

09

Fecha de presentación: febrero, 2024

Fecha de aceptación: mayo, 2024

Fecha de publicación: julio, 2024

EFFECTIVIDAD

EN EL USO DEL BIOPREPARADO “TIMOL” FRENTE A UNA MUESTRA DE CEPAS DE STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

EFFECTIVENESS OF THE USE OF THE BIOPREPARATION “TIMOL” AGAINST A SAMPLE OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE STRAINS

Mónica Viviana Moscoso Silva ^{1*}

E-mail: ua.monicams13@uniandes.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-5252-5276>

Raúl Gonzáles Salas ¹

E-mail: ua.raulgonzalez@uniandes.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1623-3709>

Anahí Belén Bonilla Rodríguez ¹

E-mail: ua.anahibr80@uniandes.edu.ec

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-8886-7022>

*Autor para la correspondencia

¹ Universidad Regional Autónoma de Los Andes, Ambato, Ecuador.

Cita sugerida (APA, séptima edición)

Moscoso Silva, M. V., Gonzáles Salas, R. & Bonilla Rodríguez, A. B. (2024). Efectividad en el uso del biopreparado “timol” frente a una muestra de cepas de streptococcus pneumoniae. *Universidad y Sociedad*, 16(4), 89-98.

RESUMEN

Los aceites esenciales sirven como un sustituto viable para la utilización de antimicrobianos convencionales. En la actualidad, la distribución mundial de cepas de *Streptococcus pneumoniae* son resistentes a la penicilina. Esta bacteria en particular posee la capacidad de causar daño a los seres humanos. Se evalúa la eficacia antimicrobiana del timol, un compuesto activo que se encuentra en el aceite de tomillo. Se examinaron un total de 30 cepas distintas de *Streptococcus pneumoniae*. La metodología empleada en este estudio fue la técnica de microdilución en caldo. Los resultados revelarán que la mayoría de las cepas mostraron resultados similares tanto en las pruebas de concentración inhibitoria mínima como en las de concentración bactericida mínima. Estas alteraciones permitieron a los investigadores detectar y establecer de manera efectiva la actividad antimicrobiana del timol como una posible opción de tratamiento alternativo.

Palabras clave: Concentración inhibitoria mínima, Concentración bactericida mínima, Potencial microcida, *Thymus vulgaris*.

ABSTRACT

Essential oils serve as a viable substitute for the use of conventional antimicrobials. Currently, the worldwide distribution of strains of *Streptococcus pneumoniae* are resistant to penicillin. This particular bacterium has the ability to cause harm to humans. The antimicrobial efficacy of thymol, an active compound found in thyme oil, is evaluated. A total of 30 different strains of *Streptococcus pneumoniae* were examined. The methodology used in this study was the broth microdilution technique. The results reveal that most of the strains showed similar results in both the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration tests. These alterations allowed the researchers to effectively detect and establish the antimicrobial activity of thymol as a possible alternative treatment option.

Keywords: Minimum inhibitory concentration, Minimum bactericidal concentration, Microcidal potential, *Thymus vulgaris*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas siempre se han considerado como uno de los recursos naturales más importantes para la población humana debido a sus beneficios multifacéticos, que van más allá del simple suministro de sustento para abarcar el tratamiento y el alivio de diversas dolencias y lesiones físicas, lo que las convierte en un activo indispensable para la humanidad (Zapata et al., 2010). La fitoterapia contemporánea ha puesto de relieve la importancia de investigar exhaustivamente las propiedades de numerosas plantas que siguen siendo enigmáticas en el ecosistema, desde una perspectiva terapéutica (Faucon, 2014). El *Thymus vulgaris*, más conocido como tomillo, representa un excelente ejemplo de una planta que se emplea ampliamente en la medicina tradicional para mejorar las enfermedades respiratorias. Este espécimen botánico pertenece a la familia de las *Lamiaceae* y se caracteriza por su estructura arbustiva de hoja perenne, con hojas aromáticas diminutas, densamente compactas, de color verde grisáceo, que tienen racimos de resplandecientes flores de color púrpura o rosa (Silva et al., 2021).

La extracción del aceite esencial de tomillo se realiza mediante el proceso de destilación al vapor, lo que produce un producto que presenta concentraciones que oscilan entre el 37% y el 55% de timol y del 0,5% al 5,5% de carvacrol, los cuales constituyen los principales componentes volátiles (Prasanth-Reddy et al., 2014). Estos elementos han ganado un inmenso reconocimiento y una amplia aplicación en diversos ámbitos, como su utilización como agentes antifúngicos, antivirales, antineoplásicos, antiinflamatorios y antibacterianos (Acosta et al., 2000). La esencia de tomillo ha mostrado propiedades antisépticas superiores en comparación con el fenol y el peróxido de hidrógeno, atribuibles principalmente a su profundo impacto en la membrana bacteriana (Kowalczyk et al., 2020).

Durante incontables años, el aceite esencial de tomillo se ha empleado convencionalmente con fines terapéuticos, especialmente para tratar problemas respiratorios como los resfriados, la tos y la congestión nasal, debido a sus propiedades expectorantes y antibacterianas (Salehi et al., 2018). Además, se han dedicado amplias investigaciones a explorar su potencial para fortalecer el sistema inmunológico, mitigar el dolor y la inflamación y facilitar una digestión saludable. Al mismo tiempo, el aumento de la resistencia a los antibióticos ha supuesto un enorme desafío para los profesionales de la medicina, que se ven obligados a diseñar regímenes de tratamiento racionales

y basados en la evidencia para mejorar el bienestar de los pacientes (Llor et al., 2018).

El alarmante aumento de la resistencia que muestran los neumococos, en particular a los betalactámicos y los macrólidos, ha sido motivo de gran preocupación. Investigaciones anteriores han corroborado el desconcertante hecho de que aproximadamente el 40% de los neumococos presentan un fenotipo multirresistente, es decir, resistencia a tres o más antibióticos, y la prevalencia varía significativamente de un país a otro (Brooks y Mias, 2018). Los enfoques para combatir las infecciones neumocócicas abarcan la administración de antibióticos y vacunas antineumocócicas. Sin embargo, resulta desalentador observar que las cepas neumocócicas han desarrollado una resistencia alarmante a la eritromicina, la clindamicina, la tetraciclina y el trimetoprim-sulfametoxazol, e incluso son resistentes a la penicilina en los casos de meningitis neumocócica (Tubau et al., 1996).

El *Streptococcus pneumoniae*, un microorganismo anaeróbico que normalmente aparece en pares o cadenas cortas, representa un agente patógeno grampositivo facultativo que afecta a los seres humanos y es el principal factor causante de la aparición de la neumonía adquirida en la comunidad (Han et al., 2022). Es crucial destacar la importancia de comprender las propiedades antimicrobianas del timol, ya que se sabe que el *Streptococcus pneumoniae* causa una variedad de manifestaciones clínicas, que afectan especialmente al tracto respiratorio superior. Estas manifestaciones incluyen la otitis media, la mastoiditis y la sinusitis. Sin embargo, cabe mencionar que la meningitis, que puede atribuirse a la entrada directa de un microorganismo a través de una fistula nasofaringe-espacio meníngeo, también se destaca como una posible complicación de la neumonía, la bacteriemia, la mastoiditis, la sinusitis o la endocarditis (Weiser et al., 2018). La transmisión, colonización e invasión exitosas del *Streptococcus pneumoniae* dependen en gran medida de su extraordinaria capacidad para evadir las respuestas inflamatorias e inmunitarias del huésped. En consecuencia, comprender la eficacia del timol para combatir este patógeno es de suma importancia para combatir las manifestaciones clínicas asociadas (Reinert, 2009).

El objetivo principal de este estudio es evaluar la eficacia antimicrobiana del timol contra un conjunto seleccionado de cepas que pertenecen a la bacteria *Streptococcus pneumoniae*. Esto se logra al determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI), la concentración bactericida mínima (CMB) y el potencial microcida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Principio Activo

El principio activo utilizado fue Timol (2- Isopropyl-5- methylphenol, Sigma Aldrich T0501) (San Luis, Estados Unidos) con una pureza > 98.5%.

Antibiótico

El antibiótico seleccionado para el control de calidad fue Penicilina (*Penicillum G sodium* salt-P3032-10MU, Sigma Bioreagent) suministrado por Sigma Aldrich (San Luis, Estados Unidos).

Cepas bacterianas

Para el estudio de la actividad antimicrobiana del principio activo timol frente a *Streptococcus pneumoniae* se han utilizado un total de 30 cepas, 29 de ellas aisladas de casos clínicos y portadores asintomáticos atendidos en el hospital Virgen del Rocío de Sevilla (España) entre 2001 y 2018, más la cepa de referencia *Streptococcus pneumoniae* ATCC49619, ver tabla 1.

Tabla 1: Cepas utilizadas en la investigación.

Cepa	Adulto/Niño	Origen	Patología	Serotipo
ATCC 49619 (Cepa Referencia)	-	-	-	-
M32 (Cepa Referencia)	-	-	-	-
R6 (C. Referencia)	-	-	-	-
TIGR-4 (Cepa Referencia)	-	-	-	-
13-H	Niño	-	-	-
99-H	Niño	-	-	-
Cepa	Adulto/Niño	Origen	Patología	Serotipo
83-H	Niño	Líquido pleural	Empiema	1
70-H	Niño	Sangre	Neumonía	7F
94-H	Niño	-	-	-
029-H	Niño	Sangre	Meningitis	19F
65-H	Niño	Sangre	Meningitis/ Sepsis	6B
88-H	Niño	-	-	-
049-H	Niño	LCR/Sangre	Meningitis	19 ^a
98-H	Niño	Sangre	Neumonía	14
72-H	Niño	Sangre	Neumonía	14
6-H	Niño	-	-	-
003-H	Niño	Sangre	-	9V

87-H	Niño	-	Meningitis	18C
56-H	Niño	-	-	-
5380-7F	Adulto	-	-	-
Cepa	Adulto/Niño	Origen	Patología	Serotipo
5333-19A	Adulto	-	-	-
5278-14	Adulto	-	-	-
5284-9V	Adulto	-	-	-
5343-18	Adulto	-	-	-
5231-9V	Adulto	-	-	-
5334	Adulto	-	-	-
5344-19	Adulto	-	-	-
5345-1	Adulto	-	-	-
5342-3	Adulto	-	-	-

Fuente: Información tomada de la investigación realizada según Pino-Pérez et al. (2018).

Preparación del inóculo.

Se sigue el protocolo descrito por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Humphries et al., 2018) para pruebas de susceptibilidad con antimicrobianos donde indica que los ensayo in vitro deben realizarse con un inóculo final de 5×10^5 UFC/ml.

A partir de un cultivo puro de la cepa problema en agar Mueller-Hinton Sangre (MHS) (Oxoid Ltd), obtenido tras 24 h de incubación a 37 °C en microaerofilia (5% CO₂), se suspendieron varias colonias en 1 ml de solución salina estéril hasta obtener un inóculo de densidad óptica 0.08-0.1 ($\lambda = 595$ nm), equivalente a una concentración de 10⁸ UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias). Se tomaron 100 μ l de esta suspensión y se diluyeron en 9,9 ml de caldo de infusión Cerebro-Corazón (ICC) (Oxoid Ltd.) a fin de alcanzar la concentración inicial de ensayo, 10⁶ UFC/ml.

Método de micro dilución del Timol.

Se disuelve el reactivo de timol con alcohol etílico de 90° y se prepararon diluciones dobles seriadas del Timol en caldo de infusión Cerebro-Corazón (ICC) (Oxoid Ltd.) suplementado con un 0.15% de agarosa, de modo que el rango final de ensayo fuese de 19,531 a 10000 μ g/ml. Las soluciones se realizan en tubos estériles de 50 ml y posteriormente se dispensan 100 μ l de cada dilución en una placa microtiter de 96 pocillos (Greiner Bio-one, Barcelona, ES) para su inoculación con un volumen igual de inóculo bacteriano de 10⁶ UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonias). Las placas se incubaron con tapaderas autoadhesivas, para evitar la interacción de los componentes volátiles, durante 24 horas a 37°C en aerofilia. Se diluyeron controles de crecimiento positivo (caldo inoculado sin aceite) y negativo (caldo sin aceite y sin inóculo).

Para comprobar la concentración del inóculo, se diluyeron 10 μ l del pocillo del control positivo en 10 ml de caldo de infusión cerebro-corazón y se sembraron 100 μ l en una placa de agar MHS. Tras incubar a 37 °C durante 24 horas el número de colonias en la placa debía estar en torno a 50.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determina como la menor concentración de aceite capaz de inhibir el crecimiento visible del inoculo bacteriano en los pocillos. Para determinar la concentración mínima bactericida (CMB), se sembraron en agar Mueller-Hinton Sangre (MHS) (Oxoid Ltd.) 10 μ l de los tres últimos pocillos sin crecimiento bacteriano visible. Las muestras se hicieron por triplicado para mayor fiabilidad del ensayo.

Análisis Estadísticos.

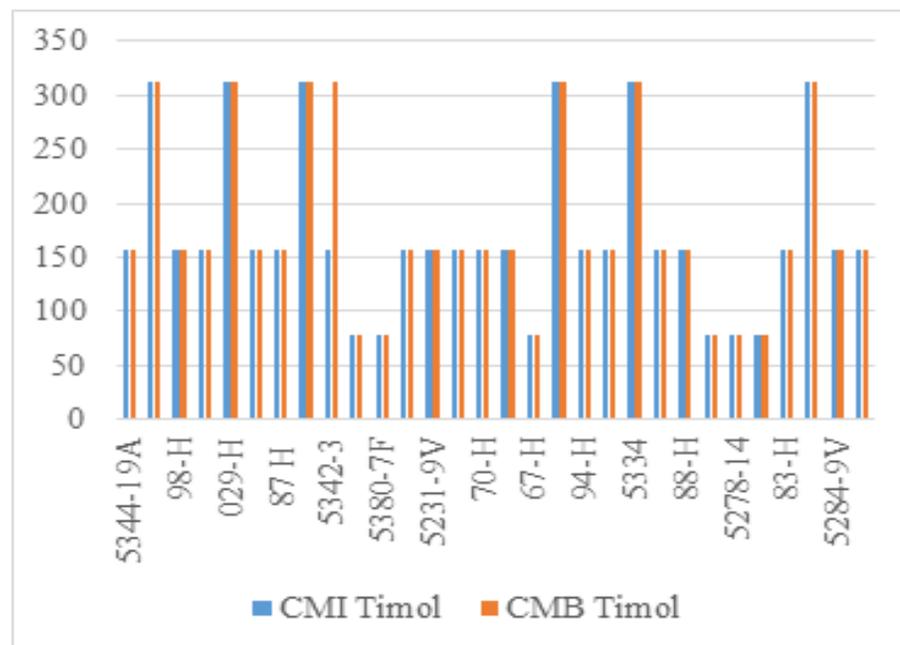
Los cálculos estadísticos se realizaron mediante el software Microsoft Excel 2010. Se evalúa los valores medios de CMI y CMB de las 30 cepas de *Streptococcus pneumoniae* y a partir de los cálculos obtenidos se determinó la distribución de frecuencias, posteriormente se evaluó la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida 50 Y 90 (MIC50 y MIC90; MBC50 y MBC90) para observar la dilución de producto capaz de inhibir y destruir el 50 y el 90% de las cepas.

Se determina el potencial microcida de timol mediante la estimación de la relación CMI90/CMB90. También se realiza una comparación en la efectividad del Timol ante las cepas estudiadas, mediante el análisis de varianza utilizando una significación al 99 % (p) mediante la prueba estadística de Tukey en el paquete estadístico InfoStat. Para la utilización de este método de comparación de medias se analizaron los supuestos estadísticos como: la prueba de normalidad de los valores de efectividad del Timol ante las cepas bacterianas por la prueba de Kolmogorov-Smirnov al 99 % de significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Figura 1 ilustra la eficacia antimicrobiana del timol contra una amplia gama de cepas de *Streptococcus pneumoniae*. Esta figura proporciona información completa sobre la mediana del valor obtenido tanto para la concentración inhibitoria mínima (CMI) como para la concentración bactericida mínima (CMB) de 30 cepas que se sometieron a pruebas. Al analizar los resultados obtenidos mediante la utilización del ingrediente activo timol y su interacción con varias cepas de *Streptococcus pneumoniae*, resulta evidente que la mayoría de las cepas mostraron valores de MIC y CMB similares, dentro del rango de concentración de 78,125 μ g/ml a 312,5 μ g/ml. Sin embargo, hubo una cepa que muestra valores de CMB y MIC divergentes, lo que dio lugar a resultados distintos. Esta observación significa que la inhibición y la erradicación de esta cepa en particular requieren concentraciones más altas del compuesto.

Fig 1: Valores obtenidos para la CMI y la CMB frente a las 30 cepas ensayadas.



Fuente: Elaboración propia.

La Tabla 2 proporciona una representación visual de la distribución de frecuencias de las cepas CMI y CMB. Los resultados de la distribución de la susceptibilidad se utilizaron para determinar las concentraciones de CMI50, CMI90, CMB50 y CMB90 necesarias para inhibir y eliminar el 50% y el 90% de las cepas de *S. pneumoniae* analizadas. En general, se puede deducir que aproximadamente el 80% de las cepas mostraron valores de CMI y CMB comprendidos entre 156,25 µg/ml y 312,5 µg/ml.

Tabla 2: Distribución de Frecuencias de la CMI y CMB.

Distribución de frecuencias de la CMI									Parámetros Estimados	
Diluciones ensayadas (µg/ml) y N° de cepas									CMI50	CMI90
Producto	39,062	78,125	156,25	312,5	625	1250	2500	5000	(µg/ml)	(µg/ml)
Timol	0	6	18	6	0	0	0	0	156,25	312,5
Distribución de frecuencias de la CMB									Parámetros Estimados	
Diluciones ensayadas (µg/ml) & N° de cepas									CMB50	CMB90
Producto	39,062	78,125	156,25	312,5	625	1250	2500	5000	(µg/ml)	(µg/ml)
Timol	0	6	17	7	0	0	0	0	156,25	312,5
CMI50 y CMB50: concentración (µg/ml) obtenida en el 50% de las cepas (15/30).										
CMI90 y CMB90: concentración (µg/ml) obtenida en el 90% de las cepas (27/30).										

Fuente: Elaboración propia.

Al considerar la CIM de 312,5 µg/ml, se observa que un total de 6 cepas muestran susceptibilidad a esta concentración. Del mismo modo, para la concentración de 156,25 µg/ml, se encuentra que 18 cepas eran susceptibles. Por último, con la concentración más baja de timol, 78,125 µg/ml, solo 6 cepas demuestran ser vulnerables.

Por el contrario, los resultados obtenidos con el CMB mostraron cierta variabilidad, ya que la concentración de 312,5 µg/ml produjo 7 cepas susceptibles, mientras que la concentración de 156,25 µg/ml dio como resultado 17 cepas susceptibles. Además, la concentración más baja de timol, 78,125 µg/ml, solo arrojó un total de 6 cepas susceptibles.

La actividad inhibitoria y bactericida constante observada en el timol revela su potencial como agente bactericida contra el *Streptococcus pneumoniae*, con un índice de naturaleza bactericida de 1. Esto significa la capacidad del timol para erradicar eficazmente las cepas bacterianas.

Los aceites esenciales tienen numerosas propiedades medicinales, investigaciones realizadas para evaluar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano y tomillo contra la bacteria *Staphylococcus aureus*, demostraron que las concentraciones al 100% de pureza muestran un mayor efecto inhibitorio, la CMI promedio fue de 0,12% confirmando la propiedad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (Ortega, 2018).

Otra investigación realizada contra los principales patógenos bacterianos respiratorios entre ellos *Streptococcus suis*, que infecta al ganado porcino, demostraron que el principio activo timol posee una mayor actividad inhibitoria con 156,25 µg/ml para la concentración de CMI50-90 (Pino-Pérez et al., 2018).

La eficacia antimicrobiana in vitro del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) con concentraciones de 1, 5, 10, 30, 50, 70 y 90% resultaron altamente eficaces no permitiendo el desarrollo bacteriano de la cepa de *Staphylococcus aureus*, incluso a concentraciones bajas se evidencia la capacidad de acción bactericida que logra el aceite esencial de tomillo (Montero et al., 2018).

La importancia de buscar alternativas contra infecciones agudas del sistema respiratorio, permitiría encontrar nuevas terapias que permitan eliminar microorganismos como *Streptococcus pneumoniae*, que es el principal causante de neumonía adquirida en la comunidad, identificar los patógenos responsables es crucial para garantizar un tratamiento adecuado y evitar retrasos o terapias ineficaces (Candel et al., 2023).

La Tabla 3 muestra el análisis de normalidad de los datos por la prueba Kolmogorov-Smirnov. En ella la significación al 99 % es grande significa que, siendo cierta la hipótesis nula, el valor observado era esperable. Por tanto, no hay razón

para rechazar dicha hipótesis. Asimismo, si la significación fuera pequeña, ello indica que, siendo cierta la hipótesis nula, era muy difícil que se produjera el valor observado. Ello obliga a poner muy en duda, y por tanto a rechazar, la hipótesis nula. En este caso los valores de actividad del timol frente a las cepas estudiadas en algunos casos son de significancia, y por su heterogeneidad se puede proceder a realizar la prueba de comparación de medias por Tukey.

Tabla 3: Análisis de normalidad de los datos por la prueba Kolmogorov-Smirnov y análisis de varianza por la prueba de Tukey al 99 % de significación.

Cepas	Significación	Varianza
ATCC 49619	0.000	A
M32	0.002	A
R6	0.004	B
TIGR-4	0.006	B
13-H	0.008	B
99-H	0.010	C
	0.012	C
83-H	0.014	C
	0.016	C
70-H	0.018	C
	0.002	A
94-H	0.022	C
	0.024	C
029-H	0.026	C
	0.028	C
65-H	0.003	A
	0.032	D
88-H	0.034	D
	0.036	D
049-H	0.038	D
	0.040	D
98-H	0.042	D
	0.044	D
72-H	0.046	D
	0.048	D
6-H	0.005	B
	0.052	D
003-H	0.054	D
	0.056	D
87-H	0.058	D
	0.060	D
56-H	0.062	D
	0.064	D

5380-7F	0.066	D
	0.068	D
5333-19A	0.007	B
	0.072	D
5278-14	0.074	D
	0.076	D
5284-9V	0.078	D
	0.080	D
5343-18	0.082	D
	0.084	D
5231-9V	0.086	D
	0.088	D
5334	0.009	C
	0.092	D
5344-19	0.094	D
	0.096	D
5345-1	0.098	D
	0.100	D
5342-3	0.102	D
	0.104	D

Fuente: Elaboración propia.

La actividad microcida del aceite de tomillo contra 7 bacterias y hongos comunes relacionados con las cepas bacterianas que se probaron se refleja también en la Tabla 3. Letras diferentes indican el grado de heterogeneidad derivado del análisis de varianza. El principal hallazgo del análisis de varianza es un fuerte efecto de interacción entre el tipo de microorganismo y la concentración de aceite esencial. Este efecto de interacción significativo plantea desafíos a la hora de extraer conclusiones generales sobre los efectos principales, a pesar de que ambos factores son altamente significativos. Para comparar exhaustivamente el efecto de *Thymus vulgaris* en cada microorganismo, se deben considerar los resultados de comparaciones múltiples en cada concentración de aceite (Arendrup et al., 2017; Marino et al., 1999).

Los datos experimentales obtenidos confirmarían el potencial del timol como antimicrobiano, sin embargo, la actividad antimicrobiana observada no es mayor que la del aceite esencial del tomillo, lo cual indicaría que la sinergia entre los diferentes compuestos del aceite de tomillo determinaría su eficacia frente a *Streptococcus pneumoniae* (Arendrup et al., 2017).

CONCLUSIONES

El estudio realizado para determinar la susceptibilidad de *Streptococcus pneumoniae* al timol en un entorno de laboratorio controlado, conocido como *in vitro*, indica una actividad bactericida sólida y potente del timol. Este hallazgo es de gran importancia, ya que muestra las posibles propiedades terapéuticas del timol para combatir el *Streptococcus pneumoniae*, una bacteria patógena responsable de causar diversas infecciones, incluida la neumonía. Los resultados de este estudio demuestran que el timol posee la capacidad de inhibir eficazmente el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, con una concentración que inhibe al 90% de la población bacteriana (CMI90) y una concentración que mata al 90% de la población bacteriana (CMB90) registrada como 312,5 µg/ml.

Además, se encuentra que el índice bactericida, que mide la capacidad de una sustancia para matar bacterias, es igual a 1, lo que destaca aún más las potentes propiedades bactericidas del timol. Estos hallazgos arrojan luz sobre el potencial de utilizar el timol como agente terapéutico contra las infecciones por *Streptococcus pneumoniae* y subrayan la importancia de explorar los recursos naturales, como las plantas y sus aceites esenciales, para el

desarrollo de nuevos tratamientos para las enfermedades infecciosas.

La literatura anterior ha documentado la inhibición del crecimiento de diversos microorganismos, a saber, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans* y *Salmonella typhimurium*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, O., Castro, A., Roque, M., & Felix, L. (2000). Determinación de la composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L." Tomillo", determinada por cromatografía de fase gaseosa, espectrometría de masa GCIMS y análisis de su actividad antimicrobiana. *Ciencia e Investigación*, 3(2), 69-78. <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/download/5326/4416>
- Arendrup, M., Prakash, A., Meletiadiis, J., Sharma, C., & Chowdhary, A. (2017). Comparison of EUCAST and CLSI reference microdilution MICs of eight antifungal compounds for *Candida auris* and associated tentative epidemiological cutoff values. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(6), 10-1128. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5444165/>
- Brooks, L., & Mias, G. (2018). *Streptococcus pneumoniae*'s virulence and host immunity: aging, diagnostics, and prevention. *Frontiers in immunology*, 9, 1366. <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.01366/full>
- Candel, F., Salavert, M., Basaras, M., Borges, M., Cantón, R., Cercenado, E., ... & Serrano, L. (2023). Ten Issues for Updating in Community-Acquired Pneumonia: An Expert Review. *Journal of Clinical Medicine*, 12(21), 6864. <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0043-1778139>
- Faucon, M. (2014). Principios de aromaterapia científica y aplicaciones prácticas en podología. *EMC-Podología*, 16(1), 1-8. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1762827X14666840>
- Han, X., Yu, H., Molina Águila, N., & Toledo Romaní, M. E. (2022). Serotipos y resistencia antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* en población pediátrica china: una revisión de alcance. *MediSur*, 20(6), 1187-1199. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1727897X2022000601187&script=sci_arttext&tling=en
- Humphries, R., Abbott, A., & Hindler, J. (2019). Understanding and addressing CLSI breakpoint revisions: a primer for clinical laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(6), 10-1128. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6535595/>
- Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. *Molecules*, 25(18), 4125. <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/18/4125/pdf>
- Llor, C., Boada, A., Pons-Vigués, M., Grenzner, E., Juvé, R., & Almeda, J. (2017). Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* in healthy carrier individuals in primary care in Barcelona area. *Atención primaria*, 50(1), 44-52. <https://europepmc.org/article/med/28413102>
- Marino, M., Bersani, C., & Comi, G. (1999). Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Thymus vulgaris* L. measured using a bioimpedometric method. *Journal of Food Protection*, 62(9), 1017-1023. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X22039606/pdf?md5=09458c700b68fd47508eaba48f6cf657&pid=1-s2.0-S0362028X22039606-main.pdf>
- Montero-Recalde, M., Mira, J., Aviles-Esquivel, D., Pazmiño-Miranda, P., & Erazo-Gutiérrez, R. (2018). Antimicrobial efficacy of thyme essential oil (*Thymus vulgaris*) on a *Staphylococcus aureus* strain. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú (RIVEP)*, 29(2), 588-593. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20183205419>
- Ortega, A. B. (2018). *Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo (Thymus vulgaris) y orégano (Origanum vulgare) frente a la bacteria Staphylococcus aureus ATCC: 12600* (Bachelor's thesis). Universidad Politécnica Salesiana. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16043/1/UPS-CT007779.pdf>
- Pino-Pérez, O., Rojas-Fernández, M. M., Sánchez-Pérez, Y., & Espinosa-Castaño, I. (2018). Actividad antibacteriana de aceites esenciales obtenidos de plantas de origen cubano sobre *Streptococcus suis*. *Revista de Salud Animal*, 40(3). http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0253-570X2018000300008&script=sci_arttext&tling=pt
- Prasanth-Reddy, V., Ravi Vital, K., Varsha, P. V., & Satyam, S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Med Aromat Plants*, 3(164), 2167-0412. https://www.researchgate.net/profile/Arvind-Singh-21/post/Can_any_one_please_provide_geographical_distribution_and_botanical_description_of_these_plants/attachment/59d63e0179197b807799ab0b/AS%3A422147907690496%401477659312708/download/7.pdf
- Reinert, R. (2009). The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 7-11. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1469-0691.2009.02724.x>

- Salehi, B., Mishra, A. P., Shukla, I., Sharifi-Rad, M., Contreras, M. D. M., Segura-Carretero, A., ... & Sharifi-Rad, J. (2018). Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phytotherapy research*, *32*(9), 1688-1706. <https://srv2.freepaper.me/n/S9xsF7ZPjhai0Et53MtRMg/PDF/eb/eb19af412c1cdb500d4fa6c934a27b3a.pdf>
- Silva, A., Tewari, D., Sureda, A., Suntar, I., Belwal, T., Battino, M., ... & Nabavi, S. F. (2021). The evidence of health benefits and food applications of *Thymus vulgaris* L. *Trends in Food Science & Technology*, *117*, 218-227. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224421006105>
- Tubau, F., Llares, J., & Matín, R. (1996). Resistencia antibiótica en *Streptococcus pneumoniae*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, *14*, 1-6. <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/pnepp.pdf>
- Weiser, J., Ferreira, D., & Paton, J. (2018). *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(6), 355-367. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5949087/>
- Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Betancur-Galvis, L., & Mesa-Arango, A. C. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamericana de Micología*, *27*(2), 101-103. <http://reviberoammicol.com/2010-27/101103.pdf>