

Efecto antimicótico del timol sobre cepas de *Candida albicans*: estudio *in vitro*

Antimicotic effect of thymol on strains of *Candida albicans*: *in vitro* study

Ayala J ^{1a}, Jibaja T ^{2a}, Sotelo E ^{2a}, Montaña V ^{2a}, Soler A ^{3b}, Armas A ^{1c}

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto antimicótico del timol en concentraciones de 0,1, 0,5 y 1 % sobre cepas de *Candida albicans* evaluadas a las 48 horas de incubación, comparándolas con gluconato de clorhexidina al 0,12 % y nistatina. **Material y métodos:** La actividad antimicótica del timol se determinó en función al diámetro de halo de inhibición y los criterios de susceptibilidad del método de Duraffourd, llevado a cabo según la técnica de difusión en agar con una muestra de 25 cajas Petri inoculadas con *Candida albicans* ATCC®10231, cada una con 3 discos de papel filtro embebidos en soluciones de timol al 0,1 %, 0,5 % y 1 %, al igual que en gluconato de clorhexidina al 0,12 % y nistatina en suspensión siguiendo los parámetros del Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos. **Resultados:** Las concentraciones de timol al 0,5 y 1 % mostraron efecto inhibitorio superior a las sustancias empleadas como control. **Conclusiones:** El timol posee efecto inhibitorio mayor que la clorhexidina y la nistatina sobre células de *Candida albicans*, mostrándose como alternativa a los fármacos habituales.

PALABRAS CLAVE: Agentes antibacteriales; *Candida albicans*; Candidiasis oral; Timol. (Fuente: DeCS BIREME)

ABSTRACT

Objective: To determine the antimicotic effect of thymol in concentrations of 0.1, 0.5 and 1 % on strains of *Candida albicans* evaluated at 48 hours of incubation, comparing them with 0.12 % chlorhexidine gluconate and nystatin. **Material and methods:** Thymol antifungal activity was determined according to the inhibition halo diameter and the susceptibility criteria of the Duraffourd method, carried out according to the agar diffusion technique with a sample of 25 Petri dishes inoculated with *Candida albicans* ATCC®10231, each with 3 filter paper discs embedded in 0.1 %, 0.5 % and 1 % thymol solutions, as in 0.12 % chlorhexidine gluconate and nystatin in suspension following the parameters of National Committee of Standards of Clinical Laboratories. **Results:** Thymol concentrations of 0.5 and 1% showed an inhibitory effect superior to the substances used as control. **Conclusions:** Thymol has a greater inhibitory effect than chlorhexidine and nystatin on *Candida albicans* cells, being shown as an alternative to the usual drugs.

KEYWORDS: Anti-bacterial agents; *Candida albicans*; Oral candidiasis; Thymol. (Source: MeSH NLM)

Recibido: 15 de febrero de 2019

Aprobado: 20 de agosto de 2019

Publicado: 05 de octubre de 2019

- 1 Universidad central del Ecuador. Ecuador.
- 2 Universidad Tecnológica Equinoccial. Ecuador.
- 3 Universidad Industrial de Santander. Ecuador.

^a Odontólogo

^b Microbiólogo

^c PhD en Materiales Dentales

Correspondencia:

Tatiana Jibaja Palacios
Correo electrónico: tatyale_15@hotmail.com

Este es un artículo Open Access distribuido bajo la licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0



Citar como: Ayala J, Jibaja T, Sotelo E, Montaña V, Soler A, Armas A. Efecto antimicótico del timol sobre cepas de *Candida albicans*: estudio *in vitro*. KIRU. 2019; 16(4): 141-146. <https://doi.org/10.24265/kiru.2019.v16n4.02>

INTRODUCCIÓN

La presencia de infecciones fúngicas resulta frecuente en la población; sin embargo, su tratamiento continúa siendo tema de actualidad hasta el momento ⁽¹⁾, el género *Candida* spp. se encuentra de manera general entre un 7 – 65 % de los microorganismos existentes en boca, manifestándose en bajas concentraciones en pacientes sanos y con mayor prevalencia en pacientes inmunocomprometidos del tipo geriátricos, con cáncer, sida, diabetes, como también en pacientes portadores La candidiasis oral depende generalmente de tres factores; la condición sistémica del paciente, condición oral y resistencia frente a la *Candida albicans* ⁽⁸⁾. Su presencia en boca corresponde al 75 % asociada sobre todo a la presencia de prótesis dentales, desencadenando estomatitis subprotésica por la presencia de biofilm ⁽⁹⁾ y alterando frecuentemente las estructuras bucales ⁽³⁾. De forma tradicional, con el uso de fluconazol y nistatina se han convertido en los antimicóticos de elección por su eficacia y baja toxicidad en la profilaxis y tratamiento de lesiones fúngicas ^(3,10) en conjunto con la clorhexidina en productos de uso dental logrando un efecto sinérgico de potencia, es decir, aumentando la efectividad de ambos compuestos ⁽¹¹⁾. Sin embargo, alteraciones en tejidos blandos y estructuras dentales asociadas a cambios de color han sido reportadas, lo que lleva a buscar por medio de este estudio una evaluación de la capacidad antimicótica del timol en concentraciones del 0,1; 0,5 y 1 % sobre cepas de *C. albicans* a las 48 horas de incubación, comparando su efectividad con la clorhexidina y la nistatina al 0,12%.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se plantea un estudio experimental con una muestra constituida por 30 cajas Petri que contienen el inóculo de *C. albicans* (ATCC®10231, Ecuador). Siguiendo procedimientos preestablecidos, para determinar la actividad antibacteriana, la cepa liofilizada fue activada en 1 ml de caldo Saboroud, con el fin de enriquecer y rehidratar al microorganismo, luego se sembró en cajas de agar Saboroud. El método de siembra fue por agotamiento y se verificó que las

colonias no estuvieran contaminadas mediante montaje directo azul de lactofenol. Las mismas fueron observadas al microscopio en objetivo de 40x.

La prueba de sensibilidad fue ejecutada una vez identificada ausencia de contaminación de las colonias, para lo cual se preparó un inóculo de turbidez 0,5 Mac Farlan, partiendo de las colonias que crecieron y fueron aisladas del agar Saboroud; en dicho inocuo se sembraron 15 placas en agar Saboroud, mediante la

de aparatología oral favoreciendo la adhesión de placa dentobacteriana ^(2, 3).

La terapéutica tradicional involucra el empleo de colutorios como forma de tratamiento, el timol en concentración del 0,064 % se encuentra presente en diferentes productos coadyuvantes en la higiene oral ^(4,5), como forma de tratamiento frente a infecciones micóticas presentando en su composición etanol generalmente al 5% ⁽⁶⁾ o en forma de barniz en concentración del 1 % ⁽⁷⁾.

técnica de siembra en césped y con hisopo para su respectivo antibiograma. EL agar Saboroud permite crecimiento óptimo de hongos.

Los discos de papel filtro (Whatman TM, España) fueron impregnados con 20 µL de cada una de las concentraciones de timol al 0,1, 0,5 y 1 %; como control positivo para sensibilidad se utilizó gluconato de clorhexidina al 0,12 % en solución y nistatina al 0,12 % en solución. Se procedió a colocar con pinzas estériles y presionar sobre las cajas; las mismas fueron marcadas con la concentración y el extracto usado e incubadas a 37°C. La evaluación de actividad de inhibición se realizó a las 48 horas de inhibición mediante una regla milimetrada, valorando el diámetro de los halos formados alrededor de los discos de filtro. Se sobreentendió que mientras mayor sea la medida del halo, la sustancia presenta mayor efectividad sobre la inhibición en el crecimiento de las cepas. Los valores fueron recolectados en tablas Excel y sometidos a análisis mediante el programa SPSS y pruebas estadísticas de Shapiro-Wilk y Kruskal Wallis.

RESULTADOS

Del De acuerdo a los datos analizados, se puede comprobar que mientras mayor diámetro tenga el halo, existe mayor efecto inhibitorio de la sustancia sobre la levadura, por lo que el análisis cualitativo realizado, según la escala de medición de Duraffour, determinó que la *C. albicans* a las 48 horas de evaluación, se mostró muy sensible al timol en concentración del 1 %, con una media de 17,60 mm, seguido de las soluciones del timol al 0,5 %, y 0,1 %, con similar valor para el gluconato de clorhexidina al 0,12 % de 13,60 mm, 11,50 mm y 11,00 mm respectivamente; finalmente la nistatina con un valor de 8,90 mm demostrando sensibilidad nula

Para verificar si las muestras tomadas provienen de una población con distribución normal, se realizaron las pruebas de normalidad de Kolmogorov- Shapiro basadas en las hipótesis del estudio, con los valores de significancia correspondientes a $p < 0,05$ (95 % de confiabilidad) demostrando diferencias significativas, es

decir ninguna de las sustancias actuó de la misma forma, realizándose a seguir la prueba Kruskal-Wallis.

El análisis de Kruskal-Wallis determinó que a las 48 horas tomando en cuenta los valores más altos de inhibición pertenecieron al timol al 1 %, seguido por la concentración al 0,5 % y al final timol al 0,1 %. Observándose los valores más altos en timol al 1 % con una media de 16,67 mm, seguido por el timol al 0,5 % con 12,60 mm y, finalmente, timol al 0,1 % con 10,47 mm con mínima diferencia en relación al gluconato de clorhexidina al 0,12 % cuya medición fue 10,07 mm.

En el análisis de la distribución de los datos de inhibición, con un total de 75 valores se observó un nivel de significancia de $p = 0,0001$ mostrando diferencias significativas entre los efectos de las sustancias estudiadas a las 48 horas. Es así que el timol en concentración del 0,1 % mostró una distribución asimétrica de datos, con una mediana alrededor de 10 mm, existiendo también valores límites máximos y

mínimos según su dispersión. El timol al 0,5% y el timol al 1% obtuvieron una distribución asimétrica, con una mediana de 16,67 mm, mayor que las otras concentraciones, con datos agrupados hacia las medidas más altas de inhibición, habiendo además dispersión de datos en sus dos extremos.

Al analizar las sustancias usadas como control, se observó que el gluconato de clorhexidina al 0,12 % no tuvo variabilidad de datos, por lo que su mediana coincidió tanto con los cuartiles 1 y 3 y los extremos negativo y positivo,

con una media aproximada de 10 mm, mostrándose, además, valores atípicos en sus dos extremos. En cuanto a la nistatina analizada a las 48 horas, se encontró una distribución simétrica de datos, con una media alrededor de 7 mm, con dispersión amplia, mostrando valores de inhibición dispersos tanto superiores como inferiores.

Tabla 1. Valoración de muestras emparejadas

Tiempo	N° de pares	Tipo de sustancia	gl	Sig. (bilateral)
24 horas	1	CLORHEXIDINA 0,12 % - TIMOL 0,1 %	15	0,000
	2	CLORHEXIDINA 0,12 % - TIMOL 0,5 %	15	0,000
	3	CLORHEXIDINA 0,12 % - TIMOL 1 %	15	0,001
	4	NISTATINA 0,12 % - TIMOL 0,1 %	15	0,000
	5	NISTATINA 0,12 % - TIMOL 0,5 %	15	0,000
	6	NISTATINA 0,12 % - TIMOL 1 %	15	0,001
	7	TIMOL 0,1% - TIMOL 0,5%	15	0,000
	8	TIMOL 0,1% - TIMOL 1 %	15	0,000
	9	TIMOL 0,5% - TIMOL 1 %	15	0,000
48 horas	1	CLORHEXIDINA 0,12 % - TIMOL 0,1 %	15	0,000
	2	CLORHEXIDINA 0,12 % - TIMOL 0,5 %	15	0,000
	3	CLORHEXIDINA 0,12 % - TIMOL 1 %	15	0,001
	4	NISTATINA 0,12 % - TIMOL 0,1 %	15	0,000
	5	NISTATINA 0,12 % - TIMOL 0,5 %	15	0,000
	6	NISTATINA 0,12 % - TIMOL 1 %	15	0,001
	7	TIMOL 0,1 % - TIMOL 0,5%	15	0,000
	8	TIMOL 0,1 % - TIMOL 1%	15	0,000
	9	TIMOL 0,5 % - TIMOL 1%	15	0,000

Tabla 2. Prueba de Wilcoxon

Nº de pares	Z	Sig. asintótica (bilateral)
1. CLORHEXIDINA 0,12% - TIMOL 0,1%	-2,724	0,006
2. CLORHEXIDINA 0,12% - TIMOL 0,5%	-2,584	0,011
3. CLORHEXIDINA 0,12% - TIMOL 1 %	-2,410	0,016
4. NISTATINA 0,12% - TIMOL 0,1 %	-1,622	0,005
5. NISTATINA 0,12% - TIMOL 0,5 %	-1,410	0,003
6. NISTATINA 0,12% - TIMOL 1 %	-1,386	0,006
7. TIMOL 0,1% - TIMOL 0,5 %	-2,438	0,007
8. TIMOL 0,1% - TIMOL 1 %	-2,670	0,008
9. TIMOL 0,5% - TIMOL 1 %	-2,462	0.006

Finalmente, al comparar las muestras entre las 24 y 48 horas mediante la prueba Wilcoxon, se observa que de todas las medidas obtenidas a las 24 horas, solo las de nistatina 0,12 % tiene variación a las 48 horas, las mismas que se han reducido al haber crecimiento de hongos (tabla 2), con un valor de significancia de 0,001. El timol al 1% muestra un ($p=0,005$), el timol al 0,1 % muestra un ($p=0,010$), es decir, el efecto antifúngico de las soluciones del timol es directamente proporcional al grado de concentración, siendo más efectivo timol al 1%.

DISCUSIÓN

El timol al 1 % presentó acción anti fúngica sobre *Candida albicans* al considerar la incubación a las 48 horas, confirmando lo reportado en estudios previos que asocian estos resultados a una interferencia de la síntesis y/o presencia de ergosterol en la membrana plasmática ⁽¹²⁾, así como, una reducción de la viabilidad de células de *C. albicans* mediante técnicas de imágenes de fluorescencia en superficies acrílicas ⁽¹³⁾, observándose un efecto inhibitorio tanto del aceite del

timol como de su derribados directamente proporcional a las concentraciones empleadas ⁽¹⁴⁾.

El Sulfato de Zinc, en varias presentaciones, ha mostrado un efecto adecuado como alternativa en infecciones asociadas a la presencia de *C. albicans* ⁽⁵⁾. En ese mismo sentido, el hipoclorito de sodio al 2 % y el gluconato de clorhexidina al 0.12 % mostraron resultados satisfactorios ⁽³⁾, observándose una disminución de su eficacia proporcional al tiempo, lo cual no fue apreciado en este estudio donde el efecto inhibitorio aumentó a medida que el tiempo de incubación se prolongó, lo cual resulta eficaz.

Estudios in vitro han añadido sustancias químicas como el EDTA en combinación de aceites esenciales, donde tal combinación ha mostrado un efecto sinérgico de potencia, incrementando los halos de inhibición, mostrando baja toxicidad en mucosas y convirtiéndose en un preparado con actividad fungicida para ser usado a futuro, sin embargo, es necesaria la realización de más estudios in vivo ⁽¹⁵⁾.

El timol corresponde a un aceite esencial, sin embargo, aunque algunos de ellos han sido probados, como el de la cáscara de toronja *Citrus Paradisi*, sus efectos antifúngicos no fueron satisfactorios (16). Ecuador, por ser un país en vías de desarrollo en el que es posible encontrar comunidades que no han podido acceder con facilidad al sistema de salud debido a sus recursos o ubicación, opta por el empleo de plantas y de la medicina tradicional ancestral con el objetivo de mejorar la calidad de vida de quienes padecen diferentes enfermedades (17).

Existen actualmente alrededor de 3000 aceites esenciales de los cuales apenas el 10% posee un impacto positivo en la industria farmacéutica. Los componentes de los aceites esenciales son metabolitos secundarios de plantas que pueden ser separados físicamente del tejido membranoso. Tradicionalmente, los aceites esenciales han sido utilizados como bactericidas, fungicidas, antiparasitarios, analgésicos y espasmolíticos. Sin embargo, el carácter lipofílico de los aceites esenciales, dificulta su administración para ser utilizado como agentes antimicrobianos (18). La literatura ha demostrado que los monoterpenos, como timol, carvacrol y citral, han mostrado actividad fungicida alta contra *C. albicans*., a diferencia de la naturaleza fungistática del fluconazol (19). El uso de timol presentó un daño significativo sobre la biosíntesis de ergosterol, rompiendo la integridad de la membrana bacteriana, resultados que se comparan con el presente estudio in vitro.

Entre las limitaciones de la investigación, se debe mencionar que la metodología permite realizar los objetivos planteados, dando una explicación precisa y directa sobre el efecto antimicótico del timol sobre cepas de *Candida*. Algunas cuestiones de interés como la falta de información sobre el timol requerirían un resultado complementario este estudio se plantea como una primera aproximación que requiere mayor profundidad, sugiriendo en base a los resultados que se invite a realizar más estudios para la veracidad de estos. Si bien es cierto, en la composición en diferentes productos comerciales están incluidos aceites

esenciales como el timol, es necesario seguir analizando diferentes concentraciones y plantas con sus respectivos extractos.

Si bien es cierto, en la composición en diferentes productos comerciales están incluidos aceites esenciales como el timol, es necesario seguir analizando diferentes concentraciones y plantas con sus respectivos extractos. La literatura sobre el compuesto timol como tal es reducida, lo que constituyó una limitante para este estudio en la parte estadística como teórica; sin embargo, la alta frecuencia de pacientes edéntulos y pacientes portadores de prótesis en conjugación con los resultados encontrados, invitan a que nuevos estudios sean ejecutados en esta misma línea, buscando encontrar el antimicótico adecuado que además de controlar la infección fúngica evite alguna alteración a las estructuras bucales donde toma contacto.

Con los resultados del estudio in vitro ejecutado, se puede concluir que el timol al 0,5 y 1 % mostró un efecto inhibitorio mayor que la clorhexidina y la nistatina sobre *Candida albicans*, lo que convierte al timol en una alternativa terapéutica para la candidiasis, reduciendo la frecuencia de efectos secundarios causados por la clorhexidina y otras sustancias químicas.

Contribuciones de autoría: AJ, JT, SE, MV y AA diseñaron el estudio, recopilaron y analizaron los datos, redactaron y aprobaron el manuscrito.

Fuente de financiamiento: Autofinanciado.

Conflicto de intereses: Los autores declararon no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

1. Mardani M, Badiee P, Gharibnavaz M, Jassebi A, Jafarian H, Ghassemi F. Comparison of anti-*Candida* activities of the ancient plants *Lawsonia inermis* and *Ziziphus spina christi* with antifungal drugs in *Candida* species isolated from oral cavity. *Journal of Conservative Dentistry*. 2018 Dec; 21(4): 359–362.

2. Reinhardt LC, Nascente PD, Ribeiro JS, Etges A, Lund RG. A single-center 18-year experience with oral candidiasis in Brazil: a retrospective study of 1,534 cases. *Brazilian Oral Research*. 2018 Dec; 32 (92).
3. Ellepola AN, Khajah R, Jayatilake S, Samaranyake L, Sharma P, Khan Z. Impact of brief exposure to antifungal agents on the post-antifungal effect and hemolysin activity of oral *Candida albicans*. *Journal of Applied Oral Science*. 2015 Dec; 23(4): 412–418.
4. Dias RP. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC* 2015 Dec; 15(2).
5. Goulart LS, Souza WW, Vieira CA, Lima JS, Olinda RA, Araújo C. Oral colonization by *Candida* species in HIV-positive patients. association and antifungal susceptibility study. *Einstein*. 2018 Dec; 16(3).
6. Scalvenzi L YBCPea. Cambios morfológicos e inhibición del crecimiento de *Candida albicans* en presencia de una solución de sulfato de zinc. *Bioagro*. 2016 Dec; 28: 8-14.
7. Wang Y, Li J, Sun W, Li H, Cannon RD, Mei L. Effect of non-fluoride agents on the prevention of dental caries in primary dentition: A systematic review. *PLoS ONE*. 2017 Dec; 12(8).
8. Castro RD, Souza TM, Bezerra LM, Ferreira GL, Brito EM, Cavalcanti AL. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2015 Dec; 15:417.8.
9. Zambrano IL, Buenaño AM, Mancera RN, Jiménez RE. Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Universidad y Salud*. 2015 Dec; 17: (1). 97-111.
10. Jones SB, West NX, Nesmianov PP, Krylov SE, Klechkovskaya VV, Arkharova NA, Zakirova SA. The antibacterial efficacy of a foam mouthwash and its ability to remove biofilms. *BDJ Open*. 2018 Dec; 4:17038.
11. Bascones A, Morante S. Antisépticos orales. Revisión de la Literatura y perspectiva actual. *Avances*. 2006;18 (1): 21-29.
12. Castro RD, Souza TM, Bezerra LM, Ferreira GL, Brito CE, Cavalcanti AL. Antifungal activity and mode of action of thymol and its synergism with nystatin against *Candida* species involved with infections in the oral cavity: an in vitro study. *Complementary and Alternative Medicine*. 2015 Dec; 15: 2-7.
13. Vasconcelos LC, Sampaio FC, Albuquerque AJ, Vasconcelos LC. Cell Viability of *Candida albicans* Against the Antifungal Activity of Thymol. *Braz Dent J*. 2014 Dec; 25(4): 277-281.
14. Brito DI, Morais MF, Cunha FA, Albuquerque RS, Carneiro JN, Lima MS, Leite NF, Souza CE, Andrade JC, Alencar LB, Lavor AK, Figueredo FG, Lima LF, Coutinho HD. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. *Rev. Bras*. 2015 Dec; 17(4): 836-844.
15. Rojas J, Ortiz J, Jáuregui J, Ruiz J, Almonacid R. Aceite esencial de *Thymus vulgaris* L (tomillo), su combinación con EDTA contra *Candida albicans* y formulación de una crema. *An. Fac. med*. 2015 Jul; 76(3).
16. Churata OD, Ramos PD, Moromi NH, Martínez CE, Castro LA, Garcia GR. Efecto antifúngico de *Citrus paradisi* "toronja" sobre cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con estomatitis subprotésica. *Rev Estomatol Herediana*. 2016 Dec; 26(2): 78-84.
17. Torrenegra AM, Granados CC, Durán LM, León MG, Yáñez RX, Martínez C, Pájaro CN. Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. *Orinoquia*. 2016 Dec; 20(1): 69-74.
18. López RJ, Espinosa AH, García E, Herrera SE. Efecto antifúngico de emulsiones a base de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*), contra *Candida albicans*. *Salud Jalisco*. 2018 Abr; 5(1): 42-45.
19. Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousul S, Xess 1, Khan LA, et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 30:41-50.