opportunistes courantes en médecine dentaire. Elles représentent une partie importante des lésions des muqueuses buccales auxquelles le médecin-dentiste est confronté dans son activité quotidienne [7-9]. Les traitements classiques allopathiques consistent en la prise de médicaments antifongiques [10,11]. Dans la plupart des cas, les personnes sont soulagées de leurs symptômes. Cependant, face aux candidoses sévères et chroniques, le soulagement est de courte durée, notamment lorsque la cause du problème n'est pas traitée et, dans ce cas, la mycose récidive [7,12,13]. Pour pallier cette situation, une alternative fiable à l'usage des antifongiques de synthèse semble être celle des huiles essentielles (HE). Les patients s'orientent en effet, de plus en plus, vers des traitements naturels tels que la phytothérapie et l'aromathérapie afin d'éviter la récidive. Les mycoses peuvent ainsi être traitées, comme les infections bactériennes, avec certaines HE douées de propriétés antifongiques puissantes, excluant de cette manière les effets secondaires causés par les médicaments de synthèse tels que : sécheresse de la

bouche, décoloration de la langue, troubles du goût, etc. [14-17]. Parmi les HE les plus étudiées et actives contre les candidoses, nous pouvons citer l'HE de *Melaleuca alternifolia* connue sous le nom d'Arbre à thé « tea tree » [18-21], l'HE de *Eucalyptus globulus* [22] et l'HE de *Thymus vulgaris* [23]. Dans cette optique et en raison de la non-disponibilité sur le marché algérien de gels oraux naturels anti-candidosiques, notre travail a consisté à formuler un gel buccal à base d'huile essentielle à visée antifongique puissante, à évaluer son activité anti-candidosique *in vitro* et à étudier sa stabilité physico-chimique.

Matériels et Méthodes

1. Matières premières

Trois huiles essentielles fournies par Aromazone[®] (100% pures et naturelles) ont été testées pour leurs activités antifongiques : l'huile essentielle d'arbre à thé (*Melaleuca alternifolia*), l'huile essentielle de thym vulgaire à géraniole (*Thymus vulgaris* L. *geranioliferum*) et l'huile essentielle de l'eucalyptus globuleux (*Eucalyptus globulus*). Pour la formulation des gels buccaux, trois dérivés celluloses, l'hypromellose HPMC 4000 (Wolff cellulose), la carboxyméthylcellulosique sodique CMC Na (Sigma-Aldrich) et l'hydroxyéthylcellulose HEC 300 (Hecellosem) ont été employés comme gélifiants. Le PEG 300 (Fluka) a été utilisé comme co-solvant, la saccharine (Merck) comme agent édulcorant, la glycérine (Sigma-Aldrich) comme agent solubilisant et humectant, le benzoate de sodium (Verdugt) en tant que conservateur antimicrobien.

2. Méthodes

2.1. Choix de l'huile essentielle

Sur la base des données de la littérature [18-23], trois huiles essentielles douées d'activité antifongique ont été

sélectionnées à savoir : *Melaleuca alternifolia*, *Eucalyptus globulus* et *Thymus vulgaris* chémotype géraniole. Leur activité anti-candidosique a été évaluée contre les espèces du genre *Candida*, par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) selon le protocole opératoire suivant :

- *Réisolement des levures de Candida* : Quatre espèces du genre *Candida spp* provenant des prélèvements buccaux fournis par le laboratoire de Parasitologie et Mycologie médicales du Centre Hospitalier Universitaire Ibn Rochd (Annaba) : *Candida albicans*, *Candida kefyr*, *Candida dubliniensis* et *Candida tropicalis* ont été testées. Les souches ont été entretenues par repiquage sur milieu Sabouraud-Chloramphénicol et cultivées en aérobie à 37°C pendant 48 heures.

- *Détermination de la CMI* : selon la méthode de dilution en milieu solide adoptée dans de nombreux travaux [24-26] qui consiste à :

- *Préparer l'inoculum fongique* : une suspension de levures est préparée dans 5ml d'eau physiologique de façon à obtenir une suspension de $1,5 \text{ à } 2.10^6$ levures/ml. Il est à noter que la suspension est suffisamment agitée à l'aide d'un vortex.

- *Préparer le milieu de culture* : le milieu Sabouraud-Chloramphénicol est chauffé jusqu'à fusion, puis, l'émulsifiant Tween 80[®] (SCT 80/2%) est incorporé à une concentration de 2% afin de dissoudre les huiles essentielles dans le milieu. Un mélange est effectué pendant quelques minutes jusqu'à complète homogénéisation. Ensuite, le milieu obtenu est réparti dans des tubes à vis stériles de 20ml, puis stérilisés.

- *Méthode de dilution en milieu solide* : des dilutions en série 1:2 sont réalisées à partir des trois huiles essentielles. Ensuite, chaque HE est incorporée dans le milieu SCT80/2% au cours du refroidissement afin d'obtenir des dilutions de 32µl/ml à 0,5 µl/ml dans un volume final de 20 ml. Le mélange obtenu est agité et coulé en boîte de Pétri, puis, laissé refroidir à température ambiante.

Un témoin contenant seulement le milieu SCT80/2% (sans HE) est également réalisé pour mettre en évidence l'absence d'activité antifongique du Tween 80[®].

Enfin, pour évaluer l'activité antifongique de chaque HE par la détermination de la CMI, 4 isolats de *Candida* (*C. albicans*, *C. kefyr*, *C. dubliniensis* et *C. tropicalis*) sont utilisés dans la même boîte de Pétri avec un tracé de repiquage à quatre compartiments. Chaque compartiment est ensemencé par l'étalement de 20µl de la suspension fongique à l'aide d'une pipette Pasteur. Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées à 37°C

pendant 48 h. La concentration de l'huile essentielle la plus faible où la croissance n'est pas observée est considérée comme la CMI.

2.2. Formulation des gels buccaux

L'étude du comportement rhéologique de six agents gélifiants (naturel, semi-synthétique et synthétique), utilisés à différentes concentrations a été réalisée afin de sélectionner d'une part, les agents gélifiants les mieux adaptés pour la formulation des gels buccaux et, d'autres part, les concentrations adéquates :

- Gomme Xanthane : 1%, 2%, 4 % et 6%
- HPMC 5 E : 5% et 10%
- HPMC K4M : 2%, 3%, 4% et 6%
- HEC 300 : 4%, 6% et 7%
- CMC sodique : 1%, 2% et 3%
- Carbopol 940 : 0,2% et 0,3%

Ces essais préliminaires ont permis de sélectionner trois dérivés celluloseux : CMC Na à 2%, HPMC 4000 à 4% et HEC 300 à 6%. Trois formulations de gel buccal à base d'HE ont été établies. La composition qualitative et quantitative est illustrée dans le tableau 1. Le protocole de préparation peut être décrit de la manière suivante [27,28] :

- Dans un bécher, dissoudre la quantité requise de benzoate de sodium dans l'eau distillée chauffée à 90°C (70°C pour l'HEC), puis, ajouter l'agent gélifiant et agiter jusqu'à complète homogénéisation (mélange I) ;
- Dans un autre bécher, mélanger la glycérine, le PEG 300 et l'HE (mélange II) ;
- Sous agitation, additionner le mélange II au mélange I ;
- Ajouter la saccharine sous agitation continue jusqu'à l'obtention d'un produit homogène, puis, compléter à 100 g avec l'eau distillée et homogénéiser.
- Les préparations sont ensuite conditionnées dans des tubes de 50 g en aluminium recouverts intérieurement d'un vernis cuit.

2.3. Contrôle des gels buccaux

Les formulations préparées sont évaluées pour les caractéristiques organoleptiques (couleur, odeur, goût), l'homogénéité, le pH, la viscosité, l'étalement, l'extrudabilité, la teneur en actif naturel et l'activité antifongique *in vitro*. De plus, les gels buccaux ont fait l'objet d'études de stabilité accélérée (40°C) et en temps réel (température ambiante).

- *Caractères organoleptiques* : les gels buccaux sont inspectés d'un point de vue couleur, consistance, homogénéité et présence ou absence d'agrégats. Il est à préciser que la couleur a été vérifiée par examen visuel sur fond blanc.

Le goût a également été apprécié en dégustant la formulation. De même, l'odeur a été contrôlée en sentant le produit. Enfin, la consistance a été évaluée en appliquant le gel sur la peau [29-31].

Tableau 1 : Composition des gels buccaux

	F ₁	F ₂	F ₃
HE (%)	1	1	1
CMC Na (g)	2	-	-
HPMC 4000 (g)	-	4	-
HEC 300 (g)	-	-	6
PEG 300 (ml)	15	15	15
Glycérine (ml)	5	5	5
Benzoate de sodium(g)	0,5	0,5	0,5
Saccharine (g)	0,5	0,5	0,5
Eau distillée qsp	100 g	100 g	100 g

-*Examen microscopique* : l'examen d'un échantillon à l'aide d'un microscope optique Optika® B-350 (×10 ;×40) a permis de vérifier l'homogénéité et la présence ou l'absence des bulles d'air [28].

- *Mesure de pH* : à l'aide d'un pH-mètre InoLab® PH7110 en plongeant complètement l'électrode dans le gel. Le résultat est la moyenne de trois lectures. Rappelons que le pH de la cavité buccale est compris entre 6,2 et 7,4 [32].

- *Mesure de la viscosité* : à l'aide d'un viscosimètre à mobile tournant Fungilab® 9.A Visco Elit. Quatre vitesses de rotation sont utilisées : 50, 100, 150 et 200 rotations/minute. Les résultats sont exprimés par la moyenne de trois mesures en *mPa·s*.

- *Aptitude à l'étalement* : elle est réalisée selon la méthode des plaques parallèles modifiée [30,33]. Une quantité de 1 g de gel est déposé à l'intérieur du cercle de 1cm de diamètre pré-marqué sur une plaque en verre placée au-dessus d'un papier millimétré sur lequel des cercles de 1 à 14 cm de diamètre sont dessinés. Une seconde plaque en verre d'environ 240g de masse est déposée parallèlement sur la première plaque. Ensuite, un poids de 800 g est laissé reposer sur la plaque de verre supérieure pendant 5 min. L'augmentation du diamètre due à l'étalement du gel et la surface d'étalement sont notées. Les résultats obtenus sont la moyenne de trois déterminations.

- *Extrudabilité* : elle consiste à mesurer la quantité du gel extrudé à travers la pointe de 5 mm d'ouverture d'un tube en aluminium rempli de gel, lorsqu'une pression à la main est appliquée sur le tube en 10 secondes. Plus la quantité extrudée est grande, meilleure est l'extrudabilité [34,35].

- *Dosage* : la teneur des gels en HE d'arbre à thé est déterminée en dissolvant une quantité exactement pesée de gel, 1 g, dans 100 ml de tampon phosphate pH 6,8. Les solutions sont maintenues sous agitation pendant 4 heures, puis conservées pendant 6 heures pour une dissolution complète. Ensuite, l'absorbance de l'HE de l'échantillon est déterminée par rapport au tampon phosphate pH 6,8 comme blanc au maximum d'absorption λ_{max} 208 nm [31,36]. La teneur est calculée à partir de l'équation de régression linéaire de la droite étalon.

- *Evaluation de l'activité antifongique in vitro* : l'activité antifongique des gels buccaux est évaluée par la méthode de diffusion sur gélose selon la technique de « Cup plate ». À l'aide de l'emporte-pièce stérile, appliquer dans la gélose (SCT 80/2 %) des puits de 6 mm de diamètre et 5mm de profondeur. Une quantité de l'ordre de 0,5 g de gel est versée dans ces coupelles forcées dans de la gélose préalablement ensemencée avec une suspension de levures de genre *Candida*. Quatre boîtes de pétrie sont ensemencées pour chacune des espèces suivantes : *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* et *C. dubliniensis*. Après 2 heures de diffusion, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48h [37]. Précisons que le Daktigel® 2% est utilisé comme témoin positif. Il s'agit d'un antifongique synthétique à base de Miconazole à visée anti-candidosique, fabriqué par le laboratoire Néomedic, Constantine, Algérie.

- *Etude de stabilité* : les trois gels buccaux F₁ (CMC Na), F₂ (HPMC) et F₃ (HEC) ont fait l'objet d'une étude de stabilité sous deux conditions : stabilité accélérée à 40°C pendant 1, 3 et 6 mois et stabilité en temps réel (à température ambiante) pendant 3 et 6 mois. Les préparations ont été contrôlées pour leurs caractères organoleptiques, le pH, la densité relative et la teneur en HE.

2.4. Traitement statistique

L'interprétation et la comparaison des résultats des contrôles réalisés sur les gels buccaux lors des études de stabilité ont été réalisées à l'aide du logiciel informatique GraphPadPrism 7. Les analyses statistiques ont été effectuées par l'analyse de variance (ANOVA) à un facteur. Les différences ont été considérées significatives à $p < 0,05$ dans un intervalle de confiance de 95%.

Résultats & Discussion

1. Évaluation de l'activité antifongique *in vitro* des HE

Les résultats de lecture de la CMI, pour chaque HE, contre les quatre souches de *Candida*, après 48 h d'incubation à 37°C sont indiqués au tableau 2.

Tableau 2 : CMI des HE étudiées (µl/ml)

	HE* Arbre à thé	HE* Thymvulgaire	HE Eucalyptus globuleux
<i>C. albicans</i>	8	8	> 32
<i>C. kefyr</i>	8	8	16
<i>C. dubliniensis</i>	8	8	8
<i>C. tropicalis</i>	2	4	16

*Excellent pouvoir inhibiteur

Selon l'interprétation des tests de sensibilité en aromathérapie, une CMI inférieure à 50 µl/ml témoigne un excellent pouvoir inhibiteur de l'huile essentielle testée [25]. Les valeurs des CMI des trois HE démontrent un pouvoir inhibiteur certain contre les levures testées du genre *Candida* (tableau 2). En effet, sur les différentes espèces de *Candida*, les CMI sont de 2 à 8 µl/ml pour l'HE d'arbre à thé, de 4 à 8 µl/ml pour l'HE de thym vulgaire et de 8 à > 32 µl/ml pour l'HE de *Eucalyptus globulus*. Il est à noter que l'HE d'eucalyptus globuleux est celle qui manifeste la moindre activité fongique contre *Candida albicans* (CMI > 32 µl/ml). Au vu de ces résultats, la fraction aromatique de l'arbre à thé semble être intéressante par son pouvoir antifongique puissant démontré. Par conséquent, l'huile essentielle d'arbre à thé est choisie comme substance active naturelle pour la préparation de notre gel buccal à visée anticandidosique.

2. Contrôle des gels buccaux

Les gels buccaux à base de l'HE d'arbre à thé ont subi un contrôle après 24 heures.

- *Caractères organoleptiques* : pour les trois formules, l'examen macroscopique montre des préparations visqueuses blanchâtres, homogènes, lisses, sans grumeaux au toucher, avec une odeur caractéristique de l'HE d'arbre à thé et un goût agréable légèrement édulcoré.

- *Examen microscopique* : cet examen a montré des gels homogènes avec la présence de quelques bulles d'air.

- *Mesures des pH et des densités relatives* : les valeurs de pH reportées au tableau 3 indiquent des gels légèrement acides (5,25 - 5,56). Aussi, d'après les résultats du tableau 3, la densité des gels buccaux est légèrement supérieure à 1 g/cm³. Elle se situe entre 1,021 et 1,108

g/cm³. La formulation F₁ présente la densité la plus élevée ; 1,108 g/cm³, sachant que celle-ci dépend de la composition qualitative et quantitative du gel buccal.

- *Mesure de la viscosité* : La figure 1 représente les courbes d'écoulement des trois gels étudiés en termes de viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement.

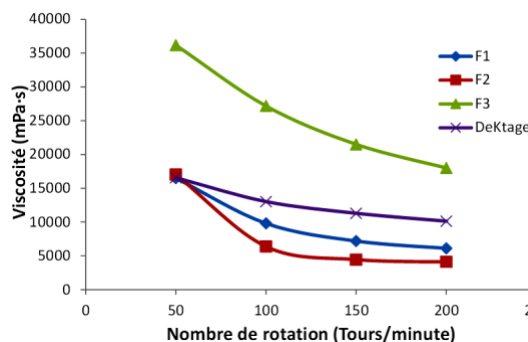


Figure 1 : Rhéogrammes des gels buccaux formulés

Une exigence importante pour un gel à usage buccal est sa viscosité. Elle doit se situer dans une plage qui permet une application facile et une bonne adhérence au site d'application (Viscosité optimale). Les valeurs de viscosité des trois formulations sont comprises entre 4109,8 et 36 182 mPa.s. Le gel buccal F₃ préparé avec l'HEC manifeste la viscosité la plus élevée, suivi du gel buccal F₁ « CMC Na », puis, le gel buccal F₂ « HPMC 4000 » (F₃ > F₁ > F₂). La figure 2 montre que la viscosité des trois formulations diminue lorsque le taux de cisaillement augmente. Ceci signifie que les gels manifestent un comportement *non-newtonien pseudoplastique*. Cette constatation corrobore les résultats des travaux de Perinelli D.R. et al portant sur l'évaluation des propriétés rhéologiques des agents gélifiants celluloseux utilisés dans la formulation des gels pour friction hydro-alcoolique [41].

- *Aptitude à l'étalement* : Les surfaces occupées par les préparations sont données dans le tableau 3. Le diamètre moyen de la zone d'étalement pour toutes les formulations se trouve dans la plage 6,50 - 6,70 cm et donc une surface correspondante à 33,20 - 35,27 cm². Une diminution de la surface d'étalement avec l'augmentation de la viscosité a été observée avec le gel buccal F₃ présentant la viscosité la plus élevée et, par conséquent, la surface d'étalement la plus faible. Contrairement à F₃, la formulation F₂ présente la viscosité la plus faible et la surface d'étalement la plus élevée. Ainsi, les gels formulés peuvent être classés selon leur aptitude d'étalement comme suit : F₂ > F₁ > F₃. Des résultats similaires ont été constatés par Kassab Hanan Jalal et al. [30] avec des gels parodontaux bioadhésives à base de gatifloxacine et différents polymères (Carbopol

940, CMC et HPMC) où le gel présentant la viscosité la plus élevée montre le plus faible étalement. Les mêmes résultats ont également été obtenus avec un gel oral formulé par Richa Sing et al. [38] à base d'extraits de feuilles de *Psidiumguajava* Linn et de rhizomes de *Curcuma longa* Linn pour le traitement d'ulcères buccaux.

- *Extrudabilité* : Selon les résultats représentés dans le tableau 3, les gels buccaux extrudent des tubes de manière satisfaisante. L'extrudabilité des trois formulations suit l'ordre suivant : $F_2 > F_1 > F_3$. Il est par conséquent évident que l'extrudabilité est inversement proportionnelle à la viscosité. Des résultats similaires ont été obtenus avec un gel oral formulé par Magbool F et al. [39] à base de Carbopol 940 et de gomme xanthane utilisés comme gélifiants où l'extrudabilité diminue avec l'augmentation de la concentration en polymère et donc l'augmentation de la viscosité. Des observations identiques ont également été démontrées par Agnihotri S et al. [40] avec un gel à base de *Myrica esculenta* où l'extrudabilité des formulations augmentait avec la diminution de la viscosité *et vice versa*.

- *Dosage* : les teneurs en HE ont été déterminées par spectrophotométrie UV visible et calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage (figure 2).

A la longueur d'onde analytique $\lambda_{max}=208$ nm, la courbe d'étalonnage est une droite qui obéit à la loi de Beer-Lambert. L'HE d'arbre à thé dissoute dans un milieu tampon phosphate pH 6,8 a démontré une linéarité entre 0,04 et 0,20 $\mu\text{l/ml}$.

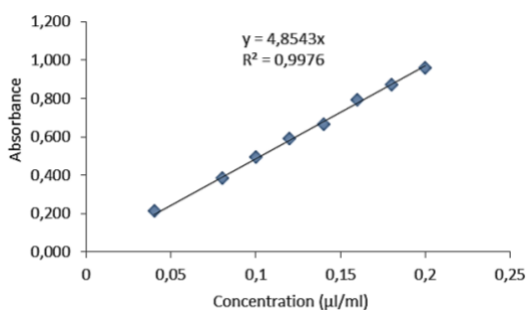


Figure 2 : Courbe d'étalonnage de l'HE d'arbre à thé à pH 6,8

Le coefficient de corrélation R^2 , indicateur, permettant de juger la qualité d'une régression linéaire, est significatif ($> 0,99$).

Les trois gels buccaux préparés F_1 , F_2 et F_3 ont démontré des teneurs en HE respectives de l'ordre de : $100,54 \pm 1,47$, $101,96 \pm 1,34$, $101,78 \pm 0,02$. Les valeurs obtenues témoignent donc l'absence de dégradation ou d'évaporation de l'HE pendant le processus de préparation.

- *Evaluation de l'activité antifongique in vitro* : Les diamètres moyens des zones d'inhibition observées après 48 heures d'incubation à 37°C sont représentés par la figure 3.

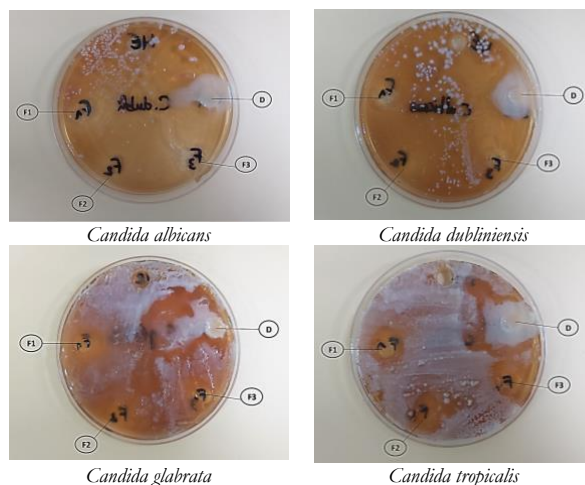


Figure 3 : Effet inhibiteur des gels sur les isolats fongiques selon la méthode des puits

Comparativement au médicament témoin Daktigel[®], les gels buccaux à base d'HE d'arbre à thé ont montré une activité fongicide *in vitro* sur toutes les espèces de *Candida* testées. Les trois formulations ont en effet manifesté une zone d'inhibition dont le diamètre varie de 6 mm à 40 mm, tandis que le gel à base de Miconazole a montré une zone d'inhibition d'un diamètre compris entre 6 mm et 30 mm. Il ressort également de l'étude que toutes les formules préparées, F_1 , F_2 et F_3 inhibent *Candida albicans*, l'espèce responsable de 80% des candidoses buccales. Par rapport à cette espèce, l'activité fongicide des gels buccaux formulés est selon l'ordre suivant : $F_3 > F_2 > F_1$. Le gel buccal F_3 a effectivement manifesté la zone d'inhibition la plus élevée, 40 mm contre la *Candida albicans*, comparativement à F_1 et F_2 qui ont montré une zone d'inhibition de 8 mm et 18 mm respectivement. Le gel à base de Miconazol quant à lui a montré un diamètre d'inhibition de 30mm contre cette espèce. Concernant la *Candida glabrata*, les gels buccaux F_1 et F_2 présentent la plus grande activité antifongique avec 12 mm de diamètre de zone d'inhibition. Cependant, le gel buccal F_3 ainsi que le médicament témoin ont manifesté un diamètre de 8 mm contre cette espèce. Vis-à-vis de *Candida tropicalis*, les gels buccaux développés ainsi que le médicament Dektigel[®] présentent tous la même activité antifongique avec une zone d'inhibition de 6mm de diamètre. Enfin et comparativement aux espèces de *Candida*, *glabrata* et *tropicalis*, au contact de *Candida dubliniensis*, des zones d'inhibition plus élevées sont observées avec F_1 , F_2 , F_3 et le Dektigel[®] dont les diamètres sont de l'ordre de 16 mm, 14 mm, 20 mm et

28 mm respectivement. Au vu de toutes ces observations, il a été conclu que le gel buccal F₃ paraît posséder la meilleure activité fongicide *in vitro* contre les candidoses buccales.

3. Étude de stabilité

- *Stabilité accélérée* : les résultats de l'étude de stabilité après un, trois et six mois de stockage à 40°C sont indiqués dans le tableau 4a.

Après six mois de conservation à 40°C, les propriétés organoleptiques (couleur, odeur et goût) des trois formules n'ont présenté aucun changement. Les préparations sont blanchâtres, homogènes à odeur caractéristique de l'HE d'arbre à thé, avec un goût agréable sucré. Exception faite pour F₂ contenant l'HPMC, où une augmentation de la consistance du gel (durcissement) a été constatée dès le 3^{ème} mois, les autres formules F₁ (CMC Na) et F₃ (HEC) ont démontré une stabilité d'un point de vue consistance.

Les valeurs de pH après six mois de stockage à 40°C varient très faiblement. Aucune différence significative n'a été notée par rapport au pH initial ($p \geq 0,05$). Les formulations F₁, F₂ et F₃ ont en effet montré des pH qui varient de : 5,56 à 5,65 ; 5,25 à 5,51 et 5,38 à 5,42 respectivement.

En ce qui concerne la densité relative, après six mois de stockage à 40°C, les trois préparations présentent des densités qui varient faiblement. Aucune différence significative n'a été notée par rapport aux valeurs initiales ($p \geq 0,05$). En effet, la densité varie de 1,108 à 1,051 pour F₁ (CMC Na), de 1,021 à 1,0797 pour F₂ (HPMC) et de 1,092 à 1,0183 pour F₃ (HEC).

Enfin, après six mois de conservation à 40°C, les teneurs en actif naturel pour les 3 formules F₁, F₂ et F₃ se situent dans un intervalle variant de 100,54 à 80,46%, 101,96 à 79,04% et 101,78 à 95,49% respectivement. La formulation F₃ (HEC 300) a présenté la teneur la plus élevée en HE (baisse de titre < 5%) tandis que les formulations F₁ (CMC Na) et F₂ (HPMC 4000) ont enregistré une baisse importante de la teneur en HE de l'ordre de -20% (baisse de titre >5%) ($p < 0,05$). Cette

baisse de titre suppose une dégradation de l'huile essentielle en présence des deux agents gélifiants : la carboxyméthylcellulose sodique et l'hydropromellose.

- *Stabilité en temps réel* : Les résultats de stabilité après trois et six mois de stockage à température ambiante sont indiqués dans le tableau 4b.

Après six mois de conservation à température ambiante, aucun changement des propriétés organoleptiques (couleur, odeur et goût) des trois formules n'a été observé. Les préparations sont restées blanchâtres, homogènes à odeur caractéristique de l'HE d'arbre à thé et un goût agréable sucré. Par ailleurs, pour F₂, de la même manière que l'étude de stabilité accélérée, il a été noté une augmentation de sa consistance (légère), mais dans ce cas, dès le 6^{ème} mois.

Après six mois de stockage à température ambiante F₁, F₂ et F₃ affichent des valeurs de pH qui jalonnent de 5,56 à 5,79 ($p \geq 0,05$) ; de 5,25 à 5,23 ($p \geq 0,05$) et de 5,38 à 5,45 ($p \geq 0,05$) respectivement.

Concernant la densité relative, après six mois de conservation à température de laboratoire, les trois formulations ont présenté des densités qui varient faiblement : 1,108 à 1,085 pour F₁ (CMC Na), 1,021 à 1,048 pour F₂ (HPMC) et de 1,092 à 1,082 pour F₃ (HEC). Aucune différence significative n'a été notée par rapport aux valeurs initiales ($p \geq 0,05$).

Enfin, après six mois de conservation à température ambiante, les teneurs en actif naturel pour les 3 formulations F₁ (CMC Na), F₂ (HPMC) et F₃ (HEC) se situent dans un intervalle variant de 100,54 à 81,66% ($p < 0,05$), 101,96 à 90,59% ($p < 0,05$) et 101,78 à 99,34% ($p \geq 0,05$) respectivement. Comme pour la stabilité accélérée, F₁ et F₂ ont enregistré une baisse importante de la teneur en HE de l'ordre de 20% et 10% respectivement. Cette baisse de teneur suppose l'existence d'une éventuelle incompatibilité physico-chimique entre l'HE d'arbre à thé et les deux agents gélifiants HPMC et CMC Na.

Tableau 3 : Caractéristiques des gels buccaux

Formulation	pH	Densité relative (g/cm ³)	Surface d'étalement (cm ²)	Quantité extrudée (g)
F ₁	5,56 ± 0,02	1,108 ± 0,049	34,91 ± 0,60	4,69 ± 0,67
F ₂	5,25 ± 0,01	1,021 ± 0,061	35,27 ± 3,16	4,71 ± 1,57
F ₃	5,38 ± 0,02	1,092 ± 0,006	33,20 ± 2,10	4,62 ± 0,37
Daktigel	5,82 ± 0,01	1,220 ± 0,044	35,96 ± 0,61	10,31 ± 0,84

Tableau 4 : Résultats de l'étude de stabilité**4.a)** Stabilité accélérée à 40°C

	Code	Caractères organoleptiques	pH	Densité (g/cm ³)	Teneur HE (%)
J ₃₀	F ₁	Aucun changement	5,65 ± 0,02	1,092 ± 0,051	98,18 ± 0,03
	F ₂	Aucun changement	5,37 ± 0,01	1,060 ± 0,095	100,15 ± 0,01
	F ₃	Aucun changement	5,30 ± 0,004	1,098 ± 0,059	100,77 ± 0,01
J ₉₀	F ₁	Aucun changement	5,60 ± 0,04	1,084 ± 0,122	81,33 ± 0,009
	F ₂	Durcissement important	5,24 ± 0,01	1,051 ± 0,061	98,27 ± 0,008
	F ₃	Aucun changement	5,35 ± 0,01	1,101 ± 0,041	99,86 ± 0,002
J ₁₈₀	F ₁	Aucun changement	5,65 ± 0,06	1,051 ± 0,09	80,46 ± 3,6
	F ₂	Durcissement important	5,51 ± 0,41	1,079 ± 0,04	79,04 ± 0,91
	F ₃	Aucun changement	5,42 ± 0,024	1,018 ± 0,061	95,49 ± 5,46

4.b) Stabilité à température ambiante

	Code	Caractères organoleptiques	pH	Densité (g/cm ³)	Teneur HE (%)
J ₉₀	F ₁	Aucun changement	5,68 ± 0,01	1,083 ± 0,012	81,89 ± 0,01
	F ₂	Aucun changement	5,26 ± 0,01	1,068 ± 0,049	100,15 ± 0,01
	F ₃	Aucun changement	5,36 ± 0,04	1,086 ± 0,066	99,05 ± 0,01
J ₁₈₀	F ₁	Aucun changement	5,79 ± 0,01	1,085 ± 0,09	81,66 ± 3,17
	F ₂	Léger durcissement	5,23 ± 0,02	1,048 ± 0,041	90,5 ± 1,16
	F ₃	Aucun changement	5,45 ± 0,01	1,082 ± 0,091	99,3 ± 3,44

Conclusion

L'étude réalisée dont l'objectif était de mettre au point un gel buccal à base de l'huile essentielle d'arbre à thé à visée antifongique a révélé l'influence de la nature de l'agent gélifiant sur la stabilité des formulations développées. Le gel buccal F₃ renfermant l'HEC comme agent gélifiant a montré de bonnes propriétés organoleptiques (bel aspect, homogène, goût agréable et odeur caractéristique de l'HE) et physico-chimiques (viscosité adéquate, étalement suffisant, extrudabilité facile, pH acceptable), une teneur exacte en actif naturel ainsi qu'une meilleure activité antifongique contre les levures de *Candida albicans*, agent responsable de 80% des candidoses buccales. Les études de stabilité

réalisées ont également permis de conclure à une stabilité physico-chimique de la formulation F₃ pendant six mois de conservation sous différentes conditions. Une durée de validité équivalente à 24 mois pourrait donc être attribuée à cette formulation.

Conflits d'intérêt

Les auteurs déclarent ne pas avoir d'intérêt avec un organisme privé, industriel ou commercial en relation avec le sujet présenté.

Références

- Lopes JP et Lionakis MS (2022). Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*, *Virulence*, 13 (1), pp: 89-121.
- Hellstein, JW et Marek CL (2019). Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity, Head and Neck Pathology, 13 (1), pp: 25–32.
- Nivoix Y, Levêque D et al (2018). Traitement des infections fongiques invasives et superficielles in Chapitre 51, Pharmacie clinique et thérapeutique, France, Elsevier Masson édition, pp : 893-924.
- Vila T, Sultan AS et al (2020). Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity, *Journal of Fungi*, 6 (1), pp: 1-28.
- Béatrice Thivichon-Prince et Brigitte Alliot-Licht, (2019). La bouche de l'enfant et de l'adolescent, France, Elsevier Masson édition, pp : 203-248.
- Özdamar Z, Özdamar U, Ünlü Ö et al (2022). Synergistic effect of thymoquinone and nystatin in the treatment of oral candidiasis; an in vitro study, *Odontology*, 110 (1), pp: 330-337.
- Quindós G, Gil-Alonso S et al (2019). Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs, *Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 24(2), pp: 172–180.
- Hato H, Sakata K, Sato J, Hasebe A, Yamazaki Y et Kitagawa Y (2022). Factor associated with oral candidiasis caused by co-infection of *Candida albicans* and *Candida glabrata*: A retrospective study, *Journal of Dental Sciences*, 17 (3), pp: 1458-1461.
- Hu L, He C, Zhao C, Chen X, Hua H, Yan Z (2019). Characterization of oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases, *Microbial Pathogenesis*, 134, 103575, pp: 1-5.
- Francisconi RS, Maquera-Huacho PM, Tonon CC et al (2020). Terpinen-4-ol and nystatin co-loaded precursor of liquid crystalline system for topical treatment of oral candidiasis, *Scientific Reports*, 10 (1), pp: 1-12.
- Fang J, Huang B, Ding Z (2021). Efficacy of antifungal drugs in the treatment of oral candidiasis: A Bayesian network meta-analysis, *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 125 (2), pp: 257-265.
- Darwazeh AMG and Darwazeh TA (2014). What Makes Oral Candidiasis Recurrent Infection? A Clinical View, *Journal of Mycology*, pp: 1-5.
- Martins N, Ferreira I.C.F.R., Barros L. et al (2014). Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia* 177, pp 223–240.
- Miranda-Cadena K, Marcos-Arias C, Mateo E, Aguirre-Urizar JM, Quindós Get Eraso E (2021). In vitro activities of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol against *Candida* biofilms, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Volume 143, pp: 1-10.
- Carolina Yoshi Campos Sugio¹, Maria Gabriela Robles Mengoa, Anna Clara Gurgel G et al (2020). Use of Natural Products in the Prevention and Treatment of Denture Stomatitis. *Journal of biomedical science*, 2 (1) pp: 201-206.
- Ferreira EDS, Rosalen PL, Benso B, de Cássia Orlandi Sardi J, Denny C et al (2021). The Use of Essential Oils and Their Isolated Compounds for the Treatment of Oral Candidiasis: A Literature Review, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp: 1-16.
- Goetz P (2014). Phytothérapie des mycoses à *Candida*. *Phytothérapie*, édition ©Springer-Verlag France, 12, pp : 242-244.
- Bona E, Cantamessa S, Pavan M, Novello G, Massa N, Rocchetti A, Berta G and Gamalero E (2016). Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents ? *Journal of Applied Microbiology*, 121 (6), pp : 1530-1545.
- Lydiawati E, Listiawan MY et al (2020). In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of Tea Tree Oil (TTO) 5% Compared with Nystatin against *Candida* sp. as Important Agent of Oral Candidiasis in HIV/AIDS Patients, *Periodical of Dermatology and Venereology*, 32 (3), pp : 189-194.
- Laffleur F, Ataii Met Nagler M (2021). Evaluation of cellulose based films comprising tea tree oil against dermatophytes and yeasts, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 167, pp:1-7.
- Brun P, Bernabè G, Filippini R et Piovan A (2019). In Vitro Antimicrobial Activities of Commercially Available Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Essential Oils. *Current Microbiology*, 76 (1), pp: 108-116.
- Lobstein A, Couic-Marinière F et Koziol N (2018). Huile essentielle d'*Eucalyptus globulus*. *Actualités pharmaceutiques*, édition Elsevier Masson SA, France, N° 573, pp: 59-61.
- Almanea A, Abd El-Aziz GS et al (2019). The Potential Gastro-intestinal Health Benefits of *Thymus Vulgaris* Essential Oil: A Review, *Biomedical & Pharmacology Journal*, Volume 12, numéro 4, pp 1793-1799.
- Dahraoui S, El Abbassi S, Kabbage S et al (2016). Evaluation in vitro de l'activité anticandidosique des huiles essentielles de cannelle, de girofle et d'arbre à thé. *Journal of medical mycology*, 26 (2), P 23.
- Srifi A, Rahmouni B, Boudida El H et al (2013). Etude phytochimique et activité antifongique in vitro des huiles essentielles de quatre espèces du genre *Nepta* du Maroc. *Phytothérapie*, Springer© – Verlag, France, 11, pp: 161 – 171.
- Oourahim A, Tlili Ait-Kaki Y et al (2015). Activité antioxydante et anti-candidosique de l'huile essentielle de *Laurus nobilis* L. provenant de la région d'El Kala (Nord-Est Algérien), *Algerian Journal of Natural Products*, 3(3), pp : 209-216.

27. Aslani A, Zolfaghari B, Davoodvandi F (2016). Design, Formulation and Evaluation of an Oral Gel from Punica Granatum Flower Extract for the Treatment of Recurrent Aphthous Stomatitis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 6(3), pp 391-398.
28. Aslani A, Zolfaghari B et Fereidani Y (2018). Design, Formulation and evaluation of a herbal gel contains melissa, sumac, licorice, rosemary and geranium for treatment of recurrent labial herpes infections. *Dental Research Journal*, 15 (3), pp 191-200.
29. Shende V (2018). Formulation and evaluation of herbal tooth gel containing Aloe vera: Compared study with marketed preparations, *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 5 (1), pp: 206-264.
30. Hanan Jalal Kassab, Lena Murad Thomas, Saba Abdulhadi Jabir (2017). Development and physical characterization of periodontal bioadhesive gel of gatifloxacin. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 9(3), pp: 31-36.
31. Voleti VK, Shaik SB, Konduru C, Peyam S, Yaramsetti CK, Pasala Set al (2016). Formulation and development of dental gel containing clove oil for the treatment of human periodontal diseases. *Journal of Comprehensive Pharmacy*, 3(1), pp: 1-7.
32. Sherwood L (2015). *Physiologie humaine, édition Nouveaux Horizons- ARS, Paris, 3ème édition*, pp 443-445.
33. Shailendra Kumar Sah et al (2017). Development and evaluation of tioconazole loaded emulgel, *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 9(5), pp 83-90.
34. Jadhav Ravindra T et al (2011). Formulation and Evaluation of Semi-solid preparation (Ointment, Gel & Cream) of Thiocolchicoside. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 8 (01), pp: 1-7.
35. Thakur V, Prashar B et Arora S (2012). Formulation and in vitro Evaluation of Gel for Topical Delivery of Antifungal Agent Fluconazole Using Different Penetration Enhancers. *Drug Invention Today*, 4(8), pp 414-419.
36. Pawar Vinita A, Bhagat T et al (2013). Formulation and evaluation of dental gel containing essential oil of coriander against oral pathogens, *International Research Journal of Pharmacy*, 4 (10), pp: 48-54.
37. Harish N M, Prabhu P, Charyulu R N et al (2009). Formulation and evaluation of in situ gels containing Clotrimazole for oral candidiasis. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71 (4), pp: 421-427.
38. Richa Singh, Sagar Bansal et al (2020). Formulation and evaluation of herbal oral gel containing extracts of powdered Psidium guajava Linn leaves with Curcuma longa Linn rhizomes to treat mouth ulcer, *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences*, 11 (3), pp: 8133-8141.
39. Magbool FF, Elnima EI et al (2018). Design, formulation and evaluation of Carbopol 940 and xanthan gum as gel bases for oral local drug delivery for oral mucosal infectious diseases ; *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 5 (10), pp : 09-21.
40. Agnihotri S, Wakode S et Agnihotri A (2016). Formulation and evaluation of herbal antiacne gel of myricaesculenta. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*, 9 (4), pp: 358-361.
41. Perinelli D.R. et al (2021). Rheological properties of cellulosic thickeners in hydro-alcoholic media: The science behind the formulation of hand sanitizer gels. *International Journal of Pharmaceutics* 604, 12076.