



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
MAESTRÍA EN ENDODONCIA**

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN
MÍNIMA INHIBITORIA Y MÍNIMA BACTERICIDA DEL
TIMOL EN PATÓGENOS ENDODÓNTICOS,
ESTUDIO “*IN VITRO*”**

C.D Mariana Ángeles Vázquez

Tesis presentada para optar por el título de Maestra en Endodoncia

Junio 2022, Maestría en Endodoncia, UASLP, México

DIRECTOR.....Ricardo Oliva Rodríguez PhD

ASESOR.....Selene Velázquez Moreno MSc

ASESOR.....Jairo Mariel Cárdenas PhD

Junio 2022, Maestría en Endodoncia, UASLP, México.



C.D. Mariana Ángeles Vázquez

Tesis presentada para optar por el título de Maestro en Endodoncia

Junio 2022, Maestría en Endodoncia, UASLP, México. Todos los derechos reservados

DIRECTOR

Ricardo Oliva Rodríguez PhD

Profesor – Investigador
Maestría en Endodoncia
Facultad de Estomatología, U.A.S.L.P.
San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

ASESOR

**Selene Velázquez Moreno
MSc.**

Profesor de Endodoncia
Maestría en Endodoncia
Facultad de Estomatología, U.A.S.L.P.
San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

ASESOR

Jairo Mariel Cárdenas PhD

Profesor – Investigador
Maestría en Ciencias Odontológicas
San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

Junio 2022, Maestría en Endodoncia, UASLP, México



DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y MÍNIMA BACTERICIDA DEL TIMOL EN PATÓGENOS ENDODÓNTICOS, ESTUDIO “*IN VITRO*”

Trabajo de Grado Aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia, por las siguientes autoridades:

CMF. Ricardo Martínez Rider
Director de la Facultad de Estomatología

PhD. Yolanda Hernández Molinar
Jefa de la División de Posgrados de la Facultad de Estomatología

MSc. María Verónica Méndez González
Coordinadora de la Maestría en Endodoncia

Junio 2022, Maestría en Endodoncia, UASLP, México



DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y MÍNIMA BACTERICIDA DEL TIMOL EN PATÓGENOS ENDODÓNTICOS, ESTUDIO “*IN VITRO*”

Trabajo de Grado Aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia, por los siguientes asesores.

Ricardo Oliva Rodríguez PhD.
DIRECTOR

Selene Velázquez Moreno MSc.
ASESOR

Jairo Mariel Cárdenas PhD.
ASESOR

Junio 2022, Maestría en Endodoncia, UASLP, México



DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y MÍNIMA BACTERICIDA DEL TIMOL EN PATÓGENOS ENDODÓNTICOS, ESTUDIO “*IN VITRO*”

Trabajo de Grado Aprobado para su presentación en el nombre de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Estomatología, Maestría en Endodoncia, por el siguiente jurado.

María Verónica Méndez González

Mariana Gutiérrez Sánchez

Ricardo Oliva Rodríguez PhD.

Junio 2022, Maestría en Endodoncia, UASLP, México

Dedicatoria

A mi hijo Santiago, porque a pesar de su corta edad ha sabido entender por qué tuve que estar lejos durante mi periodo en la Maestría, por ser mi razón de ser y por ser la fuerza más grande que me impulsa a seguir adelante y a cumplir todas mis metas. Estoy orgullosa de ti, eres un niño muy valiente, sé que no ha sido fácil este camino que hemos recorrido lejos físicamente, pero unidos de corazón. TE AMO.

A mis padres, por el apoyo incondicional que me han dado toda la vida, por ser mi brújula que ha guiado mis pasos desde siempre, no cabe duda que sin ustedes no estaría en donde estoy ahora, todo lo que soy es por y para ustedes. LOS AMO.

A mi hermano, porque eres y serás parte importante en mi vida, porque todos mis logros en la vida son también los suyos. TE AMO HERMANO.

Todo lo que soy en la vida es por y para ustedes, son mi más grande motivo para cumplir todas mis metas. LOS AMO INFINTAMENTE.

Agradecimientos

Dr. Ricardo Oliva Rodríguez, gracias por su orientación, por guiarme y apoyarme en la realización de este trabajo, sin su apoyo definitivamente esto no sería posible, gracias también por todas sus enseñanzas en endodoncia, me llevo conocimiento muy valioso.

Dra. Selene Velázquez, Gracias por todo el apoyo que me brindaste en este camino llamado tesis, gracias por tu disposición en todo momento, no cabe duda que aparte de ser una excelente maestra eres una maravillosa persona, llegué al laboratorio sin saber con qué me encontraría y encontré una gran amistad. Gracias por preocuparte por mí en mis momentos de más estrés, por nunca haberme soltado y siempre haber estado para ayudarme. Sin duda voy a extrañar esas tardes de platicas y risas en el laboratorio. Todos deberían de tener Maestros como tú en su vida. Te admiro y te voy a extrañar mucho.

Dra. Mariana Gutiérrez Sánchez, Gracias por su apoyo durante este proceso de tesis, por brindarme su ayuda de manera desinteresada, por todos los consejos que compartió conmigo, no solo los académicos, sino también los personales. Es una gran profesora y sobre todo gran persona.

Marivi, gracias por ser una parte tan importante en mi vida, por ser mi mejor amiga, mi confidente y mi cómplice, definitivamente agradezco a la vida por poner a alguien como tú en mi camino, gracias por siempre alentarme a seguir adelante, por haber sido parte de esta etapa en mi vida, porque a pesar de que estuvimos lejos en distancia nunca te alejaste de corazón, gracias por tus consejos, por escucharme en mis momentos de estrés. Gracias por estar, todos deberían de tener una Marivi en su vida. Te quiero muchísimo.

A mis compañeros de la Maestría E29, Mario, Connie, Lau, Griz, Lalo, Jenny y Elia, gracias por ser lo más cercano a una familia en San Luis, por aligerar la carga y por compartir tantos momentos en este camino, los voy a extrañar mucho. Definitivamente aprendí mucho de cada uno de ustedes, agradezco a la vida por haber cruzado nuestros caminos, no cabe duda que si tuviera que volver a cursar la Maestría, la volvería a cursar con ustedes.

Lili y Aida, gracias por su amistad tan bonita, por haber sido mis cómplices durante la Maestría y por haber hecho mi estancia en San Luis tan divertida, me llevo todas esas historias y anécdotas de todo los que vivimos. La quiero y las voy a extrañar mucho.



Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos, estudio “in vitro” by Mariana Ángeles Vázquez is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “*In Vitro*”

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA Y MÍNIMA BACTERICIDA DEL TIMOL EN PATÓGENOS ENDODÓNTICOS, ESTUDIO “*IN VITRO*”

M.E. Mariana Ángeles Vázquez

Maestría en Endodoncia
Facultad de Estomatología
Universidad Autónoma de San Luis Potosí

San Luis Potosí, México
Junio 2022

OBJETIVO: Determinar la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos.

METODOLOGÍA: Se realizó el método de microdilución en caldo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB). Se realizaron diluciones seriadas (3333.33-0.003 µg/mL) Luego de 24 horas de incubación, se colocó la placa de 96 pocillos en el espectrofotómetro de placas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer), a una longitud de onda de 620 nm.

Para la determinación de la CMB se sembraron en cajas Petri 10 µL de la suspensión del pocillo en donde se comenzaron a generar microorganismos y dos pocillos antes Se incubaron las muestras durante 24 horas a 35±2° y se observó el desarrollo de microorganismos; se determinó como la CMB en donde ya no se observó crecimiento de microorganismo.

RESULTADOS: La CMI del timol frente a cultivos monoespecie para *C. albicans*, *E. faecalis* y cultivo mixto fue de 2964.17 µg/mL, 2964.17 µg/mL y 8231.30 µg/mL respectivamente. La CMB del timol frente a cultivos monoespecie para *C. albicans*, *E. faecalis* y cultivo mixto fue de 2686.55 µg/mL, 2374.02 µg/mL y 8492.61 µg/mL respectivamente.

CONCLUSIÓN: El efecto antimicrobiano del timol no presentó diferencia significativa entre cultivos de la misma especie. El efecto antimicrobiano del timol presentó diferencia significativa entre cultivos de la misma especie y cultivo mixto

PALABRAS CLAVE: *E. faecalis*, *C. albicans*, timol, actividad antimicrobiana, concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida

Índice

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “*In Vitro*”

1	Introducción	7
2	Marco Teórico	9
2.1	Colonización microbiana en infecciones endodónticas	9
2.2	Microbiota en dientes endodónticamente tratados	12
2.3	Infecciones intrarradiculares persistentes / secundarias	13
2.4	Desinfección del conducto radicular	14
2.5	Irrigación del conducto radicular	14
2.6	Medicación intraconducto	15
2.7	Aceites esenciales	17
2.8	Composición química	20
2.9	Usos	20
2.10	Timol vs bacterias	21
2.11	Timol vs hongos	21
3	Justificación	23
3.1	Pregunta de investigación	23
4	Objetivos	24
4.1	Objetivo General	24
4.2	Objetivos específicos	24
5	Hipótesis	24
6	Metodología	25
6.1	Lugar de realización del estudio	25
6.2	Diseño de estudio	25
6.3	Grupos de estudio	25
6.4	Criterios de selección	26

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “*In Vitro*”

6.4.1	Criterios de inclusión	26
6.4.2	Criterios de exclusión	26
6.4.3	Criterios de eliminación	26
6.5	Variables	26
6.5.1	Variable independiente	26
6.5.2	Variables dependientes	27
6.6	Consideraciones éticas	28
6.7	Análisis estadístico.....	29
7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
7.1	Fase experimental.....	30
7.1.1	Etapa 1. Preparación de la solución de timol.....	30
7.1.2	Etapa 2. Reactivación de las cepas.....	31
7.1.3	Etapa 3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución en caldo	32
8	Resultados.....	41
9	Discusión	49
10	Conclusiones.....	53
11	Perspectivas.....	54
12	Bibliografía.....	55

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “*In Vitro*”

Índice de figuras

Fig. 1 Filos bacterianos que cuentan con representantes en cavidad oral. (Jhaharia K. 2019).....	11
Fig. 2 Acción del Timol sobre los hongos (Kowalczyk, 2020).....	22
Fig. 3 Del lado A) se observa crecimiento de colonias de <i>C. albicans</i> en CHROMagar TM y del lado B) crecimiento de <i>E. faecalis</i> en agar sangre. Fuente: Autor.....	32
Fig. 4 Espectrofotómetro UV-vis GENESYS™ 20, Thermo Scientific Fuente: Autor	33
Fig. 5 Celdillas de cuarzo para espectrofotómetro Fuente: Autor.....	33
Fig. 6 Inóculos estandarizados 0.5 McFarland A) <i>C. albicans</i> B) <i>E. faecalis</i> Fuente: Autor.....	34
Fig. 7 Diferencia de microorganismos presentes en el experimento de cultivo mixto A) Previo a la exposición de timol B) Posterior a 24 h de exposición timol (3333.33 µg/mL)	35
Fig. 8 Método de microdilución en caldo. Concentraciones utilizadas inicialmente Fuente: Autor.....	36
Fig. 9 Método de microdilución en caldo. Concentraciones aumentadas intermedias para cultivo mixto. Se resalta en recuadro rojo el punto de corte intermedio para CMI en cultivo mixto. Fuente: Autor	37
Fig. 10 Método de microdilución en caldo. Concentraciones aumentadas finales para cultivo mixto Fuente: Autor.....	38
Fig. 11 A) Espectrofotómetro de placas Thermo Scientific™ Miltiskan™ GO B) Software SkanIt para lectores de microlacas Fuente: Autor.....	39
Fig. 12 29 Rotulación de las cajas Petri para la determinación de la CMB Fuente: Autor.....	40
Fig. 13 Absorbancia a 620 nm (ABS) vs Concentración de timol para cultivo monoespecie de <i>E. faecalis</i> . Tendencia de valores de absorbancia correspondientes al desarrollo microbiano obtenidos a concentraciones decrecientes de timol en placa de 96 pocillos; la línea.....	42

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “*In Vitro*”

- Fig. 14 Absorbancia a 620 nm (ABS) vs Concentración de timol para cultivo mono especie de *C.albicans*. Tendencia de valores de absorbancia correspondientes al desarrollo microbiano obtenidos a concentraciones decrecientes de timol en placa de 96 pocillos; la línea..... 42
- Fig. 15 Absorbancia a 620 nm (ABS) vs Concentración de timol para cultivo mixto de *E.faecalis-C.albicans*. Tendencia de valores de absorbancia correspondientes al desarrollo microbiano obtenidos a concentraciones decrecientes de timol en placa de 96 pocillos; la línea..... 43
- Fig. 16 Grafico concentración mínima inhibitoria. Se muestra la tendencia de distribución de datos por grupo experimental, así como media, mediana, desviación estándar y valores atípicos. * $p=0.001$ vs grupos mono especie Fuente: Autor 46
- Fig. 17 Grafico concentración mínima bactericida. Se muestra la tendencia de distribución de datos por grupo experimental, así como media, mediana, desviación estándar y valores atípicos. * $p=0.001$ vs grupos mono especie Fuente: Autor 48

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “*In Vitro*”

Índice de tablas

Tabla 1 Variedad de especies bacterianas en infecciones persistentes e infecciones secundarias relacionadas con tratamientos fallidos (Rocas 2009).....	12
Tabla 2 Componentes de <i>Thymus vulgaris</i> (Imelouane y col.l).....	19
Tabla 3 Grupos de estudio.....	25
Tabla 4 Distintos volúmenes utilizados en la solución de timol.....	31
Tabla 5 CMI del timol de cultivos mono especie para <i>C. albicans</i> , <i>E. faecalis</i> y cultivo mixto ($\mu\text{g/mL}$).....	43
Tabla 6 CMB del timol de cultivos mono especie para <i>C. albicans</i> , <i>E. faecalis</i> y cultivo mixto ($\mu\text{g/mL}$).....	44
Tabla 7 Tabla de comparación de medias CMI por grupo experimental: $p < 0.05$ contra grupos de <i>C. albicans</i> y <i>E. faecalis</i>	45
Tabla 8 Pruebas PostHoc Tukey CMI.....	45
Tabla 9 Tabla de comparación de medias por grupo experimental: $P < 0.05$ contra grupos de <i>C. albicans</i> y <i>E. faecalis</i>	47
Tabla 10 Pruebas PostHoc CMB.....	47

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

1 Introducción

El cuerpo humano es una estructura compleja en donde habitan diversos microorganismos, estos pueden cohabitar en el huésped y este puede verse beneficiado de dicha relación. Sin embargo, cuando se rompe el equilibrio homeostático dentro del cual se encuentran estos microorganismos se generan cambios negativos y como consecuencia se pueden causar patologías.

Estas patologías pueden ser ocasionadas en diversos órganos o sistemas del cuerpo. En el área odontológica, más específicamente en endodoncia existen patologías pulpares y periapicales, la causa más frecuente de estas lesiones es la invasión bacteriana; los microorganismos y sus productos pueden llegar a la pulpa a través de diversas vías, tanto por caries, exposición accidental, como por propagación de una infección gingival.

La endodoncia trata las enfermedades del complejo dentino-pulpar, así como la consecuente afección de los tejidos periodontales circundantes, por lo cual el objetivo principal del tratamiento endodóntico consiste en tratar y prevenir estas patologías; para lograr este objetivo es necesario llevar a cabo procedimientos de limpieza y conformación adecuados aunados a un correcto protocolo de irrigación. Sin embargo, esto no elimina completamente la microbiota presente, debido a que existe un complejo sistema de conductos, lo cual en algunos casos puede desencadenar en infecciones endodónticas persistentes.

En endodoncia, existen diversas sustancias utilizadas para la eliminación de los microorganismos, como irrigante se encuentra el hipoclorito de sodio, y por otro lado para el control de la proliferación de microorganismos, es el hidróxido de calcio, el cual es utilizado como medicación intraconducto, aunque estos compuestos han demostrado tener gran efectividad, constantemente se buscan nuevas y mejores alternativas que generen menores complicaciones y efectos secundarios, dentro de estas alternativas encontramos los compuestos naturales, los cuales han sido

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

utilizados desde la antigüedad para la tratamiento de diversas afecciones ya que estos poseen beneficios y propiedades terapéuticas que a diferencia de otros tratamientos, estos presentan una relación costo beneficio favorable lo que permite un futuro prometedor de los compuestos naturales en el área de la salud.

En la actualidad existe una gran diversidad de aceites esenciales, estos son ampliamente utilizados en el área cosmética, en la industria de la alimentación y en la industria farmacéutica.

Desde el punto de vista farmacológico, las propiedades de los aceites esenciales son muy amplias debido a la variabilidad de sus componentes. Dentro de las múltiples propiedades terapéuticas se encuentran:

- ✓ Poder antiséptico
- ✓ Acción espasmolítica y sedante
- ✓ Acción antiinflamatoria

Los aceites esenciales se encuentran compuestos por componentes volátiles de bajo peso molecular, como monoterpenos y sesquiterpenos. Los monoterpenos representan aproximadamente el 90% de los aceites y están dotados de una amplia gama de propiedades tanto biológicas como farmacológicas. Dentro de los monoterpenos más importantes que se encuentran en algunos aceites esenciales del género *Origanum* y *Thymus* se encuentra el timol y el carvacrol, los cuales están relacionados con su capacidad antimicrobiana, antifúngica y antiviral.

Ya que se ha demostrado que el timol se encuentra relacionado con la capacidad antimicrobiana, en la presente investigación se ha planteado el objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB) del timol en patógenos endodónticos.

2 Marco Teórico

2.1 Colonización microbiana en infecciones endodónticas

La gran diversidad de microorganismos se encuentra distribuida en la naturaleza. En el cuerpo humano los encontramos en contacto directo con el medio externo por ejemplo en la piel, o bien en superficies internas como en el tracto gastrointestinal y la cavidad oral. (1,2) La relación de estos seres con el hospedador, en este caso con el ser humano se puede describir en cuatro diferentes tipos de interacciones:

- Saprofitismo: Estos microorganismos viven de forma libre en la naturaleza, estos se caracterizan por nutrirse de materia orgánica e inorgánica en descomposición. (3)
- Mutualismo: En este tipo de interacción, dos organismos se relacionan y ambos obtienen beneficios. Por ejemplo, las bacterias del intestino viven a expensas del ser humano y al mismo tiempo sintetizan vitaminas las cuales son útiles para el hospedador.(3)
- Comensalismo: El microorganismo se encuentra beneficiado de esta relación, pero sin afectar al hospedador.(3)
- Patogenicidad: Interacción la cual causa daño al hospedador, y esta se va a manifestar como patología. (3)

El término microbiota ha venido a reemplazar a la flora y microflora; se le conoce como microbiota al conjunto de microorganismos que colonizan al ser humano sano y consta aproximadamente de 10 a 100 billones de células microbianas simbióticas (4); esta se encuentra constituida en su mayoría por bacterias, pero también por hongos, virus y protozoos, estos habitan en una relación mutualista o comensal (3,5)

La microbiota normal mantiene un equilibrio constante entre los microorganismos involucrados y cuando este equilibrio se rompe puede generar alteraciones en el estado de salud. (2)

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

La diversidad se refiere al número de especies presentes y a su abundancia en un determinado ecosistema. La cavidad oral alberga una de las más altas acumulaciones de microorganismos del cuerpo. Aunque podemos encontrar virus, arqueas, hongos y protozoos como componentes habituales de la microbiota oral, las bacterias son, por mucho, los habitantes más predominantes en la cavidad bucal, donde se calcula que hay unos 10,000 millones de células bacterianas y los métodos de estudio sin cultivo (microscopía y biología molecular) demuestran que más del 50-60% de la microbiota bucal aún no ha sido cultivada e identificada. (5)

En la cavidad bucal humana se han encontrado más de 700 taxones bacterianos que, según los estudios filogenéticos, pertenecen a 13 filos distintos: Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes, Synergistes, TM7, Sulphur River 1 (SR1), Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcus y Acidobacteria.(6) Fig. 1

Las bacterias endodónticas se engloban en nueve de los 13 filos que cuentan con representantes en la cavidad bucal. Los hongos y arqueas se encuentran sólo ocasionalmente en las infecciones endodónticas. (6)

La invasión bacteriana de la cavidad pulpar se encuentra asociada con mayor frecuencia a la caries dental. Las bacterias invaden y se multiplican dentro de los túbulos dentinarios; dichos túbulos varían de tamaño, van de 1 a 4 μm de diámetro, mientras que la mayoría de las bacterias tienen menos de 1 μm en diámetro. Si falta la cobertura de esmalte o cemento, los microorganismos pueden invadir la pulpa a través de los túbulos expuestos. Sin embargo, la caries sigue siendo la puerta de entrada más común de bacterias y subproductos bacterianos hacia el espacio pulpar, pero se ha demostrado que las bacterias y sus subproductos tienen un efecto directo sobre la pulpa dental incluso sin exposición directa (7,8)

Una pulpa necrótica es invadida y colonizada rápidamente. La dentina peritubular y la dentina reparadora pueden impedir el avance de los microorganismos. Sin embargo, los espacios vacíos de los túbulos dentinarios

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

después de la desaparición de los procesos odontoblásticos pueden dejar espacios para el paso de los microorganismos a la cavidad pulpar; estos pueden llegar a la pulpa a través de la exposición directa a partir de procedimientos de restauración o lesiones por traumatismo y de vías asociadas con el desarrollo anómalo de los dientes. (8)

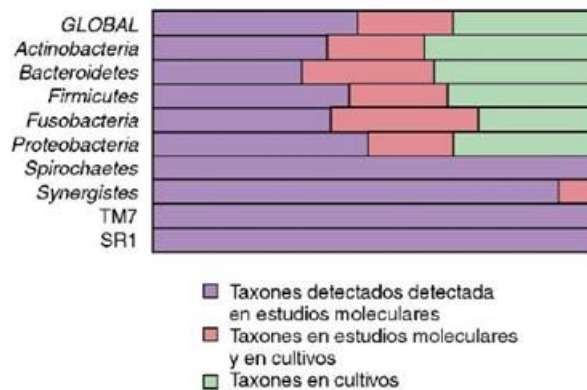


Fig. 1 Filos bacterianos que cuentan con representantes en cavidad oral. (Jhajharia K. 2019)

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

2.2 Microbiota en dientes endodónticamente tratados

Los conductos aparentemente bien tratados contienen de 1 a 5 especies, mientras que el número de especies en conductos con tratamiento inadecuado puede llegar hasta 30, lo que es muy similar al de los conductos no tratados. Un solo conducto tratado asociado con una enfermedad posterior al tratamiento puede albergar una densidad de 10^3 a 10^7 células bacterianas.(9)

Los datos obtenidos a través de los métodos de cultivo y moleculares han revelado 158 taxones bacterianos y 3 de hongos en muestras tomadas en el momento del retratamiento del conducto radicular de los dientes que evidencian lesiones de periodontitis apical. Los estudios moleculares han detectado 46 filotipos aún sin cultivar. Los métodos moleculares han detectado 109 taxones, mientras que los estudios de cultivo aislaron 72 taxones. (9)

Las especies bacterianas detectadas en las muestras de retratamiento pertenecen a 7 filos y 58 géneros. Se han asignado 9 taxones al nivel de familia o filo. La mayor riqueza de especies se observó nuevamente para Firmicutes, seguida de Actinobacteria y Proteobacteria. (9) Tabla 1

Tabla 1 Variedad de especies bacterianas en infecciones persistentes e infecciones secundarias relacionadas con tratamientos fallidos (Rocas 2009)

Phyla	Taxa	As-Yet- Uncultivated Taxa Detected by			Taxa Detected
		Phylotypes	Molecular Studies	by Culture Studies	
<i>Firmicutes</i>	76	21	50	40	
<i>Actinobacteria</i>	28	11	21	10	
<i>Proteobacteria</i>	26	5	17	11	
<i>Bacteroidetes</i>	22	6	16	9	
<i>Fusobacteria</i>	4	2	3	2	
<i>Spirochaetes</i>	1	0	1	0	
<i>Synergistes</i>	1	1	1	0	

En cuanto a especies, Siqueira y col., han revelado que *E. faecalis* es la especie más frecuente en dientes tratados con endodoncia, con valores de

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

prevalencia que alcanzan hasta el 90% de los casos. (9) Mientras que los dientes tratados endodónticamente tienen aproximadamente 9 veces más probabilidades de albergar *E. faecalis* que los casos de infecciones primarias (10), y los hongos se encuentran ocasionalmente en infecciones primarias, pero se han detectado especies de *Cándida* en dientes tratados con endodoncia hasta en un 18% de los casos; *C. albicans* es por mucho la especie fúngica más comúnmente detectada en los casos de retratamiento.(9)

2.3 Infecciones intrarradiculares persistentes / secundarias

La causa principal de la infección secundaria es la entrada de microorganismos que no se encontraban presentes en la infección primaria, pero que se introdujeron en el conducto radicular en algún momento después de la intervención, (11) por lo que la infección persistente es causada por microorganismos que fueron miembros de una infección primaria o secundaria y que, de alguna manera, resistieron los procedimientos antimicrobianos intraconducto y soportaron períodos de privación de nutrientes en los conductos tratados (11). Las infecciones intrarradiculares persistentes o secundarias son las principales causas de varios problemas clínicos, incluido el fracaso del tratamiento endodóntico, que se caracteriza por la persistencia o aparición de periodontitis apical después del tratamiento.

El análisis de los datos integrados de los estudios de cultivo y moleculares reveló que se han detectado 51 taxones bacterianos y 2 de hongos en las muestras tomadas en el momento de la obturación y también en el momento del nuevo tratamiento. Los siguientes taxones han sido detectados por varios estudios: *Propionibacterium acnes*, *P. propionicum*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *P. intermedia*, *Anaerococcus prevotii*, *Eggerthella lenta*, *E. faecalis*, *G. morbillorum*, *P. micra*, *P. alactolyticus*, *S. grupo anginosus*, *S. mitis*, *F. nucleatum* y *C. albicans*. En teoría, los taxones que se encuentran tanto en el momento de la

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

obtención como durante el retratamiento pueden estar involucrados en infecciones persistentes. (9)

2.4 Desinfección del conducto radicular

Los tratamientos exitosos de las infecciones endodónticas primarias y secundarias implican la erradicación efectiva de los microorganismos causantes durante los procedimientos de tratamiento del conducto radicular. Las posibilidades de un resultado favorable con el tratamiento del conducto radicular son significativamente mayores si la infección se erradica de manera efectiva antes de obturar el conducto radicular. (12)

Es bien sabido que la preparación del conducto es fundamental, sin embargo, es imposible llegar a todas las áreas del sistema de conductos, por lo que el uso de un irrigante antimicrobiano para reducir la carga bacteriana durante el tratamiento del conducto radicular, independientemente de la técnica de irrigación o el instrumental utilizado, es esencial. Las bacterias localizadas en áreas como istmos, ramificaciones, deltas, irregularidades y túbulos dentinarios no serán eliminadas por medios mecánicos solamente. Por tanto, es importante el uso de desinfectantes químicos como irrigantes del conducto radicular y medicamentos antimicrobianos entre citas para la eliminación de estas bacterias y para la desinfección del sistema radicular de conductos. (12,13)

2.5 Irrigación del conducto radicular

Uno de los requisitos importantes de un irrigante ideal es su capacidad para eliminar microorganismos del sistema de conductos radiculares. Este efecto antimicrobiano puede ser un efecto químico directo o indirecto al facilitar la desinfección mecánica a través de la lubricación, la disolución de tejidos y el lavado de los desechos contaminados acumulados durante la preparación del conducto radicular. Además, los irrigantes del conducto radicular deben ser biocompatibles con los tejidos bucales. Se han utilizado un gran número de sustancias como

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

irrigantes del conducto radicular, incluidos ácidos como el cítrico y el fosfórico, agentes quelantes como el EDTA, enzimas proteolíticas, soluciones alcalinas como el hipoclorito de sodio, agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno, soluciones anestésicas locales y solución salina normal. (12)

El hipoclorito de sodio es en la actualidad el irrigante más popular. Es un agente antimicrobiano de amplio espectro que ha demostrado ser eficaz contra bacterias, bacteriófagos, esporas, levaduras y virus. Se ha demostrado que el NaClO al 5,25% destruye completamente *C. albicans*, *E. faecalis* y especies de *Bacillus*. (12)

La eficacia antimicrobiana del NaClO se debe a su capacidad para oxidar e hidrolizar las proteínas celulares y, hasta cierto punto, extraer osmóticamente los fluidos de las células debido a su hipertonicidad. El hipoclorito de sodio tiene un pH de aproximadamente 11 a 12, y cuando entra en contacto con las proteínas tisulares, en poco tiempo se forman nitrógeno, formaldehído y acetaldehído y se rompen los enlaces peptídicos, lo que provoca la disolución de las proteínas. (14)

Durante el proceso, el hidrógeno de los grupos amino es reemplazado por cloro, formando así cloramina, que juega un papel importante en la eficacia antimicrobiana. Como consecuencia, el NaClO es altamente tóxico para los tejidos vitales a altas concentraciones sin diluir. A concentraciones muy bajas, el NaClO induce una reacción inflamatoria cuando entra en contacto con los tejidos vitales.

Los problemas de biocompatibilidad asociados con el uso de NaClO concentrado han llevado a la búsqueda de sustancias con propiedades antimicrobianas con menos toxicidad. (12,14)

2.6 Medicación intraconducto

Después de la instrumentación y la irrigación, se ha recomendado ampliamente el uso de medicación entre citas para ayudar a eliminar las bacterias remanentes dentro del sistema de conductos radicular, reducir la inflamación y el

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

dolor periapical e inducir la reparación. También se afirma que algunos medicamentos ayudan a eliminar o reducir los exudados apicales, controlar la reabsorción inflamatoria de las raíces y prevenir la contaminación entre citas. El número de bacterias residuales después de la instrumentación suele ser bajo, pero si el conducto se deja vacío entre citas, las bacterias restantes pueden multiplicarse hasta casi los niveles originales. (5,12)

Los medicamentos del conducto radicular se pueden clasificar según su base química en compuestos fenólicos (como, por ejemplo, eugenol y monoclorofenol alcanforado), aldehídos (por ejemplo, formocresol), haluros (por ejemplo, yodo-yoduro de potasio), hidróxido de calcio, antibióticos, y varias combinaciones. La mayoría de estas preparaciones no se utilizan en la práctica endodóntica contemporánea debido a las toxicidades reportadas; sin embargo, el hidróxido de calcio y las preparaciones que contienen antibióticos siguen siendo los medicamentos intraconducto más utilizados.(15)

Delgado y col. Awawdeh y col., han cuestionado la eficacia antimicrobiana del hidróxido de calcio al demostrar en estudios clínicos que el hidróxido de calcio limitaba el crecimiento bacteriano, pero no eliminaba totalmente las bacterias de los conductos radiculares. (16,17)

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

Las bacterias asociadas con infecciones apicales persistentes, como *E. faecalis*, a menudo son más difíciles de erradicar. Varios estudios han informado que el hidróxido de calcio no es eficaz para eliminar *E. faecalis*, que a menudo se asocia con infecciones endodónticas persistentes. Dichas bacterias pueden invadir hábilmente los túbulos dentinarios y tienen la capacidad de sobrevivir y amortiguar el pH alto producido por el hidróxido de calcio mediante bombas de protones. Además, también se ha encontrado que la dentina tiene un efecto amortiguador sobre el pH alcalino, comprometiendo aún más el efecto antimicrobiano del hidróxido de calcio en la desinfección de los túbulos dentinarios y la eliminación eficaz de *E. faecalis*. (9,11)

Otra opción utilizada como medicamento intraconducto son las preparaciones que contienen antibióticos que se pueden utilizar en la terapia endodóntica como agentes tópicos. Sin embargo, el potencial de resistencia bacteriana, el riesgo de hipersensibilidad al fármaco y el potencial de enmascarar ciertos factores etiológicos limitan su utilidad. (12)

2.7 Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) se encuentran compuestos por componentes volátiles de bajo peso molecular, como monoterpenos y sesquiterpenos. Los monoterpenos representan aproximadamente el 90% del AE y están dotados de una amplia gama de propiedades biológicas y farmacológicas.(18) Dentro de los monoterpenos más importantes que se encuentran en algunos aceites esenciales del género *Origanum* y *Thymus* está el timol y el carvacrol los cuales están relacionados con su capacidad antimicrobiana, antifúngica y antiviral. (19) El extracto de timol de la planta de tomillo fue utilizado hace miles de años por los antiguos egipcios como preparación para ayudar a preservar las momias, El timol fue extraído por primera vez por el químico Alemán Caspar Neumann en 1719, y éste fue obtenido en su forma pura unos 134 años después por Lallemand en 1853.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

(20) Imelouane et al. realizaron un estudio evaluando la composición química del aceite esencial de *Thymus Vulgaris* en donde se identificaron un total de 56 componentes de los cuales 41 representaron el 97,85% del total de componentes detectados. Los principales componentes del aceite fueron, timol, alcanfor, canfeno, α -pineno, borneol, β -pineno. Tabla 2(19)

En cuanto a la composición del aceite esencial de *Origanum vulgare* según sus diferentes orígenes geográficos, Teixeira et al. encontraron que el carvacrol y el timol predominaron como componentes principales, (21) dichos componentes se cree que las actividades antimicrobianas de estos aceites están relacionadas principalmente con dichos compuestos. (22)

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

Tabla 2 Componentes de *Thymus vulgaris* (Imelouane y col.)

Componente	Porcentaje (%)
Tricyclene	0.64
Alpha-thyjene	0.46
Alpha pinene	9.35
Camphene	17.19
Beta pinene	4.23
Myrcene	3.21
Alpha terpinen	0.27
Para cymene	1.19
1,8-cineole	5.45
Trans Beta ocimene	0.09
Gama terpinene	0.55
Cis-sabinene hydrate	0.46
Camphenilone	0.31
Alpha-terpinolene	0.11
Linalol	0.14
Alpha-thyjone	0.29
Desconocido	1.07
Nealloocimene	0.53
Camphor	38.54
Bomeol	4.92
Terpinene-4-ol	2.21
Para-cymen-8-ol	0.28
Alpha terpineol	0.57
Verbenone	0.13
Carveol 1	0.22
Desconocido	0.11
Bomyl acetate	0.40
Thymol	0.24
Alpha-copaene	0.30
Beta-bourbonene	0.12
Alpha-Gurjunene	0.66
Beta-caryophyllene	0.09
Aromadendrene	0.11
Alpha-elemene	0.22
Germacrene-d	0.23
Bicyclogermacrene	0.13
Delta-cadinene	-
Spathulenol	0.73
Caryophellene oxide	0.56
Viridiflorol	-
Beta-oplepenone	0.07

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

2.8 Composición química

El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es un compuesto monoterpenoide, con una estructura de un solo anillo fenólico formado por la unión de dos moléculas de isopreno. En el timol, el grupo metilo está unido en la posición C-5, el grupo isopropilo está unido en la posición C-2 y el grupo hidroxilo se encuentra unido en la posición C-1. (22) En relación a la toxicidad el timol generalmente se ha considerado seguro para el consumo. Ha sido aprobado por la Administración Federal de Drogas y Alimentos (FDA) de los E.E.U.U. para su uso en alimentos de consumo humano, así como en forma de aditivo alimentario

2.9 Usos

Se han reportado diversos efectos a nivel biológico referentes al timol tales como efectos antitusivos, antioxidantes, antimicrobianos, expectorantes, antiespasmódicos y antibacterianos. (23,24) Por ello, el timol se ha utilizado en aplicaciones dentales como enjuagues bucales y selladores dentales durante años. La incorporación de timol en estos medicamentos se basó en investigaciones que revelaron la capacidad de este compuesto para inhibir el crecimiento de patógenos orales comunes. La investigación sobre las propiedades antibacterianas del timol y / o carvacrol continúa y tiene el potencial de ser incorporada en futuros productos médicos y relacionados con la salud. (24)

Sin embargo, otros usos terapéuticos potenciales del timol son para el tratamiento de trastornos que afectan al sistema respiratorio, nervioso y cardiovascular. Además, el timol también exhibe actividades anticancerígenas y antiinflamatorias. (24)

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

2.10 Timol vs bacterias

Las partículas pequeñas y lipofóbicas del timol hacen que este componente pueda superar fácilmente las barreras lipídicas de la bacteria por lo que la membrana celular de los patógenos es un objetivo para el timol. Los estudios sobre el mecanismo de la actividad antibacteriana del timol indican que su capacidad para integrarse en la capa lipídica de la membrana celular aumenta la curvatura de la superficie. La parte hidrofílica de la molécula interactúa con la parte polar de la membrana, mientras que el anillo de benceno hidrofóbico y las cadenas laterales alifáticas se hunden en la parte interna de la membrana biológica. Esto provoca grandes cambios en la estructura de la membrana por desestabilización de la capa lipídica, disminución de la elasticidad y aumento de la fluidez. Este proceso conduce a una mayor permeabilidad a los iones de potasio e hidrógeno. (25)

También afecta la actividad de las proteínas de la membrana interna, como las enzimas y los receptores. Después de la incorporación a la membrana celular, el timol interactúa con sus proteínas incrustadas a través de varios mecanismos no específicos, que conducen a cambios en la conformación y actividad de las proteínas internas y de la membrana. Por lo tanto, la tensión y la desestabilización de la membrana celular pueden ser inducidas por la presencia de timol. (22,25)

2.11 Timol vs hongos

El ergosterol es un esteroide único que se encuentra solo en la membrana celular de los hongos, importante para su correcto crecimiento y funcionamiento. El probable mecanismo antifúngico del timol se basa en el efecto sobre el metabolismo de los ácidos grasos, incluido el ergosterol en la célula fúngica. Conduce, entre otros efectos, a un aumento de la concentración de especies reactivas de oxígeno y al

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

estrés oxidativo, lo que provoca una disminución de la matriz polimérica extracelular y del polisacárido capsular.

Se ha observado que cuando hay una disminución de ergosterol en las membranas celulares tratadas con timol provoca una reducción significativa en el número de células, de igual manera deforma la membrana celular externa del hongo y la perfora, esto debido a la penetración de timol en la capa externa de la membrana celular. Esto reduce la elasticidad de la membrana y altera la capa de lípidos, lo que provoca la muerte celular a través de una salida rápida de componentes intracelulares (Fig. 1 Fig. 2).(25)

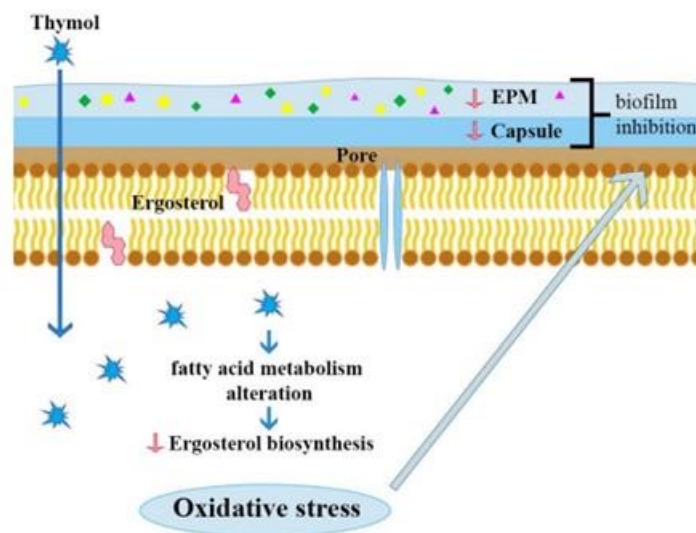


Fig. 2 Acción del Timol sobre los hongos (Kowalczyk, 2020)

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

3 Justificación

Las plantas medicinales se han utilizado desde la antigüedad como terapia alternativa para diversas patologías. Por esta razón, los productos obtenidos de plantas con propiedades medicinales como las de la familia Lamiácea, como el aceite esencial de *Thymus vulgaris* con propiedades antimicrobianas atribuidas al timol despiertan un gran interés científico.

Se ha comprobado que el timol es el componente activo con propiedad antibacteriana y antifúngica que, si bien ha sido estudiado en su forma de aceite esencial en el área de endodoncia, la literatura disponible para el estudio de la molécula de interés es limitada. Por lo que es importante evaluar parámetros como la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del timol frente a cultivos monoespecie y multiespecie de microorganismos de interés endodóntico como lo son *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* con el fin de evaluar su futura aplicación clínica en endodoncia

3.1 Pregunta de investigación

¿Cuál es la concentración mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB) del timol en microorganismos presentes en patología endodóntica persistente?

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

Determinar la CMI y CMB del timol en patógenos endodónticos.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar la CMI sobre *C. albicans* y *E. faecalis*
2. Determinar CMB del timol sobre *C. albicans* y *E. faecalis*
3. Determinar la capacidad antimicrobiana del timol sobre *C. albicans* y *E. faecalis* en un modelo *in vitro*.

5 Hipótesis

Hi: La CMI y CMB de timol frente a cultivos monoespecie de *C. albicans* y *E. faecalis*, así como cultivos mixtos será diferente.

Ho: La CMI y CMB de timol frente a cultivos monoespecie de *C. albicans* y *E. faecalis*, así como cultivos mixtos será la misma.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

6 Metodología

6.1 Lugar de realización del estudio

Laboratorio de Microbiología de la Maestría en Endodoncia y laboratorio de Ciencias Básicas de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

6.2 Diseño de estudio

Estudio experimental *in vitro* de tipo transversal analítico

6.3 Grupos de estudio

Tabla 3 Grupos de estudio

GRUPOS DE ESTUDIO	
Cepas de <i>E. faecalis</i>	
Cepas de <i>C. albicans</i>	
Cultivos mixtos	
Grupos control	
Negativo	Medio de cultivo + Solución salina +Timol/ 10% etanol
Positivo	Medio de cultivo + Suspensión de McFarland +Etanol 10%

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

6.4 Criterios de selección

6.4.1 Criterios de inclusión

- ✓ Cepas de *C. albicans*
- ✓ Cepas de *E. faecalis*
- ✓ Cultivos multiespecie de *C. albicans* y *E. faecalis*

6.4.2 Criterios de exclusión

- ✓ Cultivos multiespecie que no desarrollen crecimiento bacteriano

6.4.3 Criterios de eliminación

- ✓ Muestras contaminadas

6.5 Variables

6.5.1 Variable independiente

Timol

- ✓ **Definición conceptual:** Es una sustancia cristalina incolora con un olor característico, pertenece al grupo de los terpenos y se encuentra presente en la naturaleza en los aceites esenciales del tomillo (*Thymus vulgaris*) o del orégano (*Origanum majorana*), que se encuentra a la vez en el cimeno y el timeno.
- ✓ **Definición operacional:** Se preparan 20 mg de timol con una parte de etanol al 95% y 9 partes de solución salina estéril.
- ✓ **Escala de medición:** Continua de razón

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

6.5.2 Variables dependientes

Concentración mínima inhibitoria

- ✓ **Definición conceptual:** Se define como la concentración menor de antimicrobiano, que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 h de incubación. Este método evalúa la susceptibilidad antimicrobiana y también ayuda a determinar y confirmar resistencias a sustancias.
- ✓ **Definición operacional:** Para la determinación de la CMI se lleva a cabo el método de microdilución en caldo en placa de 96 pocillos, el cual consiste en realizar diluciones seriadas del antimicrobiano, en diferentes concentraciones (3.25 µg/mL- 1670 µg/mL), las lecturas de las muestras se llevan a cabo en el espectrofotómetro de placas.
- ✓ **Escala de medición:** Continua de razón

Concentración mínima bactericida

- ✓ **Definición conceptual:** Es definida como la concentración menor de antimicrobiano que elimina al 99% o más de los microorganismos de un cultivo después de un tiempo determinado de incubación, por lo general suelen ser 24h.
- ✓ **Definición operacional:** Se realiza en base a los resultados obtenidos en el análisis de espectrofotometría para la determinación de la CMI, se toma 10 µL de muestra del último pocillo en donde hubo crecimiento de microorganismos, así como también de los 2 pocillos que se encuentra antes, posteriormente con ayuda los 10 µL son inoculadas en cajas Petri, posteriormente se incuban por 24 horas y la CMB será la concentración menor que no presente crecimiento bacteriano.
- ✓ **Escala de medición:** Continua de razón

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

6.6 Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Estomatología asignado con la clave CEI-FE-039-021, cuyo registro ante la Comisión Nacional de Bioética se rige con la clave CONBIOÉTICA-24-CEI-001-20190213 (Anexo I).

Este estudio es considerado de bajo riesgo, ya que solo se utilizaron muestras microbiológicas del cepario de la Maestría en Endodoncia de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Los residuos peligrosos biológico infecciosos generados en este proyecto fueron manejados según la normatividad vigente dada por la NOM 087-ECOL-SSA 1-2002, protección ambiental- Salud ambiental- Residuos peligrosos biológico infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo, de su numeral 3.10 y 4.2.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

6.7 Análisis estadístico

En la evaluación de normalidad de datos mediante prueba de Shapiro-Wilk una $p=0.026$ indica que la distribución de los datos no se comporta de manera similar en cada grupo, por lo que se asume no paramétrico y el ensayo de comparación de medias se realizó por Kruskal-Wallis.

El análisis se realizó con el software IBM SPSS Statistics, versión 23 (IBM Corporation, New York),

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Fase experimental

La metodología de la presente investigación está realizada por un método de microdilución en caldo, la cual se llevó a cabo en 1 fase microbiológica y 4 etapas consecutivas que se realizaron como se describe a continuación:

- 1) Etapa 1: Preparación de la solución de timol
- 2) Etapa 2: Reactivación de las cepas
- 3) Etapa 3: Determinación de la CMI por el método de microdilución en caldo
- 4) Etapa 4: Determinación de la CMB por siembra en cajas Petri.

7.1.1 Etapa 1. Preparación de la solución de timol

Se realizaron diferentes diluciones del timol con etanol al 95% y agua destilada estéril en tubos Eppendorf de 2 mL para obtener un volumen final de 1 mL (**Tabla 4**) Observando que en la solución con un volumen total de alcohol al 5%, no había disolución por completo del timol, presentando precipitados, por lo que se aumentó el porcentaje de etanol al 10 y 20% resultando en disolución completa del compuesto fenólico. Por lo que la concentración utilizada en el estudio fue de 20 mg de timol, 1 parte de alcohol 95% (v/v) y 9 partes de agua destilada estéril.(26,27)

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

7.1.2 Etapa 2. Reactivación de las cepas

Tabla 4 Distintos volúmenes utilizados en la solución de timol

Alcohol (%)	Volumen agua destilada (µL)	Volumen de timol (mg)	Volumen total (mL)	Respuesta del timol ante el solvente
5	950	20	1.0	Precipitado
10	900	20	1.0	Disolución completa
20	800	20	1.0	Disolución completa

Para iniciar con la reactivación de las cepas, se realizó una resiembra en agar sangre de 20 mL (BD. Bioxon, Becton Dickinson and Company, USA.) para A) *E. faecalis* y en CHROMagar™ Candida Medium (BD. Bioxon, Becton Dickinson and Company, USA.) para B) *C. albicans*. (Fig. 3)

Se incubaron (FELISA®) durante 24 h a 35±2 C° y se observó el desarrollo de microorganismos. Posteriormente se realizó tinción de Gram para corroborar la pureza de las cepas.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

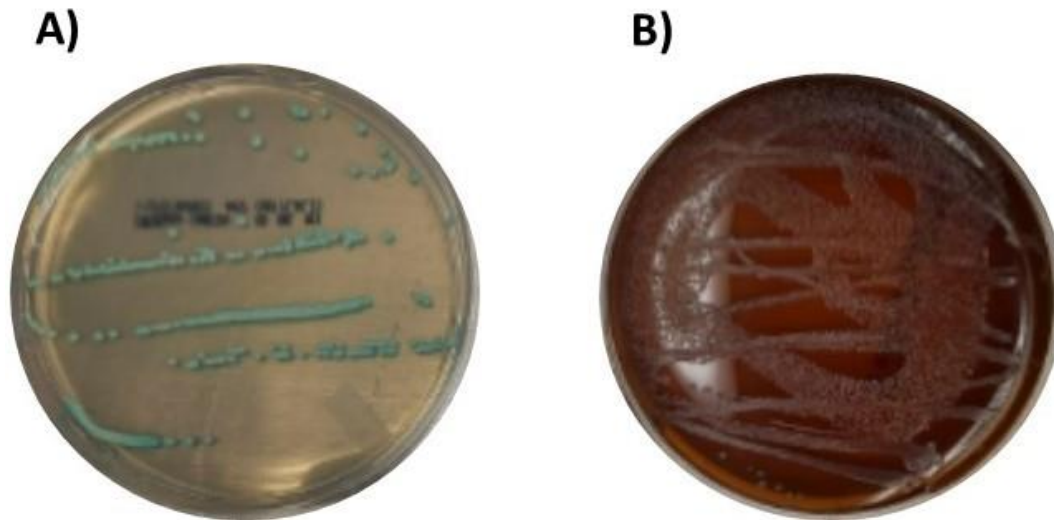


Fig. 3 Del lado A) se observa crecimiento de colonias de *C. albicans* en CHROMagar TM y del lado B) crecimiento de *E. faecalis* en agar sangre. Fuente: Autor

7.1.3 Etapa 3. Determinación de la CMI por el método de microdilución en caldo

Estandarización del inóculo

El inóculo fue ajustado al equivalente del 0.5 en escala de McFarland (1×10^8) con ayuda del espectrofotómetro UV-vis (GENESYS™ 20, Thermo Scientific). (Fig. 4)

La solución blanco (solución salina) fue colocada en una celdilla de cuarzo (Fig. 5) y se ajustó a una longitud de onda de 620 nm, posteriormente para el ajuste de turbidez a 0.5 McFarland se tomaron una o dos colonias con un asa calibrada de la siembra en caja Petri de *C. albicans* y de *E. faecalis* de forma independiente, se resuspendió la colonia en un tubo con solución salina estéril y se llevó al espectrofotómetro para su lectura, la absorbancia se ajustó en un rango de 0.080-0.130 Abs. (Fig. 6)

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”



Fig. 4 Espectrofotómetro UV-vis GENESYS™ 20, Thermo Scientific Fuente: Autor



Fig. 5 Celdillas de cuarzo para espectrofotómetro Fuente: Autor

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

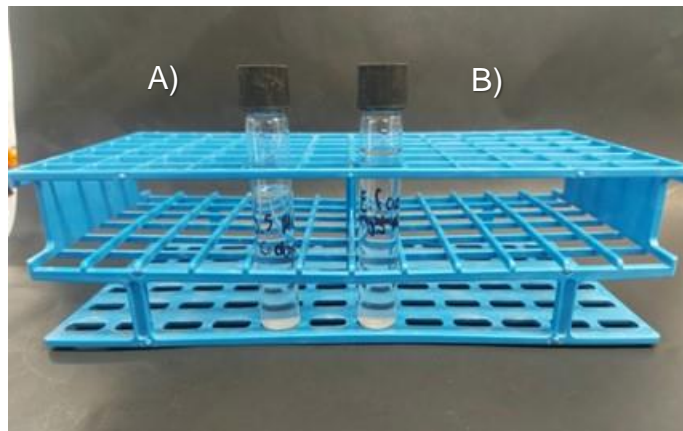


Fig. 6 Inóculos estandarizados 0.5 McFarland A) *C. albicans* B) *E. faecalis* Fuente: Autor

Método de microdilución en caldo

La guía de métodos de dilución para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana M07-A10, décima edición del Clinical & Laboratory Institute (CLSI) describe la metodología a seguir para realizar este procedimiento.

Se llenaron placas de 96 pocillos con 220 μL de medio de cultivo, infusión cerebro corazón (BHI) para *E. faecalis* y Dextrosa Sabouraud (DS) para *C. albicans* (para el análisis de las cepas en conjunto se utilizó 75% de BHI y 25% de DS),(28) a excepción de la segunda columna de pocillos que se llenó con 100 μL de la solución de timol preparada previamente, se inició con una concentración de 3333.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ terminando con una concentración de 0.003 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la columna 11 (progresión aritmética en base 2); se colocaron 220 μL de medio de cultivo en la columna 2 en donde se encontraban los 50 μL de timol, se inocularon los pocillos del 2 al 12 con 30 μL de solución McFarland y por último a los pocillos de la columna 1 se les colocaron 80 μL de solución salina estéril y 50 μL en los pocillos de la columna 12. **(Fig. 8)**

Finalmente se selló la placa de 96 pocillos con una placa adherente y se dejó incubar por 24 horas. El experimento se llevó a cabo por triplicado

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

Al momento de realizar el método de microdilución con las cepas mixtas se utilizaron las mismas concentraciones de timol que se ocuparon inicialmente contra *E. faecalis* y *C. albicans* de manera independiente, como resultado se obtuvo crecimiento de microorganismos en todos los pocillos que contenían las concentraciones de timol ocupadas con anterioridad. Una tinción Gram posterior a la exposición de timol evidenció la prevalencia de *E. faecalis*, aun con la concentración más elevada utilizada en el experimento. (Fig. 7)

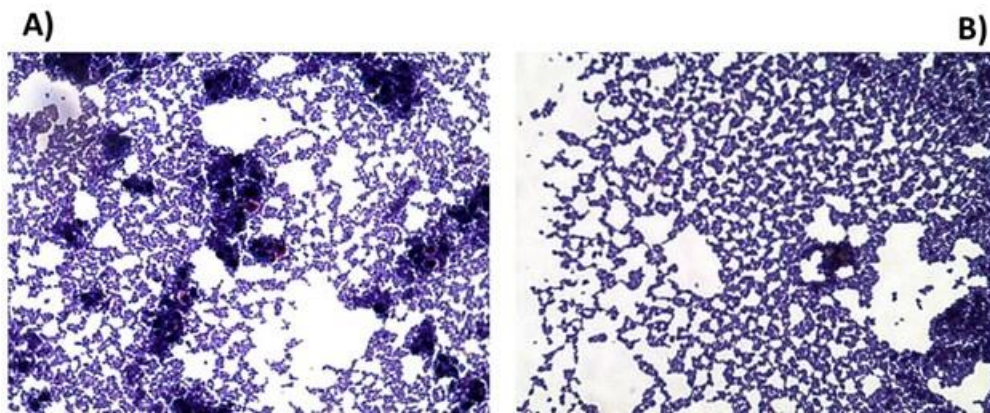


Fig. 7 Diferencia de microorganismos presentes en el experimento de cultivo mixto A) Previo a la exposición de timol B) Posterior a 24 h de exposición timol (3333.33 µg/mL)

Al no obtener inhibición de desarrollo a las concentraciones empleadas se decidió aumentar las concentraciones iniciales, se inició con 79992 µg/mL en el pocillo número 2 terminando en 3333 µg/mL en el pocillo número 12 con el fin de encontrar un punto de corte intermedio. (Fig. 9)

Una vez determinado el punto de corte intermedio para la CMI de cultivo mixto se procedió al desarrollo experimental de concentraciones más específicas; se inició con 9999 µg/mL en el pocillo número 2 terminando en 6924.6 µg/mL en el pocillo número 2 con el fin de encontrar un punto de corte intermedio. (Fig. 10)

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

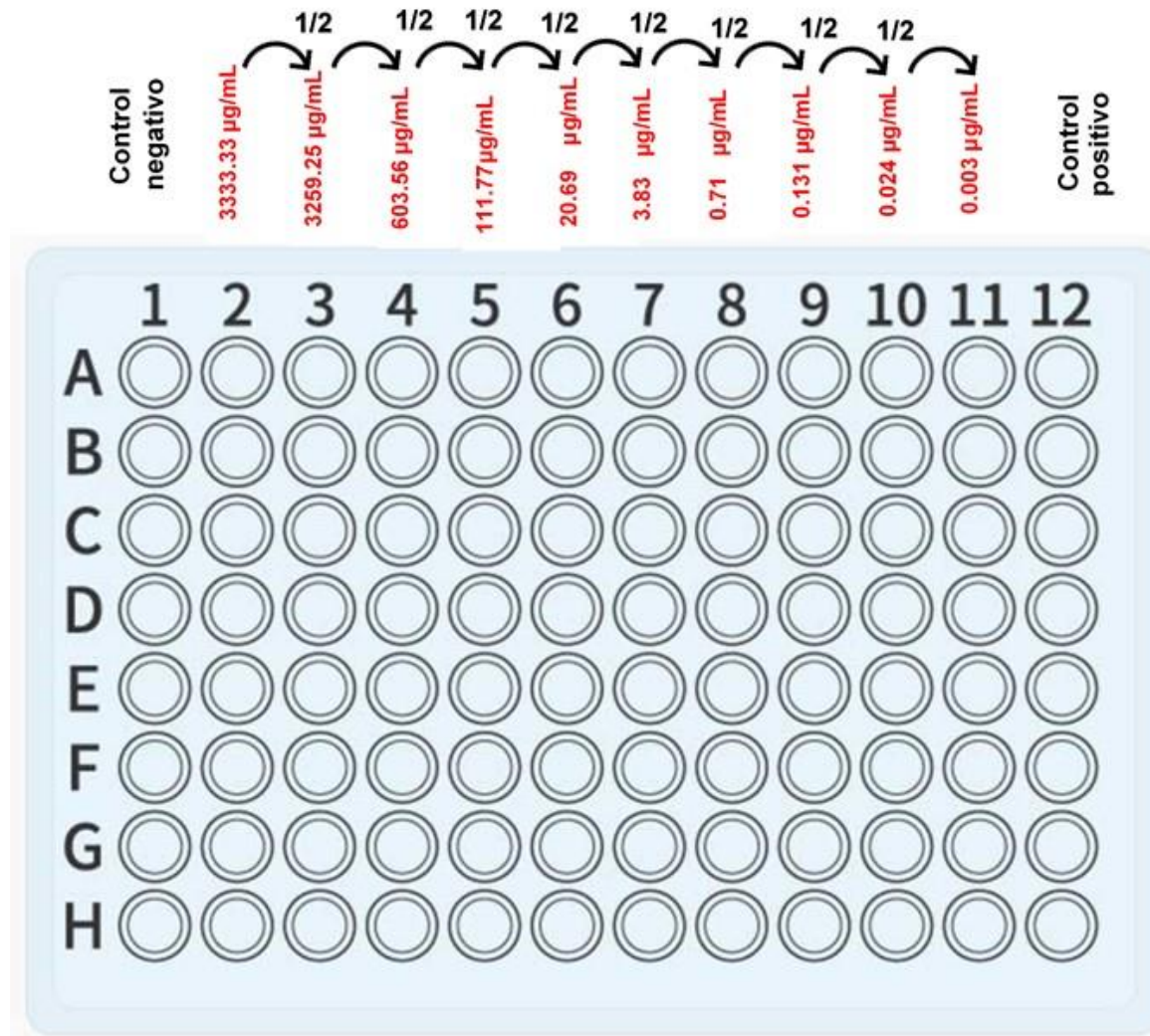


Fig. 8 Método de microdilución en caldo. Concentraciones utilizadas inicialmente Fuente: Autor

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

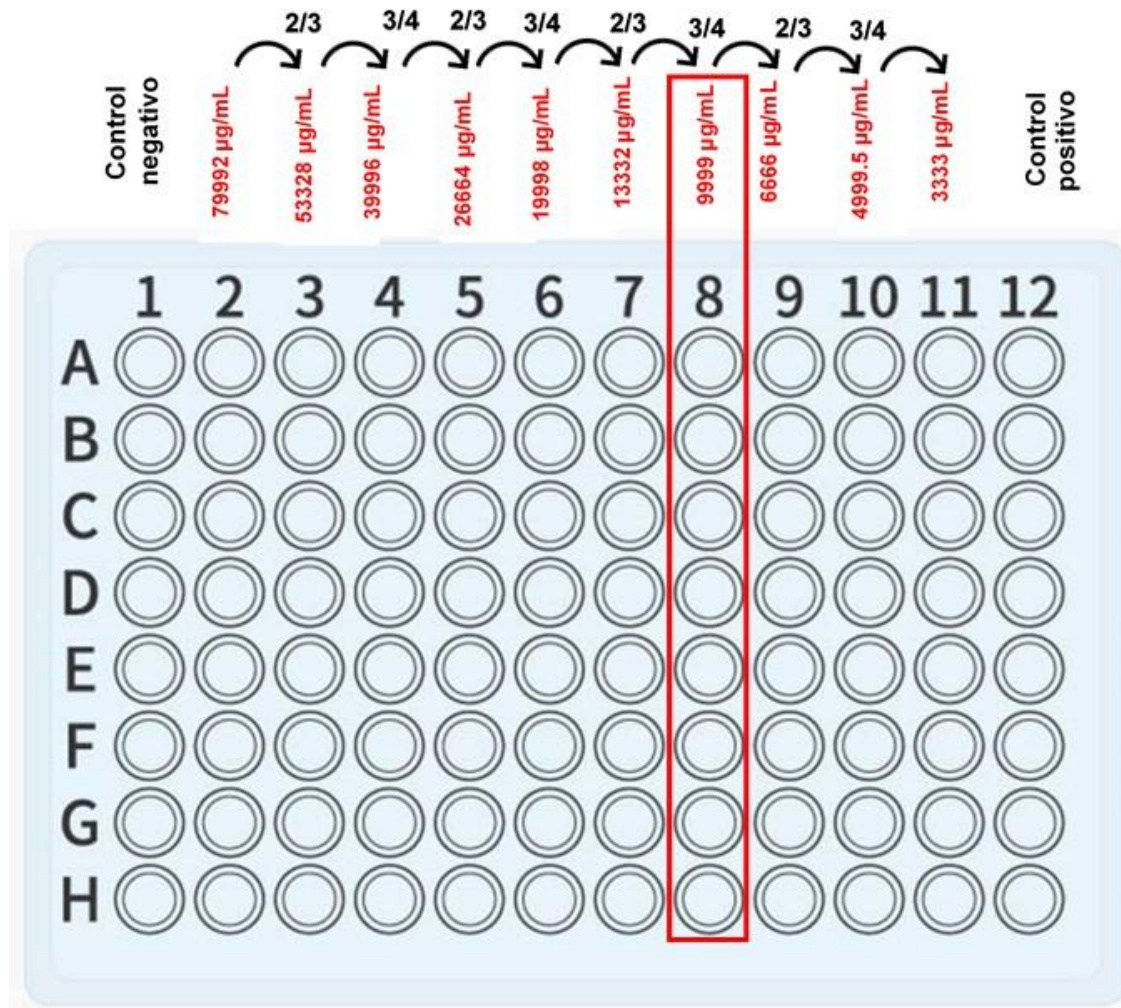


Fig. 9 Método de microdilución en caldo. Concentraciones aumentadas intermedias para cultivo mixto. Se resalta en recuadro rojo el punto de corte intermedio para CMI en cultivo mixto. Fuente: Autor

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

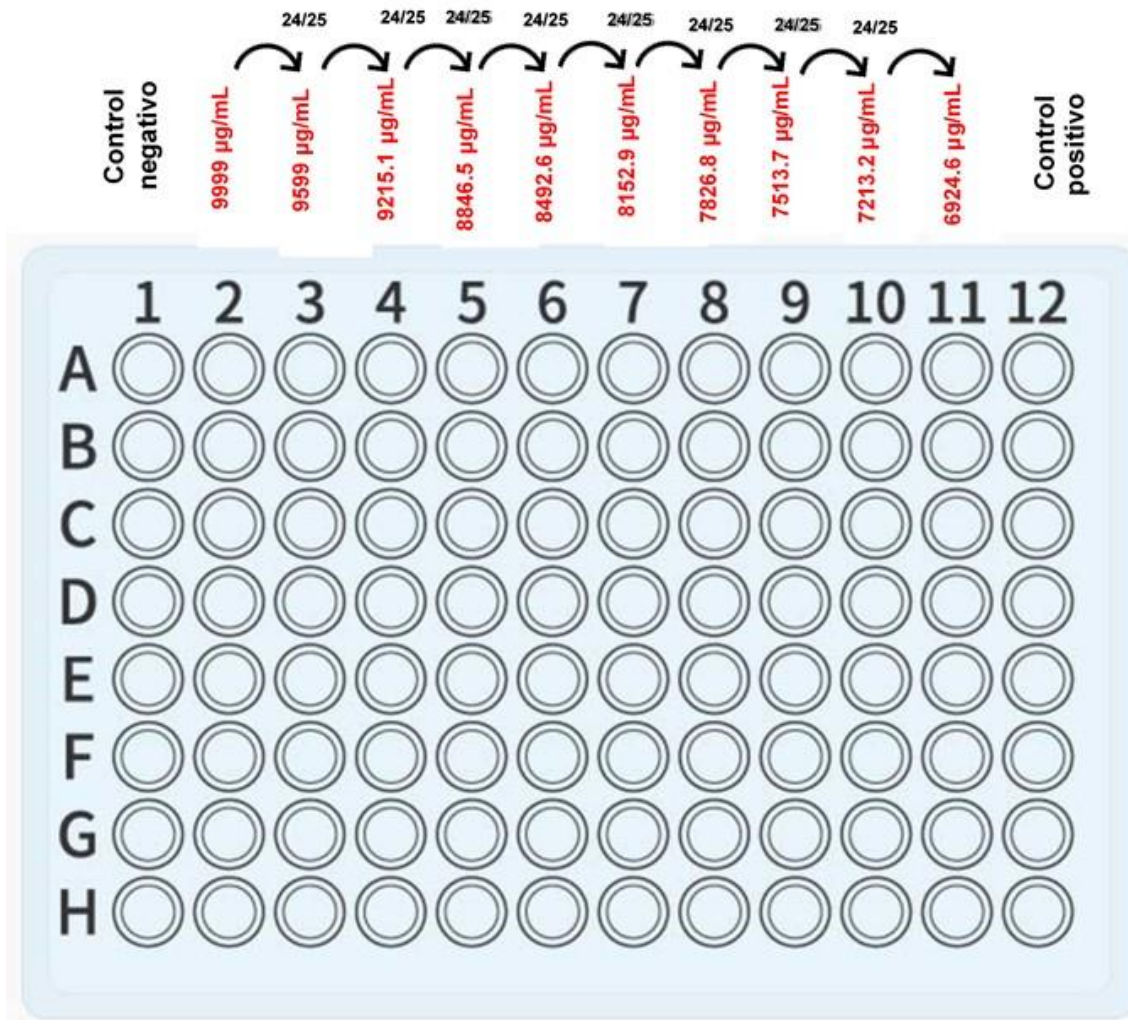


Fig. 10 Método de microdilución en caldo. Concentraciones aumentadas finales para cultivo mixto Fuente: Autor

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

Determinación de la CMI

Luego de 24 h de incubación, se colocó la placa de 96 pocillos en el espectrofotómetro de placas (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer), a una longitud de onda de 620 nm. (Fig. 11)

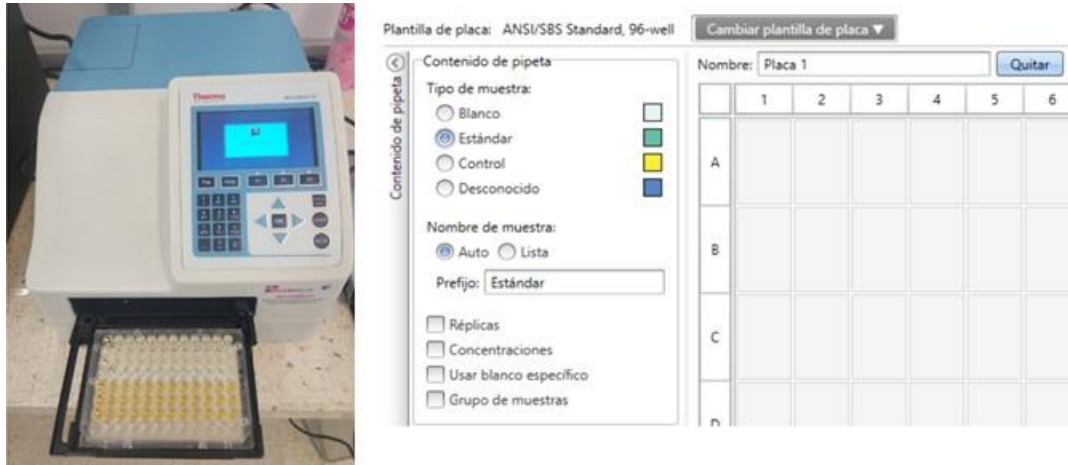


Fig. 11 A) Espectrofotómetro de placas Thermo Scientific TM Multiskan™ GO B) Software SkanIt para lectores de microlacas Fuente: Autor

Determinación de la CMB

Para la determinación de la CMB se tomó una caja Petri y con ayuda de un marcador se dividió la caja en filas y columnas. (Fig. 12) Después, de acuerdo con los resultados obtenidos previamente en el análisis de la CMI, con una micropipeta se tomaron 10 μ L de la suspensión del pocillo en donde se comenzaron a generar microorganismos y dos pocillos antes, para finalizar descargando los 10 μ L en la caja Petri.

Se incubaron las muestras durante 24 h a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ y se observó el desarrollo de microorganismos; se determinó la CMB, después de 24 h se observaron las placas y la concentración mínima en la que ya no se observó crecimiento de microorganismos fue la que se determinó como CMB.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

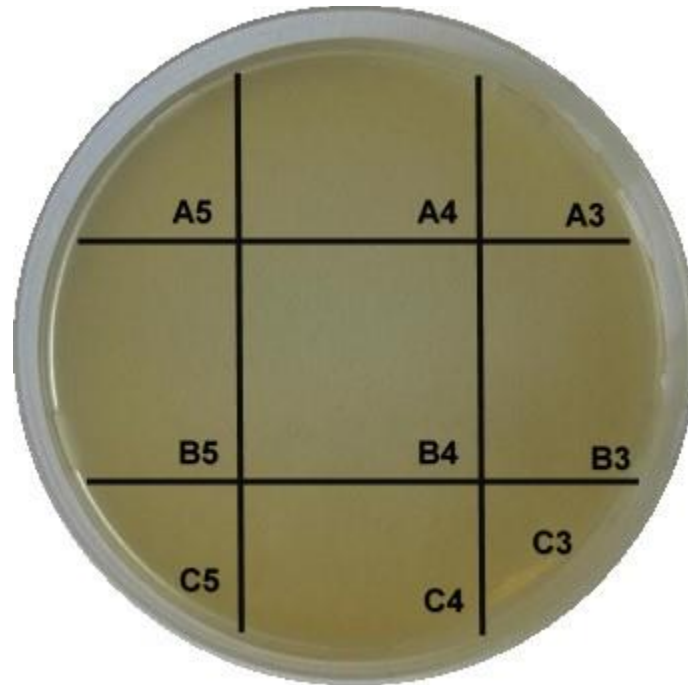


Fig. 12 29 Rotulación de las cajas Petri para la determinación de la CMB Fuente: Autor

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

8 Resultados

Para fines prácticos el orden de los resultados obtenidos se presentará de la siguiente manera:

- ✓ Resultados de estadísticos por grupo de CMI de timol contra *E. faecalis*, *C. albicans* y cultivo mixto (Media, error estándar de la media, desviación estándar, valor mínimo y máximo).
- ✓ Resultado de estadísticos por grupo de CMB de timol contra *E. faecalis*, *C. albicans* y cultivo mixto (Media, error estándar de la media, desviación estándar, valor mínimo y máximo).
- ✓ Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para diferenciar las medias por grupo experimental de CMI.
- ✓ Resultados de prueba Post Hoc Tukey por grupo experimental de CMI.
- ✓ Resultados de la prueba Kruskal-Wallis para diferenciar las medias por grupo experimental de CMB.
- ✓ Resultados de prueba Post Hoc Tukey por grupo experimental de CMB.

Se realizó el análisis de absorbancias obtenidas en el espectrofotómetro de placa, en donde se muestra la distribución de datos obtenidos para las diferentes concentraciones de timol utilizadas en los diferentes grupos de cultivo. La línea roja indica el umbral de absorbancia obtenido por la muestra blanco, cualquier absorbancia por encima de este dato se considera desarrollo microbiano. **(Fig.13-15)**

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

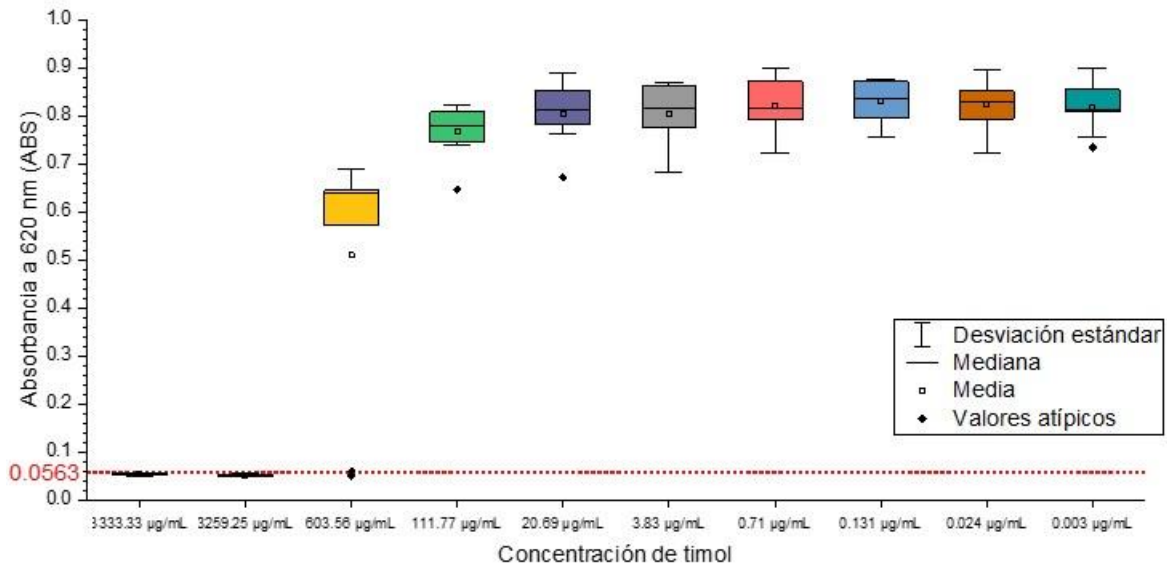


Fig. 13 Absorbancia a 620 nm (ABS) vs Concentración de timol para cultivo monoespecie de *E. faecalis*. Tendencia de valores de absorbancia correspondientes al desarrollo microbiano obtenidos a concentraciones decrecientes de timol en placa de 96 pocillos; la línea

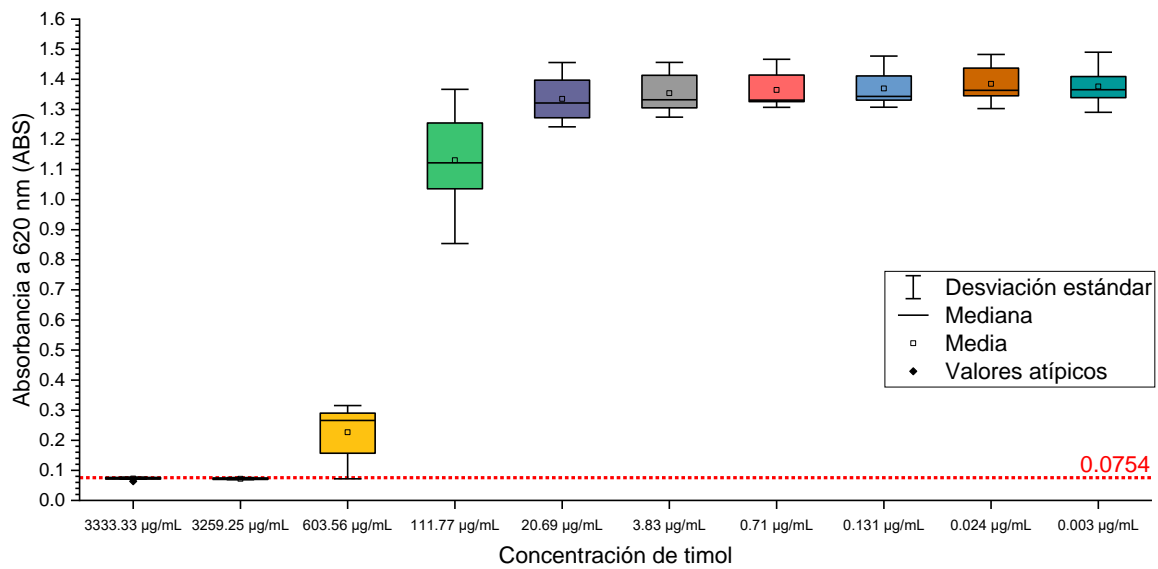


Fig. 14 Absorbancia a 620 nm (ABS) vs Concentración de timol para cultivo monoespecie de *C. albicans*. Tendencia de valores de absorbancia correspondientes al desarrollo microbiano obtenidos a concentraciones decrecientes de timol en placa de 96 pocillos; la línea

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

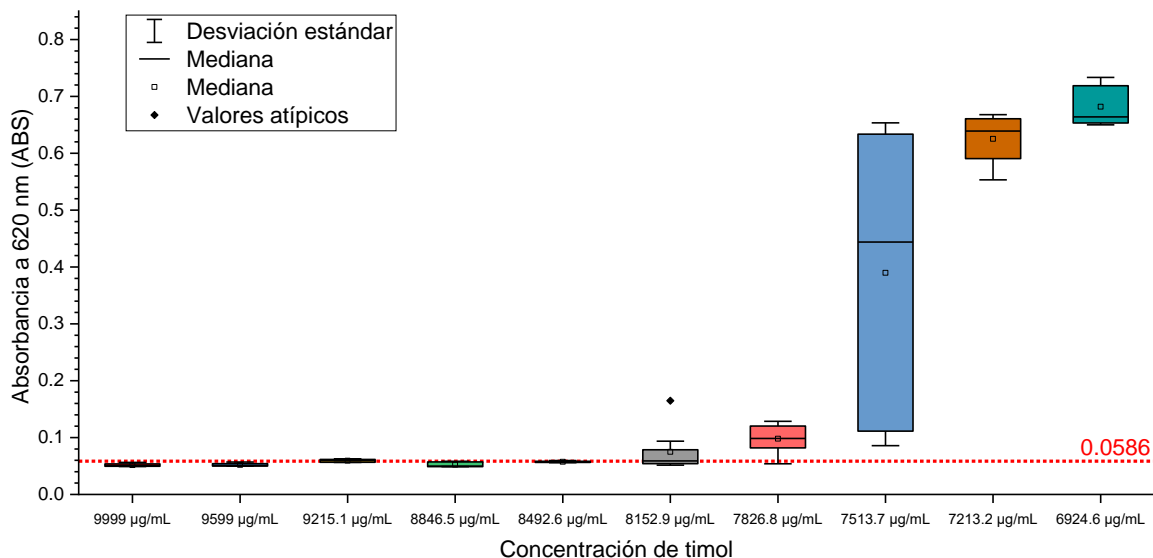


Fig. 15 Absorbancia a 620 nm (ABS) vs Concentración de timol para cultivo mixto de *E. faecalis*-*C. albicans*. Tendencia de valores de absorbancia correspondientes al desarrollo microbiano obtenidos a concentraciones decrecientes de timol en placa de 96 pocillos; la línea

Estadísticos de CMI por grupo

La CMI del timol frente a cultivos mono especie para *C. albicans*, *E. faecalis* y cultivo mixto fue de 2964.17 µg/mL, 2964.17 µg/mL y 8231.30 µg/mL respectivamente, también se observa que la desviación estándar de cultivo mono especie fue igual, tal como se puede observar en la **Tabla 5**.

Tabla 5 CMI del timol de cultivos mono especie para *C. albicans*, *E. faecalis* y cultivo mixto (µg/mL)

Variable	Media	Error estándar de la media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<i>E. faecalis</i>	2964.17	295.07	885.23	603.56	3259.25
<i>C. albicans</i>	2964.17	295.07	885.23	603.56	3259.25
Mixto	8231.30	92.77	278.30	7826.29	8492.61

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

La CMB del timol frente a cultivos monoespecie para *C. albicans*, *E. faecalis* y cultivo mixto fue de 2686.55 µg/mL, 2374.02 µg/mL y 8492.61 µg/mL respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6 CMB del timol de cultivos monoespecie para *C. albicans*, *E. faecalis* y cultivo mixto (µg/mL)

Variable	Media	Error estándar de la media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
<i>E. faecalis</i>	2686.55	393.59	1180.79	603.56	3333.33
<i>C. albicans</i>	2374.02	442.61	1327.84	603.56	3259.25
Mixto	8492.61	0.00	0.00	8492.61	8492.61

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

Concentración mínima inhibitorio

En la evaluación de normalidad de datos mediante prueba de Shapiro-Wilk una $p=0.026$ indica que la distribución de los datos no se comporta de manera similar en cada grupo, por lo que se asume no paramétrico y el ensayo de comparación de medias se realizó por Kruskal-Wallis.

El resultado obtenido por Kruskal-Wallis confirma que el grupo de cultivo mixto presentó una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los grupos mono especie. **(Tabla 7)**

Tabla 7 Tabla de comparación de medias CMI por grupo experimental: $p<0.05$ contra grupos de *C. albicans* y *E. faecalis*

Variable	N	Media ($\mu\text{g/mL}$)
<i>E. faecalis</i>	9	2964.17
<i>C. albicans</i>	9	2964.17
Mixto	9	8231.30*

*Diferencia estadísticamente significativa $p=0.001$

En la **Tabla 8** se observa que entre la distribución de CMI de los grupos de *C. albicans* y *E. Faecalis* no existe una diferencia estadísticamente significativa ya que el valor de $p= 1.000$ asume una igualdad entre los grupos; mientras que la diferencia entre el cultivo mixto y los cultivos mono especie fue estadísticamente significativa ($p=0.001$)

Tabla 8 Pruebas PostHoc Tukey CMI

Diferencia de niveles	Valor de p
<i>C. albicans-E. faecalis</i>	1.000
Mixto- <i>E. faecalis</i>	0.001
Mixto- <i>C. albicans</i>	0.001

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

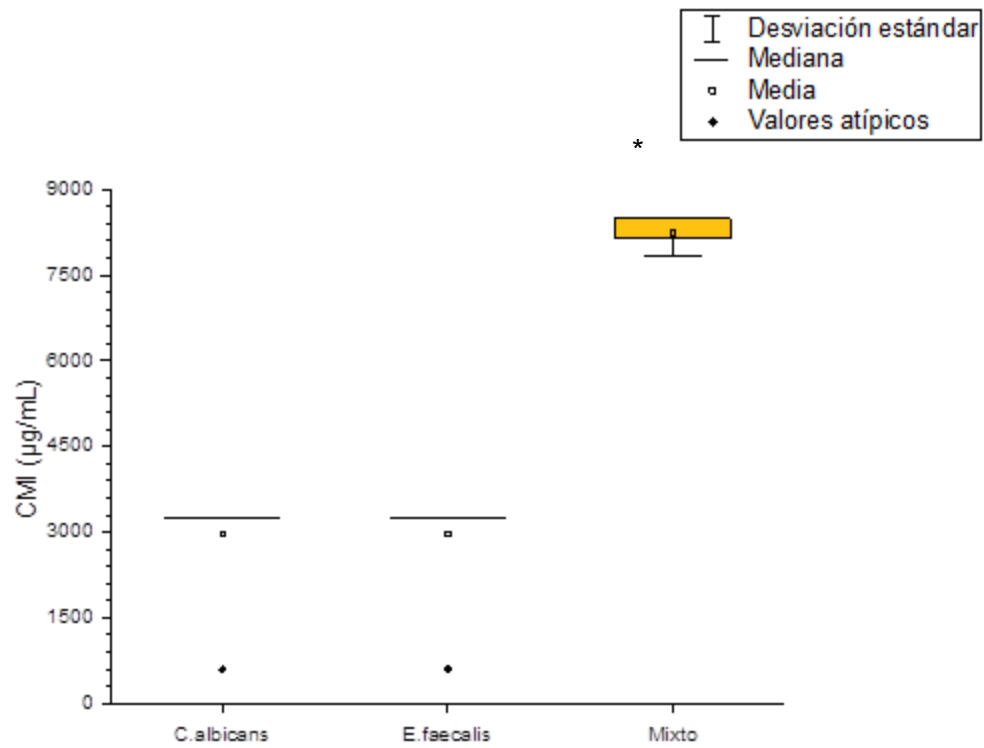


Fig. 16 Grafico CMI. Se muestra la tendencia de distribución de datos por grupo experimental, así como media, mediana, desviación estándar y valores atípicos. * $p=0.001$ vs grupos monoespecie Fuente: Autor

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

Concentración mínima inhibitoria

En la evaluación de normalidad de datos mediante prueba de Shapiro-Wilk una $p=0.01$ indica que la distribución de los datos no se comporta de manera similar en cada grupo, por lo que se asume no paramétrico y el ensayo de comparación de medias se realizó por Kruskal-Wallis.

El resultado obtenido por Kruskal-Wallis confirma que el grupo de cultivo mixto presentó una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los grupos monoespecie. **(Tabla 9)**

Tabla 9 Tabla de comparación de medias por grupo experimental: $P<0.05$ contra grupos de *C. albicans* y *E. faecalis*

Variable	N	Media ($\mu\text{g/mL}$)
<i>E. faecalis</i>	9	2685.55
<i>C. albicans</i>	9	2374.02
Mixto	9	8492.61*

*Diferencia estadísticamente significativa $p=0.001$

En la **Tabla 10** se observa que entre la distribución de CMB de los grupos de *C. albicans* y *E. Faecalis* no existe una diferencia estadísticamente significativa ya que el valor de $p= 0.797$ asume una igualdad entre los grupos; mientras que la diferencia entre el cultivo mixto y los cultivos monoespecie fue estadísticamente significativa ($p=0.001$)

Tabla 10 Pruebas PostHoc CMB

Diferencia de niveles	Valor de p
<i>C. albicans-E. faecalis</i>	0.797
Mixto- <i>E. faecalis</i>	0.001
Mixto- <i>C. albicans</i>	0.001

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

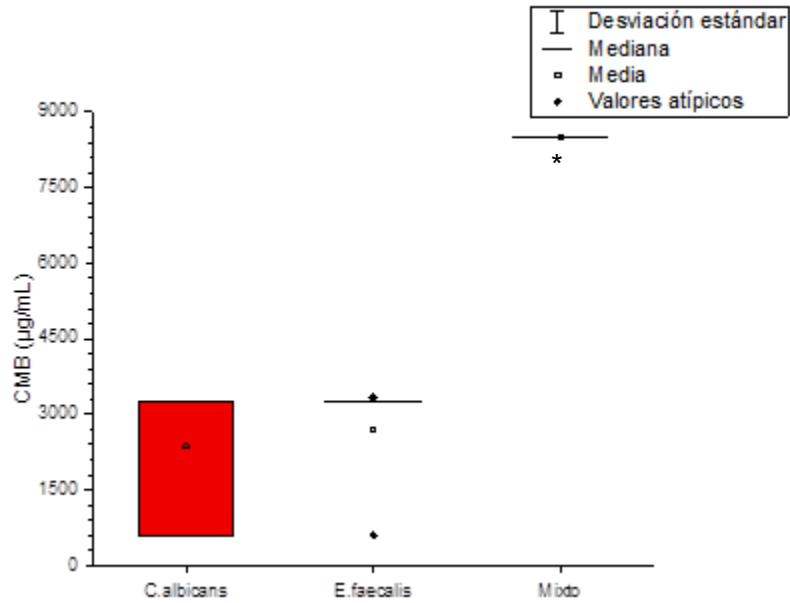


Fig. 17 Grafico CMB. Se muestra la tendencia de distribución de datos por grupo experimental, así como media, mediana, desviación estándar y valores atípicos. * $p=0.001$ vs grupos monoespecie Fuente: Autor

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

9 Discusión

Dentro de los componentes bioactivos más comunes de algunas plantas se encuentran los metabolitos secundarios, tales como los compuestos fenólicos. Dentro de las cuales existen sustancias tanto no volátiles (ácidos fenólicos, flavonoides y taninos) como volátiles (timol). (29,30)

El timol se encuentra presente en los aceites esenciales los cuales son extraídos de plantas que pertenecen a la familia Lamiaceae, como las de los géneros *Thymus*, *Ocimum* y *Origanum*; este compuesto es el principal monoterpeno fenólico de estos aceites esenciales. (29,30)

Se han realizado diversos estudios en donde determinan la composición química de distintas especies del género *Thymus*; Aprotosoai et al. Identificaron 63 compuestos en el aceite esencial de *Thymus vulgaris* siendo el timol el compuesto mayoritario (55.44%), en cuanto al aceite esencial de *Thymus calcareus* también predominó el timol formando parte del aceite en un 55.44%. (31)

Por otro lado, Golkar et al. Evaluaron las composiciones de tres poblaciones del género *Thymus* (*Thymus daenensis*, *Thymus vulgaris* y *Thymus kotschianus*) en donde identificaron carvacrol (4.99-46.22%) y timol (14.8-70.12%) como los compuestos mayoritariamente abundantes de todas las especies evaluadas. (32)

El timol se ha utilizado en diversas industrias, dentro de la industria alimentaria ha sido empleado debido a que este compuesto fenólico tiene capacidad de conservar los alimentos, de igual manera es ampliamente utilizado en repelentes de mosquito por su efecto repelente natural, en la medicina tradicional ha sido utilizado para el tratamiento de diferentes afecciones, como dolores de cabeza, tos y diarrea. Marchese et al. Mencionan que se ha demostrado que el timol tiene muchas actividades diferentes, tales como propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anestésicas, anticonceptivas, cicatrizantes, antisépticas y especialmente antibacterianas y antifúngicas. (30)

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

Debido a que el timol contiene esta amplia gama de propiedades ha sido de interés en el área médica, actualmente se ha determinado su capacidad antimicrobiana contra diversos microorganismos de la cavidad oral, Lee et al. Evaluaron 5 antimicrobianos naturales, entre ellos el timol, contra bacterias de la cavidad oral, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* (33), así como Botelho et al. evaluaron la capacidad antimicrobiana del carvacrol y el timol contra *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus sanguis*, microorganismos presentes en caries y enfermedad periodontal (34). En este estudio se evaluó la CMI y la CMB de timol contra patógenos presentes en patologías endodónticas persistentes, *C. albicans* y *E. faecalis* ya que actualmente no existe información acerca del comportamiento este componente natural contra dichos patógenos endodónticos.

La capacidad antimicrobiana del timol es capaz de desintegrar la membrana externa de los microorganismos, lo que permite la salida de lipopolisacáridos e incrementa la permeabilidad de la membrana citoplasmática. (35) Lambert et al. Mencionaron que el timol cambia la permeabilidad de la membrana de las células de los microorganismos, dejando que se filtren los componentes químicos (iones, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos) los cuales son de vital importancia para el metabolismo. (36)

Para lograr establecer la CMI y CMB se utilizó el método de microdilución en caldo ya que en la literatura más reciente se reportan resultados basados en esta técnica, el método de microdilución se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (37)

Wagner F et al realizaron un estudio en el cual utilizaron distintos extractos de distintas plantas *Curcuma longa* L. (turmeric), *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary), y *Thymus vulgaris* L. (thyme) contra un microorganismo cariogénico (*Streptococcus mutans*), determinaron la CMI a través del método de microdilución en caldo, así como también lo llevaron a cabo Rúa et al. (26,27,38)

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

Las concentraciones utilizadas en las distintas investigaciones en las cuales se comprobó el efecto antimicrobiano del timol contra diversos patógenos eran concentraciones muy variables, debido a que no hay *estudios* que evalúen al timol contra los patógenos utilizados en esta investigación, se tomaron como referencia los valores encontrados en los siguientes trabajos, para poder tener un punto de partida. Rua et. al utilizaron el timol contra *Staphylococcus aureus* en un rango de 3200– 50 µg/mL. (26), MehriArdestani et al. hicieron uso del timol en un rango de 64-0.03 mg/mL contra *Candida spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Lactobacillus acidophilus*, (39) Botelho et al. Utilizaron el timol contra patógenos de la cavidad oral: *Streptococcus mutans* y *C. albicans*. En concentraciones que iban de 435 a 6.79 mg/mL, (34). Las concentraciones utilizadas en esta investigación fueron en un rango de 9999-0.003 µg/mL.

El timol se preparó en una concentración final de 20 mg/mL. Se utilizó alcohol como disolvente, cantidad de compuesto fenólico (20 mg), una parte de etanol al 95% (v=v) y 9 partes de agua estéril tan como lo reportado por Rua et al. (26,27), en este estudio se realizó una prueba previa a realizar el método de microdilución en caldo, en donde en las placas de 96 pocillos se colocó el disolvente en lugar del timol, para evaluar si el alcohol inhibía el crecimiento bacteriano, siendo negativo, en todos los pocillos se reportó crecimiento bacteriano, por lo que se determinó que el uso de alcohol como disolvente no influenciaba en los resultados.

En base a los resultados obtenidos en este estudio, se determinó que la CMB y CMI para *E. faecalis* fue de 2964.17 µg/mL y 2374.02 µg/mL, para *C. albicans* 2964.17 µg/mL y 2686.55 µg/mL y para los cultivos mixtos 8231.30 µg/mL y 8492.61 µg/mL, no hay estudios previos en donde evalúen la CMI y la CMB de *E. faecalis* y *C. albicans* en conjunto por lo que son datos que no pueden ser comparados.

Durante el experimento se tuvo que realizar un aumento en la concentración al probar el timol con las cepas mixtas, debido a que las concentraciones iniciales no fueron efectivas, se realizó tinción de Gram para corroborar la presencia de ambos

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

microorganismos, a lo que solo se encontró solo la presencia de *E. faecalis*, por lo que se determinó que los microorganismos en conjunto generaron resistencia.

Enterococcus faecalis es una bacteria Gram-positiva, y *Candida albicans*, un hongo, los cuales ocupan nichos similares, dentro del microbioma gastrointestinal y oral. Ambas especies también se encuentran entre los patógenos nosocomiales oportunistas más importantes y problemáticos. En diversos estudios se ha observado que estas dos especies antagonizan la virulencia una de la otra. Carrie et al. Mencionan que se identificó la bacteriocina de *E. faecalis*, EntV, producida a partir del locus entV (ef1097), como necesaria y suficiente para la reducción de la virulencia de *C. albicans* y la inhibición de la formación de hifas, un rasgo crítico de virulencia. (40,41)

10 Conclusiones

- ✓ El timol, el cual es un componente que se encuentra de manera natural en algunas especies como el orégano y el tomillo, presentan actividad antimicrobiana en ciertos microorganismos de interés en endodoncia como *E. faecalis* y *C. albicans*.
- ✓ En el presente estudio fue posible determinar que el timol tiene efecto inhibitorio y bactericida frente a cultivos mono especie de *E. faecalis* y *C. albicans*, mientras la CMI para ambos cultivos resultó ser la misma la CMB resultó diferente para ambos cultivos. Siendo *C. albicans* el cultivo con menor CMB, por lo que se sugiere que las levaduras son más lábiles ante la presencia de timol. Mientras que para el estudio sobre el cultivo mixto se encontró una considerable resistencia por parte de los microorganismos al timol, aumentando así las concentraciones utilizadas con los cultivos mono especie.
- ✓ El microorganismo que presentó resistencia al timol en el experimento mixto fue *E. faecalis*. La literatura sugiere que esto se debe al antagonismo que existe entre *C. albicans* y *E. faecalis*, que aumenta sus factores de virulencia, como lo podría ser la resistencia antimicrobiana.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio "In Vitro"

11 Perspectivas

- ✓ Determinar la citotoxicidad y biocompatibilidad del timol a las concentraciones halladas en este estudio.
- ✓ Comparación de efecto antimicrobiano del timol contra otros antimicrobianos
- ✓ Evaluación de la penetración del timol en túbulos dentinarios.
- ✓ Efecto de timol sobre una biofilm de patógenos de importancia endodóntica.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

12 Bibliografía

1. Del Coco VF. Microorganisms conferring beneficial health effects. *Rev Argent Microbiol.* 2015;47(3):171–3.
2. Liébana Ureña J. *Microbiología oral* (2a. ed.) [Internet]. 2002. 3–6 p. Disponible en: [https://moodle.unach.edu.ec/pluginfile.php/1863342/mod_resource/content/2/Microbiologia Oral. Liebana Ureña.pdf](https://moodle.unach.edu.ec/pluginfile.php/1863342/mod_resource/content/2/Microbiologia%20Oral.Liebana%20Ure%C3%B1a.pdf)
3. Poulin L y. Parasitism, commensalism, and mutualism: exploring the many shades of symbioses. 2008;
4. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev.* 2012;70(SUPPL. 1).
5. Kenneth M. Hargreaves, Stephen Cohen BLH. *Vías de la pulpa*. 10ma Edici. 2011. 1004 p.
6. Jhajharia K. Microbiology of endodontic diseases: A review article. *Int J Appl Dent Sci* [Internet]. 2019;5(1):227–30. Disponible en: www.oraljournal.com
7. Nakanishi T, Mukai K, Yumoto H, Hirao K, Hosokawa Y, Matsuo T. Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(2):145–50.
8. Baumgartner JC, Bakland LK, Sugita EI. Microbiology of endodontics and asepsis in endodontic practice. En: John Ingle LB, editor. *Endodontics*. 6a ed. 2008. p. 63–93.
9. Siqueira JF, Rôçac IN. Critical review in oral biology and Medicine: Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009;88(11):969–81.
10. Rocas I, Siquera J, Santos K. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular. *J Endod.* 2004;30(19):315–20.
11. Siqueira JF. Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(3):281–93.
12. El karim I, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2007;103(4):560–9.
13. Goldberg F; Soares I; *Endodoncia técnicas y fundamentos*. 1ra ed Editorial Medica Panamericana. 2003. p. 330.
14. Mohammadi Z, Yazd I. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2008;58(2009):342–8.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

15. Mahmoud Torabinejad RW. Endodoncia. Principios y práctica. 4ta Edició. USA; 2010.
16. Delgado RJR, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial Effects of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010;36(8):1389–93.
17. Awawdeh L, AL-Beitawi M, Hammad M. Effectiveness of propolis and calcium hydroxide as a short-term intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*: A laboratory study. *Aust Endod J*. 2009;35(2):52–8.
18. Nagy-Bota MC, Man A, Santacroce L, Brinzaniuc K, Pap Z, Pacurar M, et al. Essential Oils as Alternatives for Root-Canal Treatment and Infection Control against *Enterococcus faecalis*—A Preliminary Study. *Appl Sci*. 2021;11(4):1422.
19. Imelouane, B., H. Amhadi, J.P. Wathelet, M. Ankit KKAAEB. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thymus vulgaris from yemen. *Turkish J Biochem*. 2011;36(4):342–9.
20. Fani M, Kohanteb J. In Vitro Antimicrobial Activity of Thymus vulgaris Essential Oil Against Major Oral Pathogens. *J Evidence-Based Complement Altern Med*. 2017;22(4):660–6.
21. Teixeira B, Marques A, Ramos C, Serrano C, Matos O, Neng NR, et al. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *J Sci Food Agric*. 2013;93(11):2707–14.
22. Radünz M, Mota Camargo T, Santos Hackbart HC dos, Inchauspe Correa Alves P, Radünz AL, Avila Gandra E, et al. Chemical composition and in vitro antioxidant and antihyperglycemic activities of clove, thyme, oregano, and sweet orange essential oils. *Lwt*. 2021;138(August 2020).
23. Taheri JB, Azimi S, Rafieian N, Akhavan Zanjani H. Herbs in dentistry. *Int Dent J*. 2011;61(6):287–96.
24. Salman BN, Vahabi S, Mohebbi M. Use of Herbs and Medicinal Plants in Dentistry: A Review. *J Dent Sch Shahid Beheshti Univ Med Sci*. 2017;35(2):133–49.
25. Adam Kowalczyk IF, Martyna Przychodna, Sylwia Sopata AB. Selected Therapeutic Applications. *Molecules*. 2020;(25):4125–42.
26. Rúa J, Del Valle P, De Arriaga D, Fernández-Álvarez L, García-Armesto MR. Combination of Carvacrol and Thymol: Antimicrobial Activity Against *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Activity. *Foodborne Pathog Dis*. 2019;16(9):622–9.
27. Rúa J, Ferra L, Castro C De, Valle P. Antibacterial Activity Against Foodborne *Staphylococcus aureus* and Antioxidant Capacity of Various Pure Phenolic

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

Compounds. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8(1):149–57.

28. Denisse CDC, Contreras C. Evaluación de la eficacia de reducción bacteriana y limpieza de sistemas de lima única Wave One Gold y Reciproc vs un sistema múltiple TFA , frente un biofilm. 2017;
29. Guo N, Liu J, Wu X, Bi X, Meng R, Wang X, et al. Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 2009;58(8):1074–9.
30. Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem* [Internet]. 2016;210:402–14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
31. Aprotosoiaie AC, Miron A, Ciocârlan N, Brebu M, Roşu CM, Trifan A, et al. Essential oils of Moldavian *Thymus* species: Chemical composition, antioxidant, anti-*Aspergillus* and antigenotoxic activities. *Flavour Fragr J.* 2019;34(3):175–86.
32. Golkar P, Mosavat N, Jalali SAH. Essential oils, chemical constituents, antioxidant, antibacterial and in vitro cytotoxic activity of different *Thymus* species and *Zataria multiflora* collected from Iran. *South African J Bot* [Internet]. 2020;130:250–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.12.005>
33. Lee JS, Choi YS, Lee HG. Synergistic antimicrobial properties of nanoencapsulated clove oil and thymol against oral bacteria. *Food Sci Biotechnol* [Internet]. 2020;29(11):1597–604. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00803-w>
34. Botelho MA, Nogueira NAP, Bastos GM, Fonseca SGC, Lemos TLG, Matos FJA, et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian J Med Biol Res.* 2007;40(3):349–56.
35. Garcia, Garcia R.M PG. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés. 2008. p. 41–51.
36. Lambert RJW, Pearson J. Susceptibility testing: Accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *J Appl Microbiol.* 2000;88(5):784–90.
37. Weinstein M. CLSI M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Vol. 8, *Journal of Services Marketing.* 2021. 18–260 p.
38. Figueira LW, de Oliveira JR, Camargo SEA, de Oliveira LD. *Curcuma longa* L.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del timol en patógenos endodónticos. Estudio “In Vitro”

- (turmeric), *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary), and *Thymus vulgaris* L. (thyme) extracts aid murine macrophages (RAW 264.7) to fight *Streptococcus mutans* during in vitro infection. *Arch Microbiol* [Internet]. 2020;202(8):2269–77. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01945-5>
39. Ardestani MM, Aliahmadi A, Toliat T, Dalimi A, Momeni Z, Rahimi R. Evaluation of antimicrobial activity of *trachyspermum ammi* (L.) sprague essential oil and its active constituent, thymol, against vaginal pathogens. *Tradit Integr Med*. 2020;5(2):49–58.
 40. Graham CE, Cruz MR, Garsin DA, Lorenz MC. Enterococcus faecalis bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(17):4507–12.
 41. Ch’ng JH, Chong KKL, Lam LN, Wong JJ, Kline KA. Biofilm-associated infection by enterococci. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17(2):82–94.