

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

Maestría en Estomatología con opción terminal en Endodoncia

“EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE UNA COMBINACIÓN DE ÁCIDO LEVULÍNICO + DODECIL SULFATO DE SODIO CONTRA *CANDIDA ALBICANS* Y *ENTEROCOCCUS FAECALIS*”

Tesis para obtener el grado de:

Maestra en Estomatología con opción terminal en Endodoncia

Presenta:

C.D. Dafne Urzúa Valenzuela

223450005

Responsable del proyecto:

M.C.O Francisco Javier Castillo Cano

ID: 100445599

Director disciplinario:

M.C.O Briseida Guadalupe Rojas Huerta

Director metodológico:

DC. Cristian Dionisio Román Méndez

ID: 100392244

Director externo:

PhD Dr. Jorge Eugenio Vidal Graniel

Department of Microbiology and Immunology, University of Mississippi Medical
Center, Jackson, MS, United States.

Lector de tesis:

D.C.O Miguel Ángel Casillas Santana

ID: 100526485

Abril 2025

Dictamen de aprobación de Tesis



Oficio No. FESIEP/CIFE/044/2025

C. Dafne Urzua Valenzuela
Estudiante de la Maestría en Estomatología con opción en Terminal en Endodoncia
Matrícula No.: 223450005
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
P R E S E N T E

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, en mi doble calidad de Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado y Presidenta del Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; aprovecho para felicitarla por el avance significativo en su proceso académico. En atención a su solicitud, me permita notificarle que su tesis titulada:

"Evaluación antimicrobiana de una combinación de ácido levulínico + dodecil sulfato de sodio contra *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*"

ha recibido la aprobación oficial para su impresión.

Su trabajo ha sido registrado en el Libro de Registros No. 09, página 01, con el No. de Asignación 2024260, quedando debidamente documentado en esta Secretaría de Investigación. Esta tesis será presentada como parte del procedimiento para su examen profesional, necesario para obtener el grado de Maestría en Estomatología.

Próximos pasos:

1. Impresión de la tesis: Proceda con los trámites de impresión conforme a los lineamientos establecidos por la Facultad.
2. Revisión del documento: Asegúrese de que el texto cumpla con los estándares académicos y formales.
3. Coordinación del examen profesional: Comuníquese con el Responsable de la Etapa Terminal de la Maestría de su elección para programar su examen de grado y gestionar los trámites administrativos correspondientes.

Le recordamos que el cumplimiento de los plazos y requisitos establecidos es fundamental para garantizar la fluidez del proceso.

Reconocimiento y mensaje final:

Este logro refleja su esfuerzo, dedicación y el impacto de su investigación en el ámbito de la Estomatología. Le felicitamos por este avance significativo y confiamos en que continuará demostrando su compromiso académico y profesional.

Para cualquier consulta o información adicional, no dude en comunicarse con nosotros. Estamos a su disposición para acompañarla en esta etapa crucial de su formación.

Sin otro particular, le reitero mi más atenta y distinguida consideración y le deseo éxito en la etapa final de esta carrera académica.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a jueves 03 de abril de 2025

MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana
Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología

*Nota: Se anexa Formato de Impresión de Tesis - C. Dafne Urzua Valenzuela - Maestría en Estomatología - Terminal en Endodoncia - S.I.E.P. - Facultad de Estomatología - BUAP (original) - p.s.c.y.a.

*C.e.p. Archivo

*MCD, FJMA/MEP, GWRQ/guerrero

Secretaría de Investigación y
Estudios de Posgrado
Facultad de
Estomatología

31 poniente 1304, Col. Volcanes
Puebla, Pue.
C.P. 72410
Tel. Of. 22*22 29 55 00
Ext. 5526

Autorización de impresión

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL

Para obtener el Grado de: Maestría en Estomatología con opción en Terminal en Endodoncia.

No. Registro CIFE: 2024260 Fecha de Registro ante CIFE: miércoles 24 de abril del 2024.

Título de la Tesis: "Evaluación antimicrobiana de una combinación de ácido levulínico + dodecil sulfato de sodio contra *Candida albicans* y *Enterococcus faecalis*"

Nombre de la estudiante: Dafne Urzua Valenzuela.

Matrícula: 223450005.

Domicilio: Calle 21 poniente #1501, col. Barrio de Santiago, Puebla.

No. Cel.: 28*78 87 11 86.

Fecha de ingreso a la Facultad: jueves 5 de enero del 2023.

Firma: _____

Director de Tesis: ME. Francisco Javier Castillo Cano.

Grado académico: Maestro en Ciencias Odontológicas.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100445599.

Tel: 22*11 17 72 21.

Firma: _____

Director Disciplinario: ME Briseida Guadalupe Rojas Huerta. **Grado académico:** Maestra en Ciencias Odontológicas.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: S/N

Tel: 24*61 26 67 03.

Firma: _____

Director Metodológico: DC. Cristian Dionisio Román Méndez. **Grado académico:** Doctor en Ciencias Químico-biológicas.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100392244.

Tel: 22*21 83 83 36.

Firma: _____

Lector: DC. Miguel Ángel Casillas Santana.

Grado académico: Doctor en Ciencias Odontológicas.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100526485.

Tel: 44*48 46 76 45.

Firma: _____

Nombre y firma de aprobación por parte del Responsable de la Maestría en Estomatología en Terminal en Endodoncia.

CDEE. Alejandro Gerardo Martínez Guerrero.

Firma: _____

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado

Facultad de Estomatología,

Autoriza la impresión de la Tesis.

MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana

Fecha oficial de emisión: miércoles 03 de abril del 2025.



Constancia de aceptación de proyecto C.I.F.E



Constancia No. FESIEP/CIFE/215/2024

ME. Francisco Javier Castillo Cano
Responsable del Proyecto de Investigación
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo la que suscribe, MEP Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana en mi calidad de Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, y tras un detenido análisis y evaluación en el Proyecto de Investigación (Colectivo):

Nombre del Título del Proyecto:

"Evaluación antimicrobiana de una combinación de ácido levulínico + clorhexil sulfato de sodio contra Candida albicans y Enterococcus faecalis"

Presentado por

No.	Cargos	Nombres	ID y/o Matricula
1	Responsable del Proyecto de Investigación:	ME. Francisco Javier Castillo Cano	160445299
2	Directora Disciplinaria:	ME. Briseida Guadalupe Rojas Huerto	S/N
3	Director Metodológico:	DC. Cristian Dionisio Román Méndez	100392244
4	Estudiante de Maestría en Estomatología Terminal en Extradonación	C. Dofre Urzua Valenzuela	223450025

HAGO CONSTAR que, ha sido oficialmente ACEPTADO Este relevante proyecto, ha sido registrado ante el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología (C.I.F.E.), inscrita en el Libro de registros No. 03, página 01, bajo el No. de asignación 2024260 en la Secretaría de Investigación de esta Unidad Académica.

Para los fines legales que los interesados convengan, y sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a miércoles 24 de abril del 2024

MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



*C.c.p. Archivo

*MCO. F.J.M./MEP. GNRQ.

Secretaría de Investigación y
Estudios de Posgrado
Facultad de
Estomatología

31 poniente 1304, Col. Volcanes
Puebla, Pue.
C.P. 72410
Tel. Of. 22'22 29 55 00
Ext. 5526

Reporte de similitud antiplagio

Dafne Urzúa Valenzuela

EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE UNA COMBINACIÓN DE ÁCIDO LEVULÍNICO + DODECIL SULFATO DE SODIO CONTR...

 Quick Submit

 Quick Submit

 JSEI

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::1:3182247610

Fecha de entrega

13 mar 2025, 2:05 p.m. GMT-6

Fecha de descarga

13 mar 2025, 2:47 p.m. GMT-6

Nombre de archivo

TESIS_DAFNE_URZUA.pdf

Tamaño de archivo

1.5 MB

58 Páginas

12,703 Palabras

74,385 Caracteres



Página 1 of 61 - Portada

Identificador de la entrega trn:oid::1:3182247610



Página 2 of 61 - Descripción general de integridad

Identificador de la entrega trn:oid::1:3182247610

3% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Coincidencias menores (menos de 15 palabras)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios por permitirme llegar hasta aquí, con salud y rodeada siempre de personas increíbles.

A mis padres, Plutarco y Mercedes, porque sin ustedes nada de esto sería posible. Gracias por impulsarme y apoyarme en cada paso de mi vida y por siempre estar presentes para darme palabras de aliento y ánimos. Gracias por el sacrificio y esfuerzo que implicó para ustedes que pudiera llevar a cabo mi maestría. Gracias infinitas.

A mis asesores, al Dr. Cristian Dionisio Román Méndez, a la Dra. Briseida Rojas Huerta y al Dr. Francisco Javier Castillo Cano, también al Dr. Ismael Juárez por su ayuda en mi proyecto. Todos fueron una parte fundamental para el desarrollo de esta tesis. Gracias por su apoyo, por brindarme sus conocimientos, sus ánimos y, sobre todo, por su paciencia. Sin ustedes, no habría sido posible.

A todos mis profesores, que no solo fueron parte fundamental para mi desarrollo profesional, sino también para la parte personal. Les agradezco infinitamente el compartir sus conocimientos y su apoyo incondicional siempre. Al Dr. Alejandro Martínez, por brindar siempre un consejo cuando fue necesario y por su apoyo durante toda esta etapa.

A mis compañeras Andrea, Patricia, Marlen y Gabriela, gracias por su cariño, apoyo incondicional y amistad.

Agradezco a mis hermanas Michell, Grecia y Hannia por siempre estar pendientes de mí, apoyarme y acompañarme en cada paso y en cada etapa.

Gracias a Oswaldo, el mejor compañero de vida, porque su apoyo fue una pieza clave desde el propedéutico hasta el final de la maestría. Gracias por creer en mí y estar conmigo incluso en momentos difíciles.

DEDICATORIA

Este logro va dedicado para mis padres, hermanas y a mi novio. Sin ustedes no estaría donde estoy hoy. Gracias por su amor y apoyo incondicional.

ÍNDICE

ÍNDICE FIGURAS	10
ÍNDICE IMÁGENES	10
ANTECEDENTES GENERALES	15
ANATOMÍA RADICULAR	15
MICROORGANISMOS ASOCIADOS A FRACASOS ENDODÓNTICOS	16
<i>Enterococcus faecalis</i>	16
<i>Candida albicans</i>	18
INTERACCIÓN ENTRE <i>C. albicans</i> y <i>E. faecalis</i>	19
IRRIGACIÓN EN ENDODONCIA	19
AGENTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN ENDODONCIA	19
HIPOCLORITO DE SODIO	19
CLORHEXIDINA	20
SOLUCIONES PROPUESTAS	21
ÁCIDO LEVULÍNICO	21
DODECIL SULFATO DE SODIO	21
ÁCIDO LEVULÍNICO + DODECIL SULFATO DE SODIO	21
ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	25
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
-Hi	26
-Ho	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Diseño del estudio:	27
Población y muestra:	27
Selección de la muestra:	27
CRITERIOS DE SELECCIÓN	28
Inclusión:	28
Exclusión:	28
Eliminación:	28
VARIABLES	29

CONCORDANCIA Y FIABILIDAD	31
UBICACIÓN ESPACIO – TEMPORAL.....	31
PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS Y FUENTES DE RECOLECCIÓN	32
Preparación de la mezcla de ácido levulínico y dodecil sulfato de sodio (AL-SDS):	32
Preparación del Nefelómetro de McFarland:	32
Determinación de la Cantidad Mínima Inhibitoria 90 (CMI₉₀) en células planctónicas:	37
Eliminación de <i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i> de superficies contaminadas con la CMI₉₀ de la mezcla de LA-SDS:	39
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	42
RESULTADOS.....	43
Determinación de la CMI₉₀:	43
Actividad antimicrobiana en superficies contaminadas:	47
DISCUSIÓN.....	51
LOGÍSTICA.....	57
RECURSOS MATERIALES:	57
BIOSEGURIDAD.....	58
ANEXOS.....	59
1. Técnica estándar para la preparación del Nefelómetro de McFarland:	59
2. Ejemplo de tabla de captura de datos por cada prueba de sinergia para obtención de CMI₉₀ de cada microorganismo.....	60
3. Tablas de captura de datos de las pruebas independientes de superficies contaminadas de cada microorganismo.	61
4. Ejemplo tabla de captura de datos para la cantidad de solución aplicada (CMI₉₀) por cada atomizador a la prueba de superficies.....	61
Bibliografía.....	62

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Variables dependientes e independientes.	29
Tabla 2. Concentraciones de ácido levulínico y dodecil sulfato de sodio de las diferentes diluciones para determinar la CMI ₉₀	34
Tabla 3. Turbidez observada en los tubos de ensayo con las diluciones correspondientes.	44
Tabla 4. Prueba de sinergia.	44
Tabla 5. Prueba de sinergia.	45
Tabla 6. Prueba de CMI ₉₀ en superficies.	48

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de UFC/ml a las 24 hrs de cada microorganismo en el primer tubo que mostró turbidez en las diluciones seriadas para la obtención de CMI ₉₀ . Promedio de 5 pruebas independientes.	46
Figura 2. Crecimiento de UFC/ml a las 24 hrs de cada microorganismo en el primer tubo que no mostró turbidez en las diluciones seriadas para la obtención de CMI ₉₀ . Promedio de 5 pruebas independientes.	47
Figura 3. Media de crecimientos UFC/ml de la prueba de CMI ₉₀ en superficies. Resultados de la prueba estadística (t no pareada). E. faecalis *p<0.0001. C. albicans *p<0.0001. K. pneumoniae *p<0.0002.	48
Figura 4 Resultados prueba de CMI ₉₀ en superficies. Comparación de testigos y experimentales sometidos a la CMI ₉₀ a los distintos tiempos de evaluación: E.f, Enterococcus faecalis. C.a, Candida albicans. K.p, Klebsiella pneumoniae. T+, testigo negativo (sin aplicación de CMI ₉₀). Promedio de 5 pruebas independientes.	50

ÍNDICE IMÁGENES

Imagen 1. Preparación de las soluciones por separado. a) Preparación de las soluciones en una probeta. b) esterilización por filtración de las soluciones. c) almacenamiento en tubos de ensayo cónicos.	32
Imagen 2. Preparación del Nefelómetro de McFarland. a) Cloruro de bario aforado a 25 ml con agua destilada. b) tubos 0.5, 1, 2 y 3.	33

Imagen 3. Ajuste del tubo 1 del Nefelómetro de McFarland para cada microorganismo..	34
Imagen 4. Fórmula utilizada para la obtención de 1 millón de bacterias a partir de un ajuste al tubo 1 del NF de McFarland	35
Imagen 5. a) Galería de diluciones de la mezcla AL-SDS contra MO, observándose sin turbidez en los tubos x, y z que se interpreta como actividad antimicrobiana positiva de la mezcla experimental. b) Tubo con dilución 4 sin turbidez (actividad antimicrobiana positiva) comparados con dilución 5 y 6 (actividad antimicrobiana negativa) contra E. faecalis.	36
Imagen 6. Crecimiento y conteo de UFC/ml de los microorganismos de estudio retados con distintas soluciones de la mezcla AL+SDS: a) C. albicans con crecimiento en la dilución 4 y 5. b) K. pneumoniae sin crecimiento en las diluciones 2, 3 y 4. c) E. faecalis con crecimiento en la dilución 5.....	37
Imagen 7. Determinación de UFC de E. faecalis del inóculo ajustado a 1×10^6 UFC/ml (diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000).	38
Imagen 8. a) Delimitación de las áreas de 10cm^2 y desinfección con luz UV; b) contaminación de superficies con 1 ml de suspensión de cada microorganismo; c) esparcimiento de dicha suspensión con hisopo estéril.....	39
Imagen 9. a) Atomizador utilizado para la colocación de la CMI_{90} en las superficies contaminadas; b) administración de CMI_{90} en superficies (3 disparos)	40
Imagen 10. a) y b) Colocación del hisopo con la muestra de la superficie previamente rociada con la CMI_{90} en tubos de ensayo con 1 ml de medio de cultivo BHI; c) agitación en vórtex.....	40
Imagen 11. a) Balanza analítica calibrada en 0; b) peso inicial de microtubo de ensayo cónico sin solución; c) administración de 3 disparos de solución; d) peso final, una vez añadidos los 3 disparos de cada atomizador.	41

RESUMEN

Introducción: El presente estudio evaluó la actividad antimicrobiana de una combinación de ácido levulínico (AL) + dodecil sulfato de sodio (SDS) contra *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, y utilizó *Klebsiella pneumoniae* como control. El objetivo fue evaluar la actividad antimicrobiana de la mezcla contra dichos microorganismos, para lo cual, se estableció una concentración mínima inhibitoria 90 (CMI₉₀) para posteriormente probarla en superficies contaminadas.

Materiales y métodos: Se determinaron las CMI₉₀ de AL y SDS, individualmente y en combinación, mediante diluciones seriadas en tubos de ensayo, donde se evaluó la reducción de unidades formadoras de colonias (UFC/ml). Posteriormente, se aplicó la CMI₉₀ en superficies contaminadas y se tomaron muestras a los 1, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos para analizar su efecto antimicrobiano mediante crecimiento de UFC/ml en placas Petri con el medio de cultivo correspondiente para cada microorganismo.

Resultados: Se estableció una CMI₉₀ de 16.406 mM de AL + 0.664 mM de SDS para *E. faecalis* y una CMI₉₀ de 32.813 mM de AL + 1.328 mM de SDS para *C. albicans*, que posteriormente fue probada en superficies contaminadas, donde demostró tener una actividad antimicrobiana contra ambos microorganismos con diferencias en su sensibilidad.

Discusión: La literatura ha demostrado que la combinación AL+SDS es altamente efectiva contra diversos virus y bacterias relacionados principalmente con la industria alimentaria, patógenos humanos y contra microorganismos presentes en la cavidad oral, presentando una sinergia importante en la combinación en comparación con la evaluación de cada solución por separado. De acuerdo con los resultados de este estudio, la combinación AL+SDS es efectiva contra bacterias y levaduras (en forma planctónica) relacionadas con las enfermedades endodónticas persistentes, sin embargo, no se mostró mayor actividad gracias a la sinergia de la combinación en comparación a las sustancias por separado.

Conclusión: La combinación de ácido levulínico + dodecil sulfato de sodio tiene actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* y *C. albicans*.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana, Ácido levulínico, Dodecil sulfato de sodio, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*.

ABSTRACT

Introduction: This study evaluated the antimicrobial activity of a combination of levulinic acid (LA) and sodium dodecyl sulfate (SDS) against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, using *Klebsiella pneumoniae* as a control. The objective was to assess the antimicrobial activity of this mixture against these microorganisms by determining the minimum inhibitory concentration 90 (MIC₉₀) and subsequently testing it on contaminated surfaces.

Materials and Methods: The MIC₉₀ of LA and SDS, individually and in combination, was determined using serial dilutions in test tubes, evaluating the reduction of colony-forming units (CFU/mL). Subsequently, the MIC₉₀ was applied to contaminated surfaces, and samples were taken at 1, 5, 10, 20, 30, and 60 minutes to analyze its antimicrobial effect by assessing CFU/mL growth on Petri dishes with the appropriate culture medium for each microorganism.

Results: The MIC₉₀ was established at 16.406 mM LA + 0.664 mM SDS for *E. faecalis* and 32.813 mM LA + 1.328 mM SDS for *C. albicans*, which was then tested on contaminated surfaces. The combination demonstrated antimicrobial activity against both microorganisms, with differences in their sensitivity.

Discussion: Previous studies have shown that the LA+SDS combination is highly effective against various viruses and bacteria, particularly in the food industry and oral cavity microorganisms, exhibiting significant synergy compared to the evaluation of each solution separately. According to the results of this study, the LA+SDS combination is effective against bacteria and yeasts (in planktonic form) associated with persistent endodontic infections. However, no increased activity was observed due to the synergy of the combination compared to the individual substances.

Conclusion: The combination of levulinic acid and sodium dodecyl sulfate exhibits antimicrobial activity against *E. faecalis* and *C. albicans*.

Keywords: Antimicrobial activity, Levulinic acid, Sodium dodecyl sulfate, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento endodóntico se enfoca principalmente en tratar y prevenir la periodontitis apical, una afección en la que el huésped reacciona a los agentes microbianos alojados dentro de los conductos radiculares. Este tratamiento implica un proceso de desbridamiento químico - mecánico de los conductos radiculares, que consiste en el uso de irrigantes e instrumentos manuales o mecanizados para limpiar exhaustivamente dichos conductos. Las características principales que debe poseer el irrigante ideal son eficacia antimicrobiana, disolución de tejido orgánico, capacidad de eliminar el barrillo dentinario que se crea durante la instrumentación mecánica del conducto y una baja toxicidad (1).

Actualmente, el hipoclorito de sodio (NaOCl) es el irrigante de elección en el tratamiento de Endodoncia, gracias a sus excelentes propiedades antimicrobianas (ya que tiene actividad bactericida, esporicida y viricida de amplio espectro) y a su capacidad de disolución del tejido orgánico. Sin embargo, es importante mencionar que presenta una citotoxicidad que puede ocasionar un gran daño a los tejidos perirradiculares en caso de extrusión (2).

Está demostrado que el factor principal para la enfermedad pulpar y periapical son las bacterias. Cuando el conducto radicular es invadido por estas, suele haber una colonización dentro de los túbulos dentinarios, conductos accesorios e istmos, las cuales, son muy difíciles de erradicar y su persistencia puede ser importante en el fracaso del tratamiento endodóntico (3).

Los estudios demuestran que *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans* son de los microorganismos más importantes y comúnmente encontrados en dientes con infección endodóntica (4).

La biopelícula es un proceso de proliferación microbiana donde las células se adhieren entre sí a una superficie sólida; gracias a esto, resisten y responden a los cambios dados en el tratamiento endodóntico como una sola unidad (4).

Se necesitan nuevos enfoques para ayudar a eliminar los microorganismos durante el tratamiento de Endodoncia. Se buscan irrigantes que puedan desempeñar una

función similar a la del NaOCl, que puedan erradicar tanto a los microorganismos presentes en infecciones primarias del conducto radicular, así como a las que más se han relacionado al fallo endodóntico, como *E. faecalis* y *C. albicans* sin presentar la citotoxicidad asociada a este último y así correr menos riesgos de accidentes en casos de extrusión del irrigante. Se ha demostrado que una solución de ácido levulínico (LA) / dodecil sulfato de sodio (SDS) (también conocido como lauril sulfato) es eficaz contra algunas especies, tales como *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli* y algunos virus (5). Sin embargo, aún no se ha evaluado su efecto frente a microorganismos relacionados con el campo de la Endodoncia. Por ello, en este estudio se analizó su actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* y *C. albicans*, dos microorganismos que han demostrado ser especialmente difíciles de eliminar incluso tras un tratamiento de conductos bien realizado, y que se asocian con la persistencia de la periodontitis apical y el fracaso endodóntico.

ANTECEDENTES GENERALES

ANATOMÍA RADICULAR

Debido a la complejidad del sistema de conductos radiculares y al hecho de que la mayoría de estos conductos son de forma ovalada, no coincidiendo con la forma de las limas, es frecuente que queden áreas sin instrumentar. Estas áreas pueden albergar microorganismos, por lo tanto, es necesario complementar la preparación mecánica con irrigación química para una correcta desinfección y limpieza de los residuos dentinarios que se producen durante la instrumentación (6).

Dentro del sistema de conductos radiculares pueden existir conductos laterales que se sitúan en varias áreas del conducto, tales como la bifurcación, tercio cervical, tercio medio y especialmente en el tercio apical, donde son más comunes (llamados 'delta apical'). Estos conductos laterales son considerablemente más grandes que los túbulos dentinarios y contienen, al igual que el conducto principal, vasos sanguíneos y tejido conectivo. Los conductos laterales se conectan con el ligamento periodontal a través de la capa de cemento. Las lesiones laterales observadas en las raíces de los dientes con infección son un signo de la existencia de un conducto lateral, lo cual, indica la presencia de bacterias. Estudios histológicos previos

demuestran claramente la presencia de bacterias y biopelículas en este tipo de conductos, los cuales, debido a su orientación y tamaño, no pueden ser limpiados mecánicamente, por lo que la limpieza química es el único método disponible (7).

MICROORGANISMOS ASOCIADOS A FRACASOS ENDODÓNTICOS

La periodontitis apical consiste en un proceso inflamatorio en los tejidos perirradiculares como respuesta a una irritación prolongada causada por microorganismos presentes en el conducto radicular con pulpa necrótica (8).

El tratamiento de conductos exhibe tasas de éxito que oscilan entre el 86% y el 98%, las cuales, se determinan mediante la desaparición de signos y síntomas clínicos, tales como el dolor, tractos sinuosos o inflamación, así como la ausencia de rarefacción apical en las herramientas diagnósticas de imagen. Sin embargo, en ocasiones, el tratamiento no logra alcanzar el éxito deseado debido a diversos factores, fenómeno conocido como "fracaso endodóntico". Este fracaso endodóntico se caracteriza comúnmente por la presencia de periodontitis apical postratamiento, que puede ser emergente, recurrente o persistente y su principal etiología es la presencia de infección persistente intra y extrarradicular (9,10).

En la periodontitis apical postratamiento se encuentran con frecuencia microorganismos como *Enterococos faecalis*, *Streptococos sp*, *Lactobacilos sp*, *Actinomyces sp*, levaduras (como *Candida sp*) y bacilos entéricos gramnegativos. Sin embargo, *E. faecalis* es la especie bacteriana aislada predominante en esta enfermedad (11).

Otro microorganismo que puede sobrevivir al tratamiento endodóntico e invadir los túbulos dentinarios es *C. albicans* (12). Por lo tanto, *E. faecalis* y *C. albicans* son los microorganismos encontrados con mayor frecuencia en dientes con periodontitis apical refractaria (11,12).

Enterococcus faecalis

E. faecalis es un coco anaerobio grampositivo, con un tamaño entre 0.5 y 0.8 micrómetros, es un patógeno oportunista presente en la cavidad oral y el tracto

gastrointestinal humano que presenta resistencia al tratamiento con soluciones alcalinas y antimicrobianas (13).

Sedgley y Nagel obtuvieron muestras de conductos radiculares durante 12 meses para detectar y cuantificar *E. faecalis* en infecciones primarias y en retratamiento mediante PCR. En infecciones primarias su presencia fue de 67.5% mientras que en infecciones secundarias fue de 89.6% (14).

E. faecalis puede sobrevivir por largos periodos en los conductos radiculares porque es capaz de tolerar un entorno altamente alcalino para formar biopelículas, invadir los túbulos dentinarios y evadir la fagocitosis por las células del sistema inmune. El ácido lipoteicoico es un componente presente en la pared de las bacterias grampositivas, el cual puede actuar como un factor de virulencia de gran importancia y participar en la formación de biopelículas y adherencia. Esto le da las características de una buena adaptación a los cambios ambientales y capacidad de crecimiento en las paredes del conducto (13,15).

La biopelícula se define como una estructura organizada compuesta por células bacterianas contenidas en una matriz exopolimérica adherida a una superficie, lo que dificulta la correcta penetración de agentes microbianos (15).

El desarrollo de biopelícula de *E. faecalis* en la dentina radicular se divide en tres etapas:

- 1: Formación de micro colonias de células de *E. faecalis* cuando se adhieren a las paredes de dentina del conducto (16).
- 2: Aumento localizado de iones de calcio y fosfato causado por la disolución de la porción mineral del sustrato dentinario mediada por bacterias que conduce a una mineralización de la biopelícula de *E. faecalis* (16).
- 3: Esta interacción entre las bacterias y sus subproductos en la dentina, hace que la biopelícula se mineralice (16).

Además de la formación de biopelícula, se ha demostrado que *E. faecalis* puede tener factores de virulencia que lo hacen capaz de colonizar y adaptarse incluso en medios pobres de nutrientes (13).

Candida albicans

Grossman en 1952 fue el primero que informó acerca de la presencia de hongos dentro de los conductos radiculares infectados. La cavidad oral sirve como hábitat natural para *Candida sp*, puede estar presente en más del 50% de la población en una etapa no patógena, sin embargo, cuando se infecta e invade los tejidos del huésped, comienza el proceso de la enfermedad, pudiendo encontrarse en enfermedades perirradiculares persistentes y puede ser un microorganismo pionero (17). Este proceso se debe en gran medida a una característica crucial de la *C. albicans*: su capacidad de adherirse tanto a superficies biológicas como no biológicas. Esta habilidad de adhesión facilita su capacidad para colonizar y causar infecciones (18,19)

Diversos estudios han cultivado y observado hongos a partir de infecciones endodónticas. *C. albicans* es la especie de levadura más frecuentemente aislada y potencialmente patógena de la infección de los conductos radiculares(19). Najzar y Fleger en 1992 descubrieron que en el 55% de los conductos radiculares se encuentran células de *Candida sp*. (17).

C. albicans está presente, en mayor medida, en dientes que presentan lesiones periapicales (36.7%) que en dientes sin dichas lesiones (13.3%) (9). Tiene una fuerte afinidad por la hidroxiapatita y es capaz de adherirse a la dentina no tratada o tratada con un agente quelante debido al descubrimiento de calcio y colágeno de la dentina. *C. albicans* puede adherirse al colágeno tipo IV y I y posee la gran capacidad de penetrar por completo los túbulos dentinarios por medio de tigmotropismo, lo cual, hace que esta levadura se considere como un microorganismo “dentinofílico” (20)

C. albicans puede formar una biopelícula gruesa, de más de 200 micrómetros de profundidad, para evadir el sistema inmune y resistir el tratamiento antifúngico. Su

proceso de formación de biopelícula implica cuatro pasos: adherencia, proliferación, maduración y dispersión (21).

INTERACCIÓN ENTRE *C. albicans* y *E. faecalis*

Desde hace varios años se ha documentado la presencia de *C. albicans* y *E. faecalis* dentro de los conductos radiculares. La relación de estos microorganismos con el fracaso endodóntico se ha asociado cada vez más y es importante saber que las estrategias antimicrobianas que se emplean en el tratamiento de conductos sean eficaces contra estos microorganismos (14).

Se puede inferir que ambos microorganismos pueden favorecerse en el mismo entorno ecológico; o interactuar de manera que la presencia de uno apoye la supervivencia del otro (22). Por otro lado, se informó que *E. faecalis* aumenta la invasión tisular de *C. albicans* con un modelo epitelial oral organotípico. Sin embargo, también se ha propuesto que *E. faecalis* secreta una proteína anticandidal (EntV) que puede inhibir la formación de biopelículas y factores de virulencia de *C. albicans*, es por ello que su interacción no está completamente clara (21,22).

IRRIGACIÓN EN ENDODONCIA

La irrigación en Endodoncia se considera un factor clave para el éxito del tratamiento de conductos radiculares, ya que permite un control eficaz de la infección. A través del proceso químico-mecánico, se pueden eliminar los microorganismos y sus subproductos del conducto, además de eliminar el tejido necrótico. Este tejido podría funcionar como sustrato para el crecimiento bacteriano (7,23).

Los irrigantes utilizados en la actualidad son principalmente sustancias químicas activas, y su interacción directa con el biofilm se considera la base de su efecto antimicrobiano (24).

AGENTES ANTIMICROBIANOS UTILIZADOS EN ENDODONCIA

HIPOCLORITO DE SODIO

El hipoclorito de sodio (NaOCl) es el irrigante más popular y el considerado como primera opción, esto es gracias a su potente acción antimicrobiana y en especial

contra bacterias organizadas en biopelículas y su capacidad de disolución de tejido orgánico (24).

El mecanismo de acción del NaOCl radica en su capacidad para, al entrar en contacto con el agua, generar ácido hipocloroso (HOCl), un oxidante que actúa como disolvente. Este proceso libera cloro, que al combinarse con el grupo amino de la proteína, forma cloraminas que interfieren en el metabolismo celular. Tanto el HOCl como los iones de hipoclorito (OCl) provocan la degradación e hidrólisis de aminoácidos. El NaOCl tiene un pH de 11 y se encuentra en concentraciones que oscilan entre el 0.5% y el 6%. Estudios han indicado que concentraciones más elevadas son más efectivas contra *E. faecalis* y *C. albicans* (6,24,25).

La desventaja del NaOCl es que puede provocar inflamación periapical si se extruye. La extrusión del NaOCl hacia los tejidos perirradiculares da como resultado síntomas agudos inmediatos como dolor intenso y severo, sangrado profuso y en ocasiones puede producir secuelas graves como quemaduras químicas, necrosis de tejidos y células, déficit neurológico, y obstrucción de vías respiratorias (2,6,24,26).

CLORHEXIDINA

La clorhexidina (CHX) presenta ciertas ventajas como irrigante endodóntico, entre las que se incluye su actividad antimicrobiana conocida como sustantividad, debido a su afinidad por la hidroxiapatita. La CHX se adsorbe a las proteínas ácidas de la hidroxiapatita y se libera gradualmente con el tiempo. Además, tiene una toxicidad muy baja. Sin embargo, una de sus desventajas radica en su limitada capacidad para disolver tejido orgánico (24).

En el tratamiento de conductos se utiliza en una concentración del 2%, tiene efecto bactericida o bacteriostático dependiendo de su concentración; sus moléculas catiónicas se unen a superficies bacterianas con carga negativa en la pared celular, dañando sus capas externas, haciéndola permeable (6,25,27).

SOLUCIONES PROPUESTAS

ÁCIDO LEVULÍNICO

El ácido levulínico (LA) es un ácido orgánico de 5 carbonos que posee efectos bactericidas debido a su bajo pH, ya que las células bacterianas tienen que bombear protones hidrolizando el ATP para mantener un pH cercano a la neutralidad, lo que eventualmente provoca su muerte. Esta sustancia es reconocida como segura por la FDA (Food and Drug Administration) (28).

El LA es un componente versátil para aditivos de combustible, resinas, productos farmacéuticos, aromatizantes y herbicidas. Este se sintetiza calentando hexosas (glucosa y fructosa) o almidón en una solución ácida diluida (También se conoce como levulosa), por lo que es relativamente no tóxico, probado con ratas y conejos (5,28,29).

DODECIL SULFATO DE SODIO

El dodecil sulfato de sodio (SDS), también conocido como lauril sulfato de sodio, es un detergente organosulfato y tensioactivo sintético altamente efectivo que es utilizado ampliamente para limpieza, incluido en la mayoría de los productos utilizados diariamente para higiene personal, como jabón, shampoo y pasta de dientes. Además, también es utilizado como coadyuvante para repelentes, penetración de los pesticidas y como emulsionante y bacteriostático en farmacología y medicina. El SDS tiene potencial para la inhibición de diversos virus (30,31).

ÁCIDO LEVULÍNICO + DODECIL SULFATO DE SODIO

La combinación de ácido levulínico y dodecil sulfato de sodio ha recibido atención por su eficacia antimicrobiana contra bacterias y virus en superficies alimentarias y no alimentarias; ambos ingredientes están aprobados por la FDA. La combinación de estas sustancias demostró sinergia, manteniendo una alta actividad antimicrobiana incluso en presencia de materiales orgánicos. Además, presenta características como la producción de espuma y actuar como surfactante. Su fácil solubilidad contribuye a reducir la tensión superficial, lo cual amplía sus aplicaciones y facilita su penetración en áreas de difícil acceso (32).

Esta combinación se probó contra diferentes microorganismos, tales como el virus de la influenza AH3N2, *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Cryptosporidium parvum*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* orales. Se utilizaron diferentes concentraciones y se obtuvieron buenos resultados (33–37).

La principal ventaja de utilizar esta combinación (LA + SDS) es lograr una eficacia similar a la del NaOCl contra los microorganismos asociados al ámbito endodóntico, sin el riesgo de accidentes debido a la extrusión del irrigante en casos de ápices abiertos, perforaciones o extrusiones accidentales (2).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Tong Zhao et al., En 2009 evaluaron cuatro ácidos orgánicos (ácido acético, ácido láctico, ácido caprílico y ácido levulínico) con dodecil sulfato de sodio (SDS) combinados o individualmente para definir su capacidad para la inactivación de *Salmonella thyphimurium* y *E. coli* O157:H7 (Cepa enterohemorrágica que causa intoxicación alimentaria por la producción de toxinas). En sus resultados obtuvieron que la combinación de un ácido (0.5%) con el SDS (0.5%) produjo una inactivación de ambas especies en un tiempo menor en comparación de la utilización de estas sustancias individualmente (10 segundos y 20 min respectivamente). La combinación de ácido levulínico con dodecil sulfato de sodio resultó ser efectiva para ambas especies en diferentes superficies (LA 3% y SDS 1% por 20 segundos en lechugas. LA 3% y SDS 2% por 1 min en alas de pollo y 20 segundos en agua contaminada con heces fecales de pollo) (33).

Ynes Ortega et al., En el 2011 estudiaron los efectos del ácido levulínico y dodecil sulfato de sodio en diferentes concentraciones para evaluar su actividad antimicrobiana contra microorganismos como *Cryptosporidium parvum*, *Encephalitozoon intestinalis* y *Escherichia coli*. En sus resultados obtuvieron que la combinación de ambas sustancias no fue efectiva después de 30 y 60 minutos contra las esporas de *Cryptosporidium parvum* y *Encephalitozoon intestinalis* en concentraciones de 3% de ácido levulínico – 2% de SDS y 2% de ácido levulínico – 1% de SDS. Por el contrario, fue muy efectiva contra *E. coli* en las mismas

concentraciones. En conclusión, sugirieron que la mezcla desinfectante no se puede utilizar para inactivar parásitos (38).

Beuchat et al., En el año 2012 probaron diferentes ácidos orgánicos para determinar su eficacia para inactivar *Salmonella* sp. en nueces pecanas y en cáscara. Las nueces fueron sumergidas en agua clorada, ácido láctico (0.5, 1 y 2%) y ácido levulínico (0.5, 1 y 2%) con y sin SDS al 0.5% durante 20 minutos. El tratamiento con ácido levulínico al 2% con SDS al 0.5% redujeron el patógeno efectivamente. Los ácidos orgánicos fueron menos efectivos cuando se utilizaron individualmente que cuando se mezclaron con SDS (39).

Bing-Yang Wang et al., En el año 2012 hicieron un estudio donde su objetivo fue evaluar la eficacia del ácido levulínico al 0.5% y SDS al 0.05% contra *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus mutans* en forma de biopelícula de manera *in vivo* e *in vitro* utilizando modelos murinos. La formulación antimicrobiana eliminó por completo todas las especies de estreptococos en biopelículas en 30 segundos tanto *in vivo* como *in vitro*, a diferencia del grupo control con un enjuague bucal, que solo redujo a los microorganismos de manera moderada *in vitro*. La solución no provocó efectos adversos en la cavidad bucal murina en un periodo de 2 semanas (40).

Aydin et al., En el 2013 evaluaron la mezcla desinfectante de ácido levulínico con (SDS) para descontaminar cáscaras de huevo inoculadas con el virus de la influenza AH3N2, utilizaron concentraciones de LA 5% + SDS 2%, LA 2% + SDS 1% y LA 0.5% + SDS 0.5% durante un minuto. Ellos obtuvieron resultados favorables, en donde la mezcla más efectiva, que proporcionó el mayor nivel de inactivación del virus fue LA al 5% y SDS al 2% (41).

Chen et al., En el 2015 evaluaron la eficacia de la mezcla LA + SDS contra microorganismos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* y toxinas producidas por *E. coli* organizadas en biofilm sobre superficies de acero inoxidable, las cuales fueron incubadas a 21°C durante 72 horas. Se trataron por 10 minutos con diferentes concentraciones (LA 0.5% + SDS 0.05%, LA 1% + SDS 0.1% y LA 3% + SDS 2%). La solución con ambas sustancias tuvo efectos bactericidas en las

biopelículas de los 3 patógenos evaluados, la solución con concentraciones más altas (LA 3% + SDS 2%) produjeron la mayor reducción de los patógenos (42).

Zhou et al., En el 2017 investigaron la eficacia del LA en combinación con SDS para la eliminación de diferentes patógenos, como virus de la hepatitis A, norovirus murino-1 y diferentes especies de bacterias en fresas frescas. El tratamiento con LA al 0.5% + SDS al 0.5% indujo a la reducción de los patógenos de manera comparable con la reducción que produjo el cloro. Los autores concluyeron que la combinación LA al 0.5% + SDS 0.5% puede reducir los patógenos entéricos presentes en fresas (43).

Gregory et al., En el año 2021 evaluaron la mezcla LA + SDS a la cual nombraron “MoWa” contra patógenos nosocomiales en superficies contaminadas; estos patógenos fueron *Staphylococcus aureus* resistentes y sensibles a la meticilina (MRSA y MSSA) en cultivos planctónicos y en biopelículas preformadas. Se utilizaron concentraciones de LA 8.2 mM + SDS 0.3 mM y LA 32 mM + SDS 1.3 mM. Se contaminaron las superficies y después se rociaron con MoWa. En sus resultados obtuvieron que las bacterias planctónicas murieron con una concentración de LA 8.2 mM + SDS 0.3 mM. Mientras que las biopelículas fueron erradicadas con una concentración de LA 32 mM + SDS 1.3 mM (5).

Yan et al., En el 2023 evaluaron la actividad antimicrobiana de la combinación de LA + SDS con *Staphylococcus aureus* en estado planctónico y en biopelícula. Ellos observaron una actividad bacteriostática para cada compuesto, mientras que la combinación de ambas sustancias resultó en un efecto bactericida. La mezcla redujo la biomasa y las células viables de la biopelícula. Determinaron también las concentraciones mínimas inhibitorias: 3.125 mg/mL para ácido levulínico y 0.039 mg/ml (35).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

El hipoclorito de sodio (NaOCl) es utilizado ampliamente como el irrigante principal dentro del tratamiento de conductos, ya que tiene la capacidad de disolver tejido orgánico, además de actuar como un antimicrobiano efectivo, en especial contra microorganismos como *E. faecalis* y *C. albicans*, los cuales son habitualmente los más encontrados en dientes con infecciones endodónticas debido a que resisten a pH elevados y a su capacidad de colonizar. A pesar de contar con estas cualidades, el NaOCl tiene importantes desventajas, como su citotoxicidad.

Hasta ahora, no se ha encontrado un irrigante que sea igual de eficaz que el NaOCl en cuanto a la disolución de tejido orgánico y su efecto antimicrobiano, sin presentar efectos citotóxicos. Por consiguiente, es sumamente relevante investigar nuevas alternativas como el ácido levulínico (LA) + dodecil sulfato de sodio (SDS) como posibles irrigantes en el tratamiento endodóntico, por lo tanto, surge la siguiente pregunta de investigación;

- ¿La solución de ácido levulínico + dodecil sulfato de sodio tiene actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* y *C. albicans*?

JUSTIFICACIÓN

Sería muy beneficioso para los endodoncistas contar con un irrigante que, además de actuar eficazmente contra microorganismos como *E. faecalis* y *C. albicans* (los cuales están asociados principalmente a la periodontitis apical refractaria, dado a que tienen capacidad de adaptación a los cambios ambientales, de formar biopelícula y, además, presentan resistencia a los agentes antimicrobianos por su facilidad de penetrar e invadir por completo los túbulos dentinarios) no sea citotóxico en caso de extrusión hacia los tejidos perirradiculares. Esto les brindaría mayor seguridad al trabajar, eliminando la necesidad de diluir el irrigante en situaciones donde la extrusión sea más probable.

A lo largo del tiempo, han surgido diversas propuestas de soluciones irrigantes, pero ninguna ha logrado reemplazar el uso predominante del NaOCl. Por esta razón, se

hace relevante la investigación de nuevas alternativas. El ácido levulínico, demostrado como relativamente no tóxico en estudios previos con ratas y conejos, junto con el dodecil sulfato de sodio, un detergente ampliamente empleado en aplicaciones de limpieza, se destacan como opciones prometedoras, ya que ambas soluciones cuentan con el reconocimiento de ser ingredientes seguros para uso alimentario, según la US FDA (Food and Drug Administration).

La combinación de ácido levulínico (LA) y dodecil sulfato de sodio (SDS) ha sido sometida a pruebas con diversas concentraciones en su efectividad contra microorganismos que afectan a seres humanos y que son de gran importancia médica y en el entorno hospitalario, como *Staphylococcus aureus* (tanto en su forma planctónica como en biopelículas), *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, así como virus como la influenza A H3N2 y el norovirus, obteniendo resultados positivos y favorables en su acción antimicrobiana. Se propone evaluar estas soluciones en combinación, debido a que se ha reportado que existe un sinergismo entre ellas, ya que al agregar SDS a LA potencia el efecto antimicrobiano de este y también permite una mejor penetración a las áreas de interés (por su característica tensioactiva).

En este proyecto, se evaluó su capacidad antimicrobiana contra *E. faecalis* y *C. albicans* y se probaron diferentes concentraciones con el objetivo de identificar la más adecuada. Esta investigación buscó proponer esta solución como un potencial irrigante en el tratamiento endodóntico.

HIPÓTESIS

-Hi

La mezcla de ácido levulínico con dodecil sulfato de sodio tiene actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* y *C. albicans*.

-Ho

La mezcla de ácido levulínico con dodecil sulfato de sodio no tiene actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* y *C. albicans*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana de una mezcla de ácido levulínico con dodecil sulfato de sodio contra *E. faecalis* y *C. albicans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI₉₀) de la mezcla a diferentes concentraciones del ácido levulínico con dodecil sulfato de sodio contra células planctónicas de *E. faecalis* o *C. albicans*.
- Determinar la actividad antimicrobiana de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI₉₀) de la mezcla de ácido levulínico con dodecil sulfato de sodio en superficies contaminadas con *E. faecalis* o *C. albicans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño del estudio:

- Experimental
- Prospectivo
- Transversal
- Analítico
- *in vitro*

Población y muestra:

Selección de la muestra:

A partir de ácido levulínico (Sigma-Aldrich® St. Louis, MO, EE.UU) y dodecil sulfato de sodio (Sigma-Aldrich® St. Louis, MO, EE.UU), se prepararon las mezclas correspondientes para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria 90 (CMI₉₀) de una población establecida de microorganismos (1X10⁶ UFC/ml).

Los microorganismos retados con las mezclas fueron las cepas tipo de *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) y *Candida albicans* (ATCC 10231).

Para la obtención de la CMI₉₀ se formaron 20 grupos experimentales (correspondiente a diferentes concentraciones de la mezcla de LA-SDS, partiendo de los datos ya registrados en estudios previos que han demostrado tener actividad antimicrobiana con diferentes microorganismos, como Gregory et. al, en 2021, cuya concentración fue de 1.05 M y 0.0425 M respectivamente, sin embargo, se duplicó la concentración y se inició con 2.1 M y 0.085 M para determinar si existe una diferencia con una concentración más alta) y 4 grupos controles: el testigo negativo que contuvo únicamente los microorganismos, testigo de esterilidad de la mezcla LA-SDS de la mayor dilución sin microorganismos, así como la de cada uno de los componentes de la mezcla, de forma independiente (31).

Para la prueba de evaluación en superficies contaminadas se formaron 2 grupos experimentales (microorganismos inoculados en una superficie, expuestos a la mezcla de CMI₉₀ obtenida) y 1 grupo control (microorganismos inoculados sin ser expuestos a la mezcla).

El muestreo fue no probabilístico por conveniencia, basado en los criterios de inclusión.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

Inclusión:

Microorganismos en estado puro y viables.

Exclusión:

Microorganismos que no puedan ser cultivados.

Eliminación:

Microorganismos que presenten señales de contaminación o pierdan viabilidad.

VARIABLES

Tabla 1. Variables dependientes e independientes.

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala y categorías
Variable independiente			
ÁCIDO LEVULÍNICO/DODECIL SULFATO DE SODIO	Sustancias utilizadas en superficies que tienen actividad antimicrobiana contra bacterias y virus.	Ambas soluciones fueron obtenidas y preparadas en diferentes concentraciones con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria 90 (CMI90) frente a los microorganismos evaluados.	Cuantitativa. Discreta. Miligramos por mililitro (mg/ml).
Variable dependiente			
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	Sustancias que demuestran la capacidad de reducir la presencia de microorganismos, como bacterias y hongos.	Se probó la cantidad mínima inhibitoria 90 utilizando tubos de ensayo y placas de agar.	Cuantitativa. Continua. En unidades formadoras de colonias.
CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA 90	Concentración más baja de un agente antimicrobiano capaz de inhibir el	Se prepararon diluciones seriadas de cada solución antimicrobiana en tubos de ensayo, los	Cuantitativa. Continua. En unidades formadoras de colonias.

	crecimiento visible del 90% de una población microbiana determinada.	cuales fueron inoculados con suspensiones estandarizadas de cada microorganismo. Tras la incubación, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias (UFC/mL) y se identificó la menor concentración de cada sustancia en la que se observó una inhibición $\geq 90\%$ del crecimiento microbiano, en comparación con el control positivo.	
--	---	---	--

CONCORDANCIA Y FIABILIDAD

Se capacitó a la alumna tesista en la preparación de material, en la elaboración de medios de cultivo, en el cultivo de los microorganismos, así como en la conservación y esterilización del material contaminado durante la fase experimental en el laboratorio de Microbiología Oral de la FEBUAP. Además, se empleó la prueba del coeficiente de correlación intraclase (CCI) para evitar sesgos en el conteo de UFC.

UBICACIÓN ESPACIO – TEMPORAL

- Instalaciones de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- El proceso de las muestras se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Oral de la FEBUAP.

PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS Y FUENTES DE RECOLECCIÓN

Preparación de la mezcla de ácido levulínico y dodecil sulfato de sodio (AL-SDS):

Con base en la metodología descrita por Gregory et. al. (31), Se prepararon 100 ml de una solución de 6 M y otra de 1 M de LA y SDS, respectivamente, por separado, en BHI para el AL y agua destilada para SDS. Las soluciones fueron esterilizadas por filtración utilizando un dispositivo de filtración al vacío y filtros de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.22 μm . Una vez esterilizadas, las soluciones se almacenaron en alícuotas de 25 ml a 4°C hasta su uso (Imagen 1).

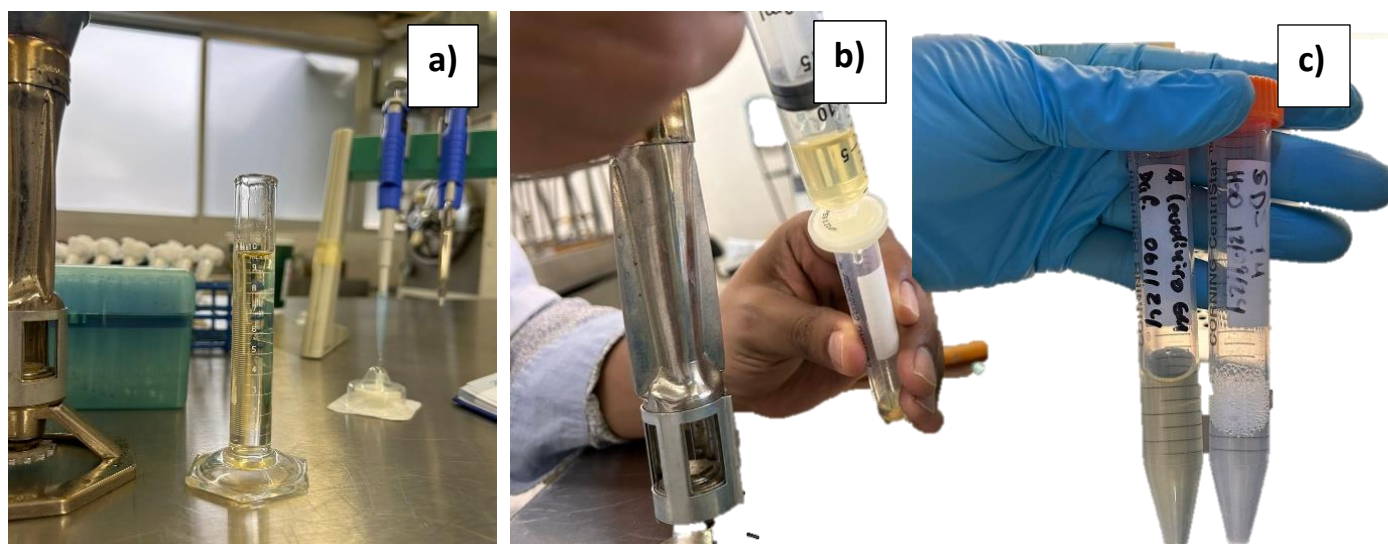


Imagen 1. Preparación de las soluciones por separado. a) Preparación de las soluciones en una probeta. b) esterilización por filtración de las soluciones. c) almacenamiento en tubos de ensayo cónicos.

Para las pruebas de determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria 90 (CMI₉₀), previo a su realización, se prepararon 10 ml de una mezcla de AL+SDS con concentraciones de 2.1 M y 0.085 M, respectivamente, en medio BHI estéril. Esta mezcla inicial sirvió como estándar para llevar a cabo las diluciones seriadas correspondientes de la mezcla.

Preparación del Nefelómetro de McFarland:

Se pesaron 0.2938 g de cloruro de bario en una balanza analítica, posteriormente se añadió a un matraz aforado de 25 ml, y se aforó con agua destilada. Se taparon y se agitaron cuidadosamente para homogeneizar la solución.

Se prepararon 4 tubos del nefelómetro (0.5, 1, 2 y 3) para lo cual, se siguió un procedimiento estándar (Anexo 1, Imagen 2).

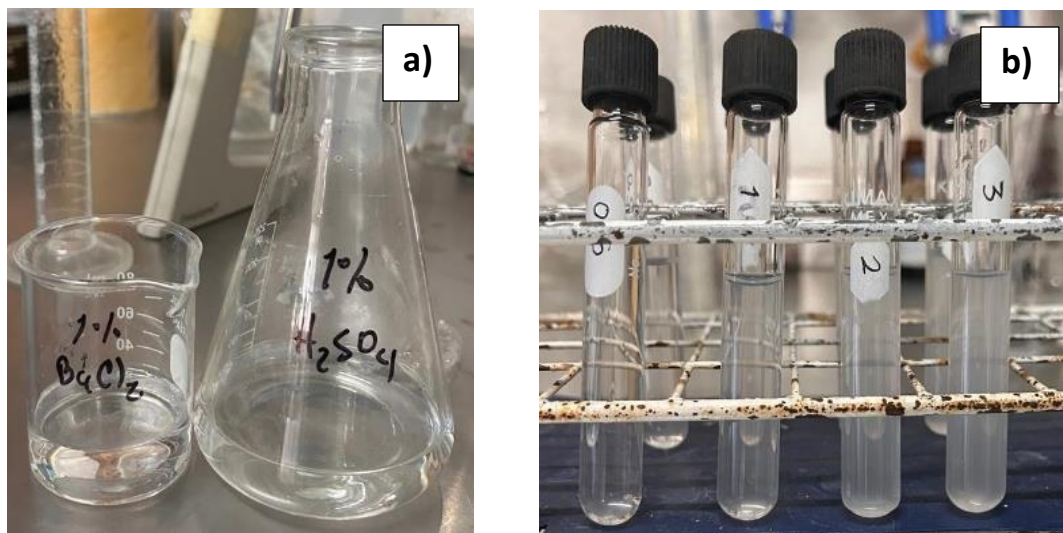


Imagen 2. Preparación del Nefelómetro de McFarland. a) Cloruro de bario aforado a 25 ml con agua destilada. b) tubos 0.5, 1, 2 y 3.

Pruebas piloto de la determinación de la Cantidad Mínima Inhibitoria 90 (CMI₉₀):

Por definición, la CMI₉₀ correspondió a la concentración de la mezcla de AL+SDS en la que más del 90 % de la población de microorganismos expuestos murió bajo las condiciones evaluadas en el estudio.

A partir de cultivos individuales de 18 a 24 horas en placas de agar BHI para *Enterococcus faecalis* y dextrosa Sabouraud para *Candida albicans*, se ajustaron las concentraciones mediante turbidimetría utilizando el nefelómetro de McFarland al tubo No. 1 (NFMF-1) en caldo BHI estéril, lo que correspondió a un aproximado de 3×10^8 UFC/ml (Imagen 3).



Imagen 3. Ajuste del tubo 1 del Nefelómetro de McFarland para cada microorganismo.

En tubos de ensayo estériles, se realizaron 10 diluciones seriadas (1:2) , partiendo de la concentración inicial de 2.1 M para el ácido levulínico (AL) y 0.085 M para el dodecil sulfato de sodio (SDS). Las diluciones se llevaron a cabo en caldo BHI estéril, obteniendo diferentes concentraciones de la mezcla (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de ácido levulínico y dodecil sulfato de sodio de las diferentes diluciones para determinar la CMI₉₀.

Etiqueta del tubo	Concentración de ácido levulínico (M)	Concentración de dodecil sulfato de sodio (M)	Concentración bacteriana o fúngica (UFC/ml)
1	2.1	0.085	1X10 ⁶
2	1.05	0.0425	1X10 ⁶
3	0.525	0.02125	1X10 ⁶
4	0.2625	0.010625	1X10 ⁶
5	0.13125	0.005313	1X10 ⁶

6	0.065625	0.002656	1X10 ⁶
7	0.032813	0.001328	1X10 ⁶
8	0.016406	0.000664	1X10 ⁶
9	0.008203	9.000332	1X10 ⁶
10	0.004102	0.000166	1X10 ⁶
Testigo negativo	0	0	1X10 ⁶
Control de AL-SDS	2.1	0.085	0
Testigo de AL	2.1	0	1X10 ⁶
Testigo de SDS	0	0.085	1X10 ⁶

La cantidad de bacterias inoculadas se determinó ajustando un tubo con medio BHI al tubo 1 del nefelómetro de McFarland. Mediante una fórmula, se calculó que debían sembrarse 3.33 microlitros de cada microorganismo en 1 ml de medio BHI para obtener una concentración de aproximadamente un millón de bacterias (Imagen 4). Posteriormente, se inocularon con 3.33 µl de NFMF-1, alcanzando una concentración final de 1 × 10⁶ UFC/ml, y se incubaron a 37 °C durante 24 horas en condiciones aerobias.

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1} = \frac{1 \times 10^6 \times 1}{3 \times 10^8} = 3.33 \mu L$$

Imagen 4. Fórmula utilizada para la obtención de 1 millón de bacterias a partir de un ajuste al tubo 1 del NF de McFarland

Cada sustancia fue evaluada de manera individual *contra E. faecalis*, *C. albicans* y *K. pneumoniae* (la cual se utilizó como control), y los resultados fueron obtenidos a partir de cinco pruebas independientes.

Pasadas las 24 horas de incubación, se observó el crecimiento de los microorganismos mediante la turbidez generada en el medio de cultivo, lo que significa un crecimiento positivo del microorganismo y es considerado que no presentó actividad inhibitoria esa concentración de la mezcla de AL+SDS. Se estableció un punto de corte, que determinó en qué tubo y en qué concentración se inhibió el crecimiento de cada uno de los microorganismos (Imagen 5).



Imagen 5. **a)** Galería de diluciones de la mezcla AL-SDS contra MO, observándose sin turbidez en los tubos x, y, z que se interpreta como actividad antimicrobiana positiva de la mezcla experimental. **b)** Tubo con dilución 4 sin turbidez (actividad antimicrobiana positiva) comparados con dilución 5 y 6 (actividad antimicrobiana negativa) contra *E. faecalis*.

Determinación de la Cantidad Mínima Inhibitoria 90 (CMI₉₀) en células planctónicas:

Se evaluó la sinergia entre ambas sustancias. Para ello, se mezclaron las concentraciones previamente determinadas y se realizaron nuevamente 10 diluciones en caldo BHI, utilizando 1 ml por tubo. Luego de realizar las diluciones, se sembraron 3.3 microlitros de cada microorganismo en cada tubo y se dejó incubar por 24 hrs a 37°C.

Posteriormente se sembraron 10 microlitros de dos tubos anteriores al tubo que mostró un crecimiento de los microorganismos mediante turbidez. Cada muestra se sembró en su medio correspondiente (en placa BHI para *E. faecalis* y *K. pneumoniae*, y en papa dextrosa para *C. albicans*). Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) y se extrapolo el número de bacterias utilizando la fórmula correspondiente (Imagen 6).

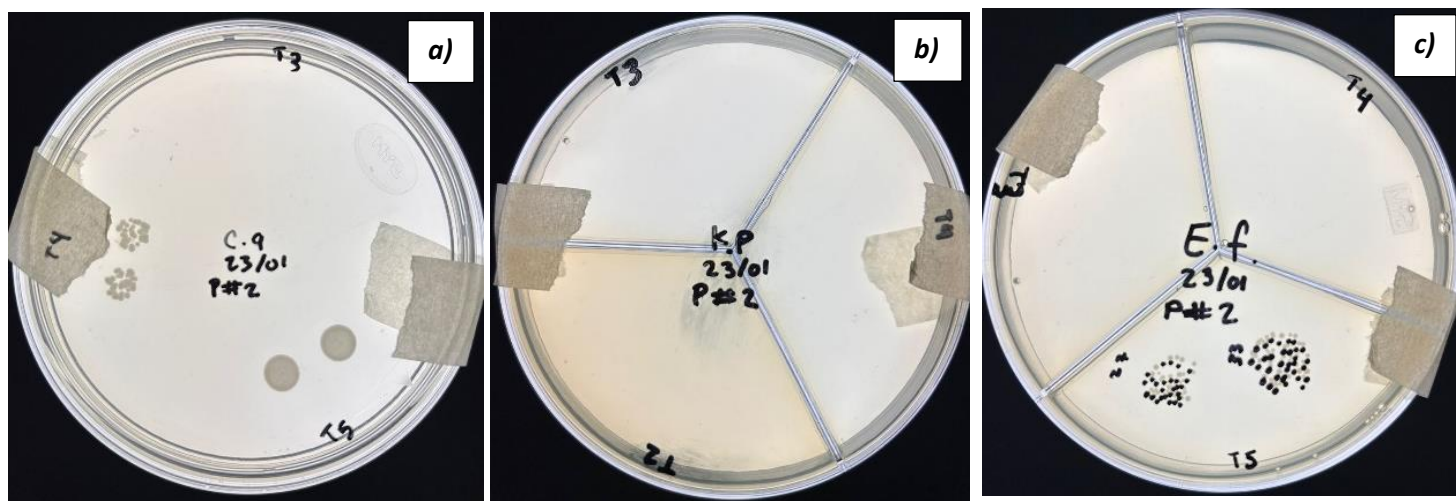


Imagen 6. Crecimiento y conteo de UFC/ml de los microorganismos de estudio retados con distintas soluciones de la mezcla AL+SDS: a) *C. albicans* con crecimiento en la dilución 4 y 5. b) *K. pneumoniae* sin crecimiento en las diluciones 2, 3 y 4. c) *E. faecalis* con crecimiento en la dilución 5.

De igual manera, el tubo ajustado a 1×10^6 UFC/ml se diluyó en proporciones de 1:10, 1:100 y 1:1000, y se sembró en placas con el medio correspondiente para establecer un control del número de bacterias inoculadas en cada tubo. Además, se incluyó un testigo positivo ajustado al tubo 1 del nefelómetro de McFarland como control, con el fin de verificar la concentración inicial de bacterias en cada experimento (Imagen 7).

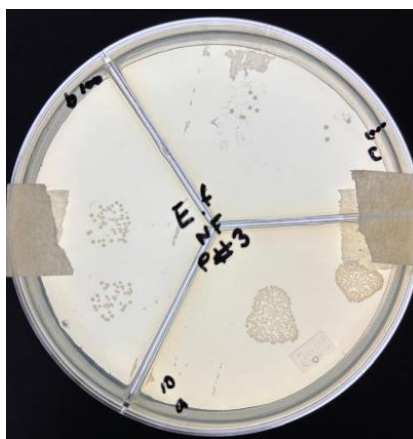


Imagen 7. Determinación de UFC de E. faecalis del inóculo ajustado a 1×10^6 UFC/ml (diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000).

Los resultados de la concentración de la mezcla LA-SDS, así como de la determinación de la CMI₉₀, fueron el promedio de 6 pruebas independientes (Anexo 2).

Eliminación de *E. faecalis* y *C. albicans* de superficies contaminadas con la CMI₉₀ de la mezcla de LA-SDS:

Para esta parte experimental se utilizó la mesa de una campana de flujo laminar, donde la superficie de trabajo, antes de cada prueba, se desinfectó con hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos, se removi6 con etanol al 70%, se dejó secar al aire y se irradiaron con luz UV durante 15 minutos.

Una vez desinfectada la mesa, se delimitaron zonas de 10 cm² utilizando cinta adhesiva y se desinfect6 la cinta adhesiva de la misma forma. A cada zona se le a6adi6 1 ml de una suspensión de *E. faecalis*, *C. albicans* o *K. pneumoniae*, a una concentración de 1×10⁶ UFC/ml (diluida en solución salina isot6nica), y dicha suspensión se esparci6 en el 6rea delimitada con un hisopo est6ril; posteriormente, se dejó secar durante una hora antes de evaluar la CMI₉₀ de LA+SDS (Imagen 8).

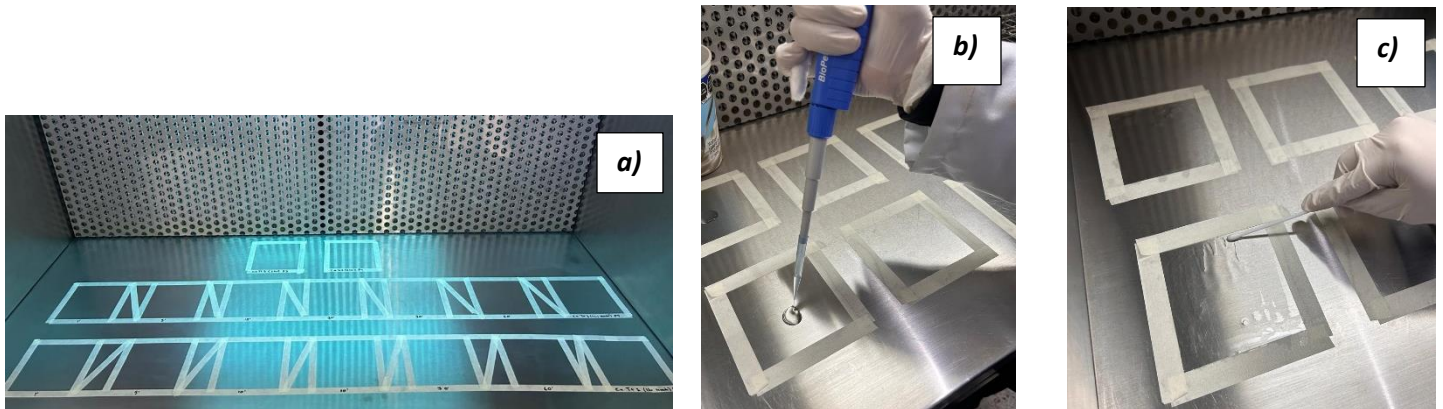


Imagen 8. a) Delimitación de las 6reas de 10cm² y desinfección con luz UV; b) contaminación de superficies con 1 ml de suspensión de cada microorganismo; c) esparcimiento de dicha suspensión con hisopo est6ril.

La superficie contaminada se roció con la ayuda de un atomizador, realizando tres disparos que cubrieron la totalidad del área. La evaluación de la desinfección se realizó a distintos tiempos de exposición a la CMI₉₀, estableciéndose, de forma independiente, tiempos de evaluación de 1, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos posteriores a la aplicación de LA+SDS (Imagen 9).

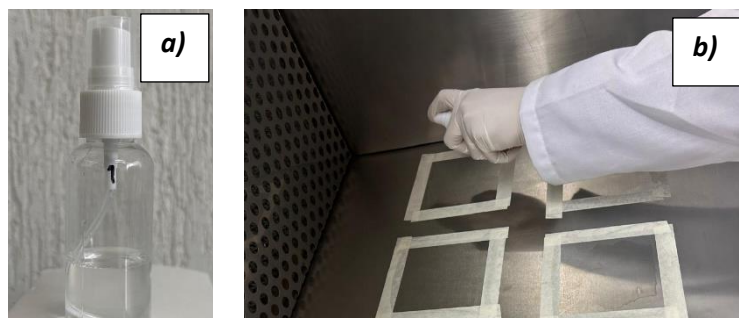


Imagen 9. a) Atomizador utilizado para la colocación de la CMI₉₀ en las superficies contaminadas; b) administración de CMI₉₀ en superficies (3 disparos)

Para ello, se pasó un hisopo estéril, previamente humedecido con medio BHI, por toda la superficie contaminada en movimientos de zigzag, se colocó en un tubo con 1 ml de BHI estéril y se agitó durante 60 segundos en un vórtex (Imagen 10). Se sembraron 10μL por goteo en la superficie de placas de agar BHI para *E. faecalis* y *K. pneumoniae*, y en dextrosa Sabouraud para *C. albicans*. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 24 h en condiciones aerobias.



Imagen 10. a) y b) Colocación del hisopo con la muestra de la superficie previamente rociada con la CMI₉₀ en tubos de ensayo con 1 ml de medio de cultivo BHI; c) agitación en vórtex.

Transcurrido el tiempo, se realizó el conteo de las colonias crecidas y se calcularon los valores en UFC/mL. Los resultados finales representaron el promedio de 5 pruebas independientes (Anexo 3).

Para determinar el volumen promedio dispensado por cada atomizador, se evaluaron cinco atomizadores mediante la medición del peso de tres disparos en un microtubo de ensayo cónico. Se utilizó una balanza analítica para registrar el peso inicial del microtubo y, posteriormente, el peso final tras la aplicación de los tres disparos. Este procedimiento se realizó con 10 microtubos de ensayo cónicos para cada atomizador.

El volumen en microlitros se calculó a partir de la diferencia de peso obtenida, considerando la densidad del líquido aplicado. Finalmente, se seleccionaron los dos atomizadores que presentaron los valores promedio más similares, con el objetivo de minimizar variaciones y reducir posibles sesgos en la aplicación de la solución (Anexo 4, Imagen 11).

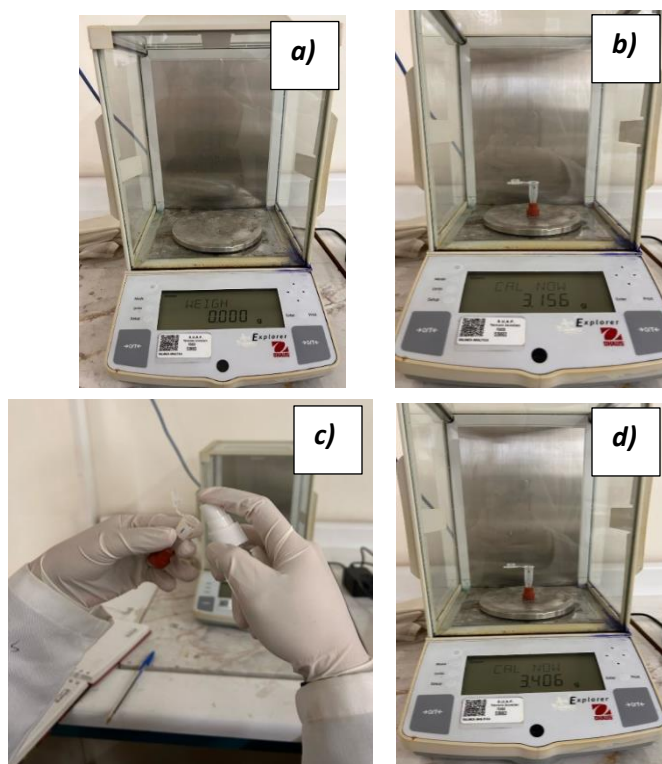


Imagen 11. a) Balanza analítica calibrada en 0; b) peso inicial de microtubo de ensayo cónico sin solución; c) administración de 3 disparos de solución; d) peso final, una vez añadidos los 3 disparos de cada atomizador.

Atomizador 1 = 312 μ l

Atomizador 2 = 314 μ l

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó el análisis de datos mediante estadística descriptiva para la prueba de CMI₉₀ individual y la prueba de sinergia. Para la prueba de actividad antimicrobiana de CMI₉₀ en superficies utilizó una prueba t no pareada para la comparación entre el grupo control (testigo -) y el grupo experimental de cada microorganismo y obtener el valor de p y la significancia estadística.

RESULTADOS

Determinación de la CMI₉₀:

Para *E. faecalis*, la concentración mínima inhibitoria 90% (CMI₉₀) de cada solución por separado fue de 16.406 mM de ácido levulínico (AL) y 0.664 mM de dodecil sulfato de sodio (SDS). En el caso de *C. albicans*, se determinó una CMI₉₀ de 32.813 mM de AL y 0.664 M de SDS. Por su parte, *K. pneumoniae* presentó una CMI₉₀ de 8.203 mM de AL y 85 mM de SDS. Los valores fueron trasladados a mM con el fin de manejar números más pequeños.

Los resultados de la evaluación de la sinergia entre ambas sustancias indicaron que la CMI₉₀ de la combinación para *E. faecalis* fue de 16.406 mM de AL + 0.664 mM de SDS, mientras que para *C. albicans*, la CMI₉₀ correspondió a 32.813 mM de AL + 1.328 mM de SDS. En el caso de *K. pneumoniae*, se observó la misma CMI₉₀ que para *C. albicans* (32.813 mM de AL + 1.328 mM de SDS).

Se consideraron estas concentraciones como CMI₉₀ debido a que la siguiente dilución en la serie experimental provocó la eliminación total del crecimiento microbiano en todos los casos analizados. La muerte total de los microorganismos y la CMI₉₀ observada mediante turbidez en los tubos de ensayo se corroboraron mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y su extrapolación al número de bacterias utilizando la fórmula correspondiente. Además, se incluyó un testigo positivo ajustado al tubo 1 del nefelómetro de McFarland como control, con el fin de verificar la viabilidad de bacterias en cada experimento. (Anexo 2, Tablas 3, 4 y 5 y Figuras 1 y 2).

Tabla 3. Turbidez observada en los tubos de ensayo con las diluciones correspondientes.

Concentración AL (mM)	Concentración SDS (mM)	<i>E.</i> <i>faecalis</i>	<i>C.</i> <i>albicans</i>	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i>
262.5	10.625	+	+	+
131.25	5.313	+	+	+
65.625	2.656	+	+	+
32.813	1.328	+	+	+
16.406	0.664	+	-	-
8.203	0.332	-	-	-
4.102	0.166	-	-	-
2.051	0.083	-	-	-

(+, ausencia de turbidez = actividad antimicrobiana) (-, presencia de turbidez = sin actividad antimicrobiana). Promedio de 5 pruebas independientes.

Tabla 4. Prueba de sinergia.

	Concentración inicial de microorganismos inoculados en UFC/ml	Crecimiento UFC/ml en %	Inhibición UFC/ml en %	Concentración AL+SDS
<i>E. faecalis</i>	664,000	1.2%	98.8%	16.406 mM + 0.664 mM
<i>C. albicans</i>	140,000	8%	92%	32.813 mM + 1.328 mM
<i>K. pneumoniae</i>	570,000	1.6%	98.4%	32.813 mM + 1.328 mM

Resultado en porcentajes de las UFC/ml del crecimiento en placas de cultivo con la CMI₉₀ (Tubo que mostró turbidez en los tubos de ensayo). Promedio de 5 pruebas independientes.

Tabla 5. Prueba de sinergia.

	Concentración inicial de microorganismos inoculados en UFC/ml	Crecimiento UFC/ml en %	Inhibición UFC/ml en %	Concentración AL+SDS
<i>E. faecalis</i>	664,000	0%	100%	32.813 mM + 1.328 mM
<i>C. albicans</i>	140,000	0%	100%	65.625 mM + 2.656 mM
<i>K. pneumoniae</i>	570,000	0%	100%	65.625 mM + 2.656 mM

Resultado en porcentajes de las UFC/ml del crecimiento en placas de cultivo del tubo de ensayo con medio de cultivo que no mostró turbidez. Promedio de 5 pruebas independientes.

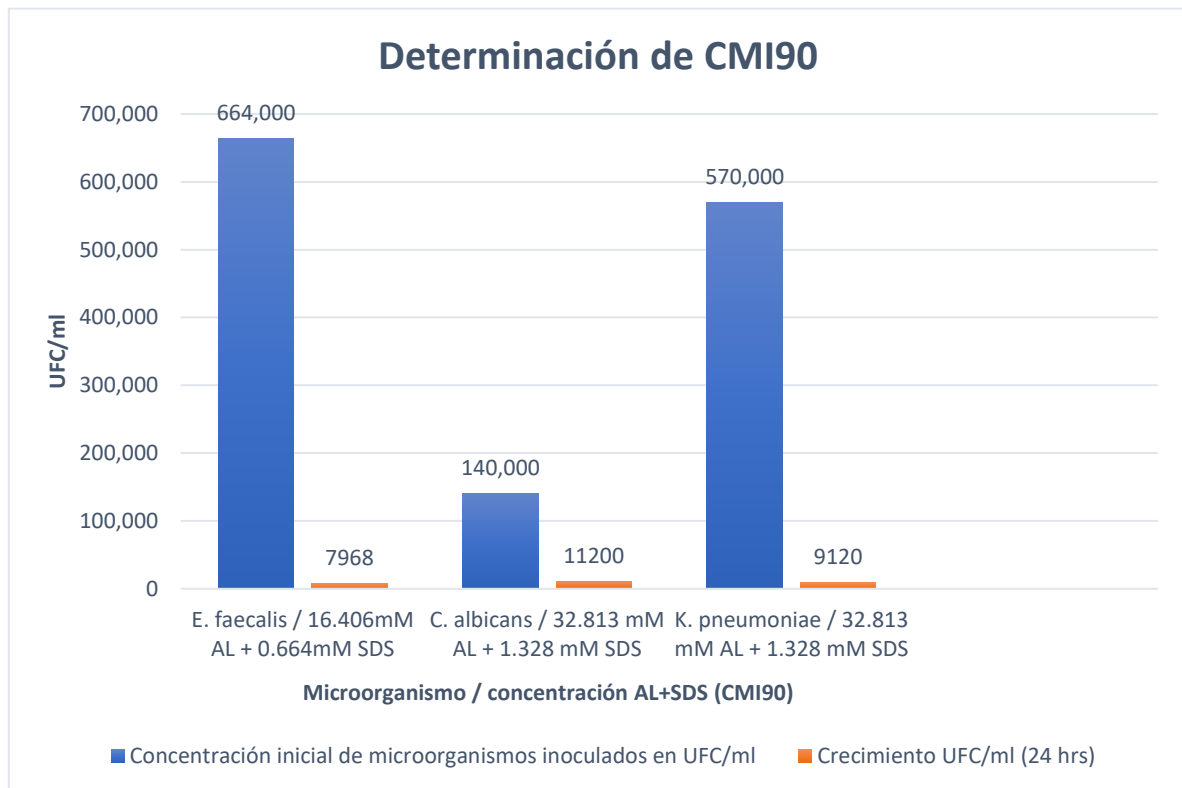


Figura 1. Crecimiento de UFC/ml a las 24 hrs de cada microorganismo en el primer tubo que mostró turbidez en las diluciones seriadas para la obtención de CMI₉₀. Promedio de 5 pruebas independientes.

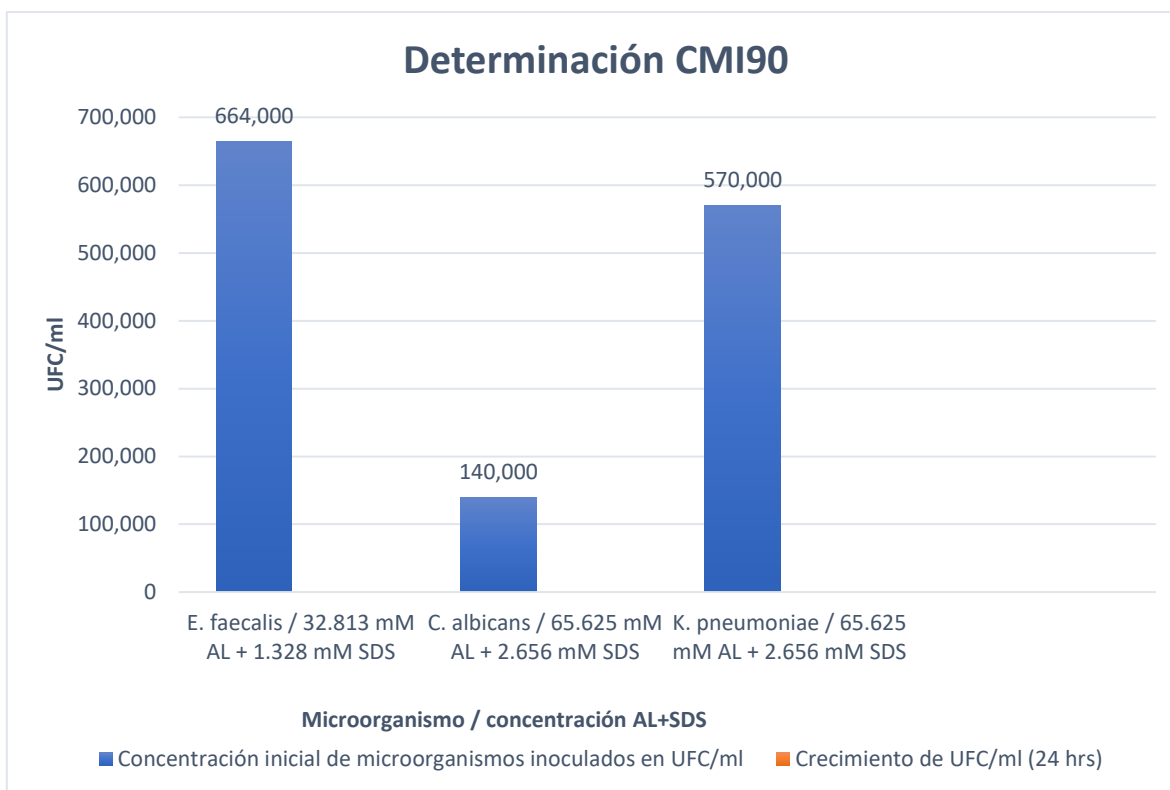


Figura 2. Crecimiento de UFC/ml a las 24 hrs de cada microorganismo en el primer tubo que no mostró turbidez en las diluciones seriadas para la obtención de CMI90. Promedio de 5 pruebas independientes.

Actividad antimicrobiana en superficies contaminadas:

El análisis estadístico para *E. faecalis*, *C. albicans* y *K. pneumoniae* mostró una diferencia significativa entre el crecimiento de UFC/ml del grupo control (Testigo -) y el del grupo experimental, con un valor de $p = <0.0001^{****}$ para *E. faecalis*; $p = <0.0001^{****}$ para *C. albicans* y $p = 0.0002^{***}$ para *K. pneumoniae* (Figura 3).

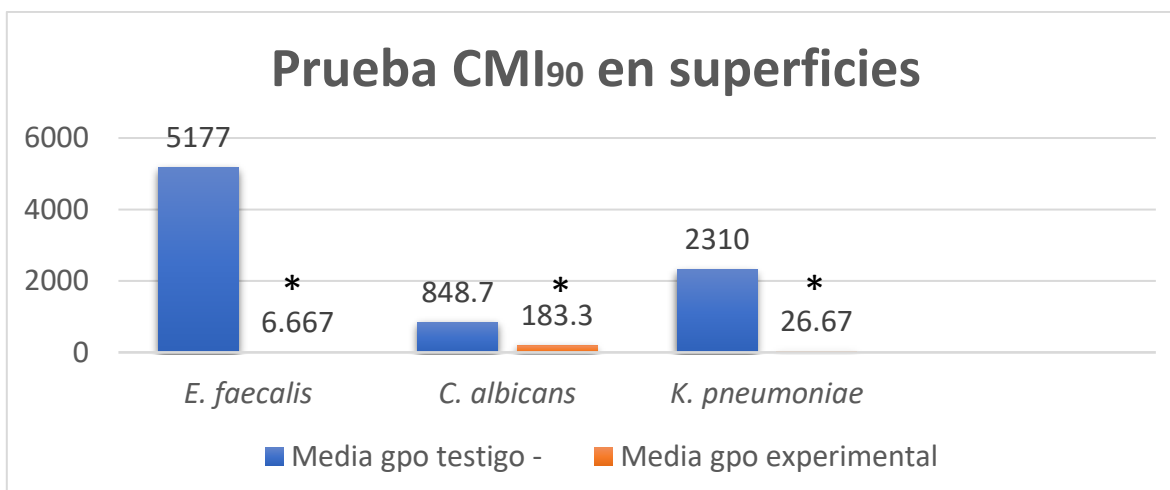


Figura 3. Media de crecimientos UFC/ml de la prueba de CMI₉₀ en superficies. Resultados de la prueba estadística (t no pareada). *E. faecalis* * $p < 0.0001$. *C. albicans* * $p < 0.0001$. *K. pneumoniae* * $p < 0.0002$.

Los resultados de las pruebas en superficie de *E. faecalis* mostraron crecimiento a los 1 y 5 minutos únicamente. *C. albicans* mostró un crecimiento variable y *K. pneumoniae* presentó únicamente crecimiento en los minutos 5, 10 y 20. Los promedios de UFC/ml crecidas en cada tiempo evaluado, así como los testigos positivos (contaminación de superficies sin aplicación de CMI₉₀) y la concentración inicial del inóculo, se muestran en la tabla 6, figura 4 y son el promedio de 5 pruebas independientes. El anexo 3 muestra la tabla de captura de datos para cada prueba.

Tabla 6 Prueba de CMI₉₀ en superficies.

	<i>E. faecalis</i> UFC/ml (% de inhibición CMI ₉₀)	<i>C. albicans</i> UFC/ml (% de inhibición CMI ₉₀)	<i>K. pneumoniae</i> UFC/ml (% de inhibición CMI ₉₀)
Concentración inicial de microorganismos inoculados	1,776,000	56,000	1,226,000
Testigo - 1 minuto	5840	960	3340
Testigo - 5 minutos	5710	942	3300
Testigo - 10 minutos	5100	890	2420
Testigo - 20 minutos	4900	854	2100
Testigo - 30 minutos	4810	796	1900

Testigo - 60 minutos	4700	650	800
Experimental + CMI₉₀ 1 minuto	20 (99.66%)	360 (62.5%)	0 (100%)
Experimental + CMI₉₀ 5 minutos	20 (99.65%)	180 (80.9%)	40 (98.79%)
Experimental + CMI₉₀ 10 minutos	0 (100%)	340 (61.8%)	40 (98.35%)
Experimental + CMI₉₀ 20 minutos	0 (100%)	180 (78.93%)	80 (96.2%)
Experimental + CMI₉₀ 30 minutos	0 (100%)	40 (94.97%)	0 (100%)
Experimental + CMI₉₀ 60 minutos	0 (100%)	0 (100%)	0 (100%)

Resultado del crecimiento en UFC/ml y porcentajes de inhibición de la CMI₉₀ de acuerdo con el testigo negativo de cada tiempo de evaluación. Promedio de 5 pruebas independientes.

PRUEBA DE CMI₉₀ EN SUPERFICIES CONTAMINADAS

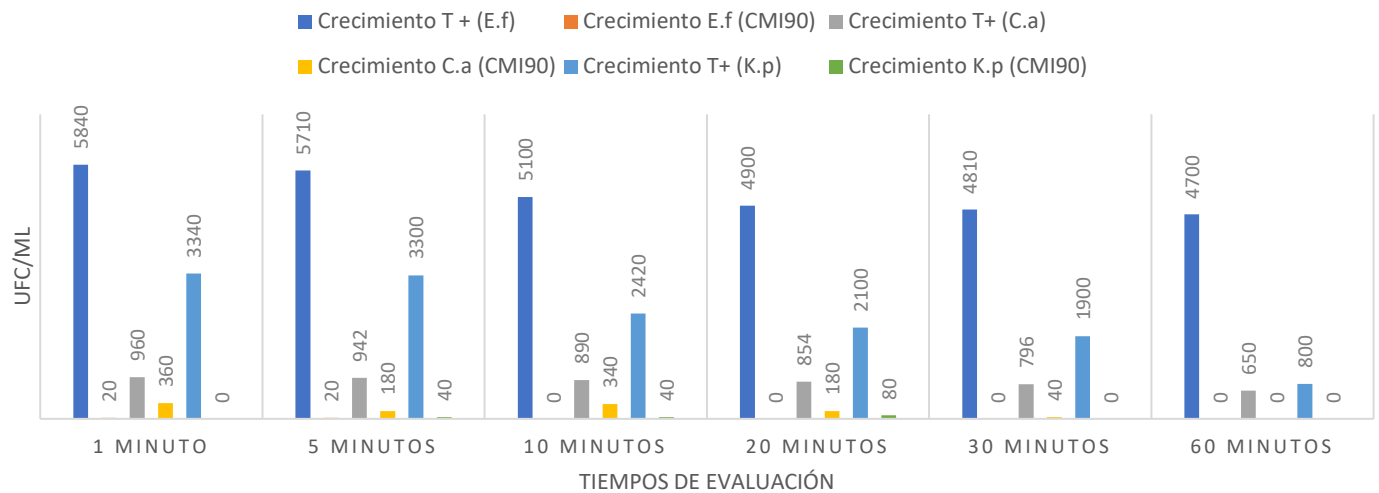


Figura 4 Resultados prueba de CMI₉₀ en superficies. Comparación de testigos y experimentales sometidos a la CMI90 a los distintos tiempos de evaluación: E.f, *Enterococcus faecalis*. C.a, *Candida albicans*. K.p, *Klebsiella pneumoniae*. T+, testigo negativo (sin aplicación de CMI₉₀). Promedio de 5 pruebas independientes.

DISCUSIÓN

Este proyecto evaluó la actividad antimicrobiana de una combinación de ácido levulínico (AL) y dodecil sulfato de sodio (SDS) contra *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Para ello, se determinó la concentración mínima inhibitoria 90 (CMI₉₀) y su eficacia en superficies contaminadas. Los resultados mostraron que la combinación de AL+SDS ejerció actividad antimicrobiana contra ambos microorganismos evaluados, con diferencias en su sensibilidad. *Klebsiella pneumoniae* se utilizó como control debido a que está demostrado que es un microorganismo sensible a la formulación (31).

En el caso de *E. faecalis*, la CMI₉₀ obtenida en este estudio sugiere que la combinación de ácido levulínico y dodecil sulfato de sodio es efectiva en la inhibición de esta bacteria, lo cual es de particular importancia debido a su papel en infecciones endodónticas persistentes y su capacidad de resistencia a condiciones adversas (11). La eliminación total del crecimiento bacteriano a partir del minuto 10 indica que la formulación tiene un efecto antimicrobiano rápido y sostenido en superficies contaminadas. Además, el análisis estadístico mediante la prueba t no pareada mostró una diferencia significativa ($p = <0.0001$), lo que respalda la efectividad antimicrobiana observada. Sin embargo, el promedio obtenido en los minutos 1 y 5 se debió a que el crecimiento microbiano solo se presentó en la quinta réplica de las cinco pruebas realizadas. Esto podría haber estado relacionado con un error en la aplicación de la CMI₉₀ mediante el atomizador o en la toma de muestra del área contaminada y tratada.

Para *C. albicans*, la CMI₉₀ permitió observar una reducción gradual en el número de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) a lo largo del tiempo, hasta su eliminación completa a los 60 minutos. Esta dinámica sugiere que la formulación ejerce una actividad antimicrobiana progresiva. El análisis estadístico mediante la prueba t no pareada mostró una diferencia significativa ($p = <0.0001$), lo que confirma la eficacia antimicrobiana observada. Sin embargo, se observaron dificultades en el crecimiento adecuado de *C. albicans*, lo que posiblemente influyó en los conteos obtenidos y resultó en valores consistentemente bajos para este

microorganismo. Esta limitación experimental resalta la importancia de optimizar las condiciones de cultivo en futuros estudios.

En el caso de *K. pneumoniae*, la CMI₉₀ evidenció una reducción significativa en la viabilidad bacteriana. El análisis estadístico mostró una diferencia significativa ($p=0.0002$), lo que confirma la actividad antimicrobiana de la formulación contra este microorganismo. Sin embargo, el crecimiento observado en los minutos 5, 10 y 20 se presentó únicamente en la quinta réplica experimental, lo que sugiere la posibilidad de un error en la aplicación de la CMI₉₀ o en la toma de muestra del área contaminada, similar a lo observado con *E. faecalis*.

Estos hallazgos son consistentes con los resultados reportados por Gregory et al. en 2021, quienes demostraron que la combinación de AL+SDS (MoWa) es altamente efectiva contra *K. pneumoniae*. En su estudio, “MoWa” logró erradicar el 99.99% de este microorganismo de superficies contaminadas desde el minuto 1. Sin embargo, la concentración utilizada en el presente estudio fue mucho menor (32.813 mM AL + 1.328 mM SDS) en comparación con la concentración utilizada por Gregory et. al (1M AL + 0.04M SDS), lo que sugiere que el efecto sinérgico de AL+SDS podría mantenerse incluso en concentraciones reducidas (5).

Estudios previos han demostrado que la combinación de ácido levulínico (AL) y dodecil sulfato de sodio (SDS) genera un efecto antimicrobiano sinérgico, evidenciando una mayor eficacia cuando se utilizan en conjunto en comparación con su uso individual. Diversos autores han reportado que esta sinergia potencia la actividad antimicrobiana, mejorando significativamente la inhibición del crecimiento microbiano (33,35,39), gracias a que el ácido levulínico reduce el pH citoplasmático de los microorganismos a través de la ionización de sus moléculas no disociadas, lo que altera la carga electrostática tanto de las moléculas de SDS como de las superficies celulares. Esto interfiere con el transporte de sustratos y disminuye la fuerza motriz de protones, afectando así la homeostasis celular (44).

Por su parte, el SDS desnaturaliza proteínas y quela cationes divalentes, lo que compromete la integridad de la membrana celular. Además, al reducir la tensión superficial, facilita la penetración del ácido levulínico, permitiendo un contacto más

eficiente con microorganismos que suelen ser más difíciles de alcanzar. Esta interacción sinérgica potencia el efecto antimicrobiano de la combinación, maximizando su eficacia en la eliminación de patógenos (44)

Sin embargo, en el presente estudio, la concentración utilizada de AL se mantuvo constante tanto en su aplicación individual como en la formulación combinada con SDS para *E. faecalis* y *C. albicans*, mostrando únicamente efecto sinérgico en el grupo control (*K. pneumoniae*). Las concentraciones empleadas fueron de 0.664 mM de AL + 16.406 mM de SDS para *E. faecalis* y 32.813 mM de AL + 1.328 mM de SDS para *C. albicans* y *K. pneumoniae*. Se observó que utilizando una baja cantidad y bajas concentraciones tiene buena actividad antimicrobiana, lo que lo convierte en una buena alternativa como solución irrigante en Endodoncia.

De acuerdo con lo reportado por Zhou et. al. en el 2017, la combinación AL+SDS presenta un efecto sinérgico y antimicrobiano efectivo contra otras bacterias Gram -, como *E. coli* y *Salmonella* sp. (43). Lo que coincide con nuestro estudio al ser *K. pneumoniae* una bacteria Gram -. Sin embargo, la falta de sinergia en *E. faecalis* (Gram+) y *C. albicans*, podría deberse a diferencias estructurales en sus paredes celulares, debido a que está demostrado que la combinación AL+SDS altera el transporte de sustrato, reduce la fuerza motriz de protones, quela iones metálicos , por lo tanto, libera lipopolisacárido de la membrana externa de las bacterias Gram- como *K. pneumoniae* (44).

Un hallazgo importante del estudio de Wang et. al. del 2012 es que la combinación AL+SDS fue efectiva en la eliminación de biofilms en la cavidad oral de ratas sin causar efectos adversos en los tejidos, lo que refuerza la biocompatibilidad de la combinación (40). En nuestro estudio, aunque no fue evaluada la citotoxicidad, los resultados sugieren que AL+SDS podría ser un agente antimicrobiano con potencial para su aplicación clínica en la Endodoncia, ya que, no posee la citotoxicidad característica del hipoclorito de sodio (estándar de referencia) mencionada por Boutsoukis et. al. en el 2022 (24).

En el presente estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de la combinación de ácido levulínico (AL) y dodecil sulfato de sodio (SDS) en *Enterococcus faecalis* y

Candida albicans, observándose una reducción progresiva de UFC/ml tanto en los grupos control como en los experimentales a lo largo del tiempo. Esta disminución no solo puede atribuirse al efecto de AL + SDS, sino también a factores ambientales que afectan la viabilidad de los microorganismos en superficies, como la desecación celular y la falta de nutrientes. Estos hallazgos coinciden con el estudio de Salazar et al. en el año 2022, quienes analizaron la supervivencia de *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecium*, demostrando que, incluso en ausencia de agentes antimicrobianos, la viabilidad microbiana disminuye progresivamente debido a las condiciones del entorno (45).

Entre las limitaciones de este estudio, se debe considerar que los experimentos se realizaron en condiciones *in vitro*, en superficies contaminadas, y no en un entorno clínico real, como en órganos dentarios o modelos biológicos. Además, la combinación de AL + SDS fue evaluada en microorganismos planctónicos, sin incluir su efecto en biofilms, que representan una forma más resistente de infección (15). Asimismo, factores ambientales pudieron haber influido en la reducción de UFC/ml observada, lo que sugiere que parte de la disminución microbiana podría atribuirse a condiciones externas, como la desecación celular y la falta de nutrientes (45). También se presentaron dificultades en el crecimiento adecuado de *C. albicans* y variaciones en la aplicación de la CMI₉₀ en ciertas réplicas experimentales, lo que resalta la necesidad de optimizar la técnica de aplicación y el ajuste del nefelómetro.

Por lo tanto, futuros estudios deberán enfocarse en optimizar las condiciones experimentales, sería relevante replicar la metodología en condiciones más realistas para la práctica endodóntica, trasladando la evaluación a conductos radiculares (modelo *ex vivo*) para analizar su efectividad en un entorno clínico más representativo, utilizar biofilm en lugar de bacterias planctónicas y emplear volúmenes más altos de la solución a las superficies contaminadas, ya que en el presente estudio se utilizó un volumen de 312 y 314 µl. Además, se sugiere modificar los intervalos de muestreo, reduciendo el tiempo de toma de muestras a segundos en lugar de minutos, con el objetivo de obtener datos más exactos sobre la velocidad de acción del compuesto. También se espera en estudios futuros probar la mezcla

con otros agentes y evaluar la quelación continua. Estas mejoras permitirán una mejor comprensión de la dinámica antimicrobiana de la formulación y su posible aplicación en la desinfección del sistema de conductos radiculares, representando una alternativa innovadora para el tratamiento endodóntico.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que la combinación de ácido levulínico (AL) y dodecil sulfato de sodio (SDS) posee actividad antimicrobiana significativa contra *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, reduciendo de manera efectiva las unidades formadoras de colonias (UFC/ml) en superficies contaminadas.

La eliminación de *E. faecalis* empezó a disminuir considerablemente desde el minuto 1 (98%) y en su totalidad partir de los 10 minutos, mientras que *C. albicans* presentó una disminución progresiva hasta su erradicación total a los 60 minutos.

A pesar de las limitaciones presentadas, los hallazgos de este estudio respaldan la eficacia de la combinación de AL+SDS como una alternativa antimicrobiana potencialmente útil en la desinfección contra *E. faecalis* y *C. albicans*.

Los resultados de este estudio demuestran ser prometedores y podrían convertir a esta combinación como una solución alternativa para la irrigación de los conductos radiculares en Endodoncia.

LOGÍSTICA

Recursos humanos:

- Tesista.
- Director de tesis.
- Director metodológico.
- Director disciplinario.

RECURSOS MATERIALES:

- Ácido levulínico.
- Dodecil sulfato de sodio.
- NaOCl.
- Solución salina isotónica estéril.
- Caldo de infusión cerebro corazón (BHI).
- Agar Mueller Hinton.
- Agar papa dextrosa
- Microorganismos (*C. albicans* ATCC 10231, *E. faecalis* ATCC 51299 y *K. pneumoniae* ATCC).
- Material de laboratorio de microbiología.

BIOSEGURIDAD

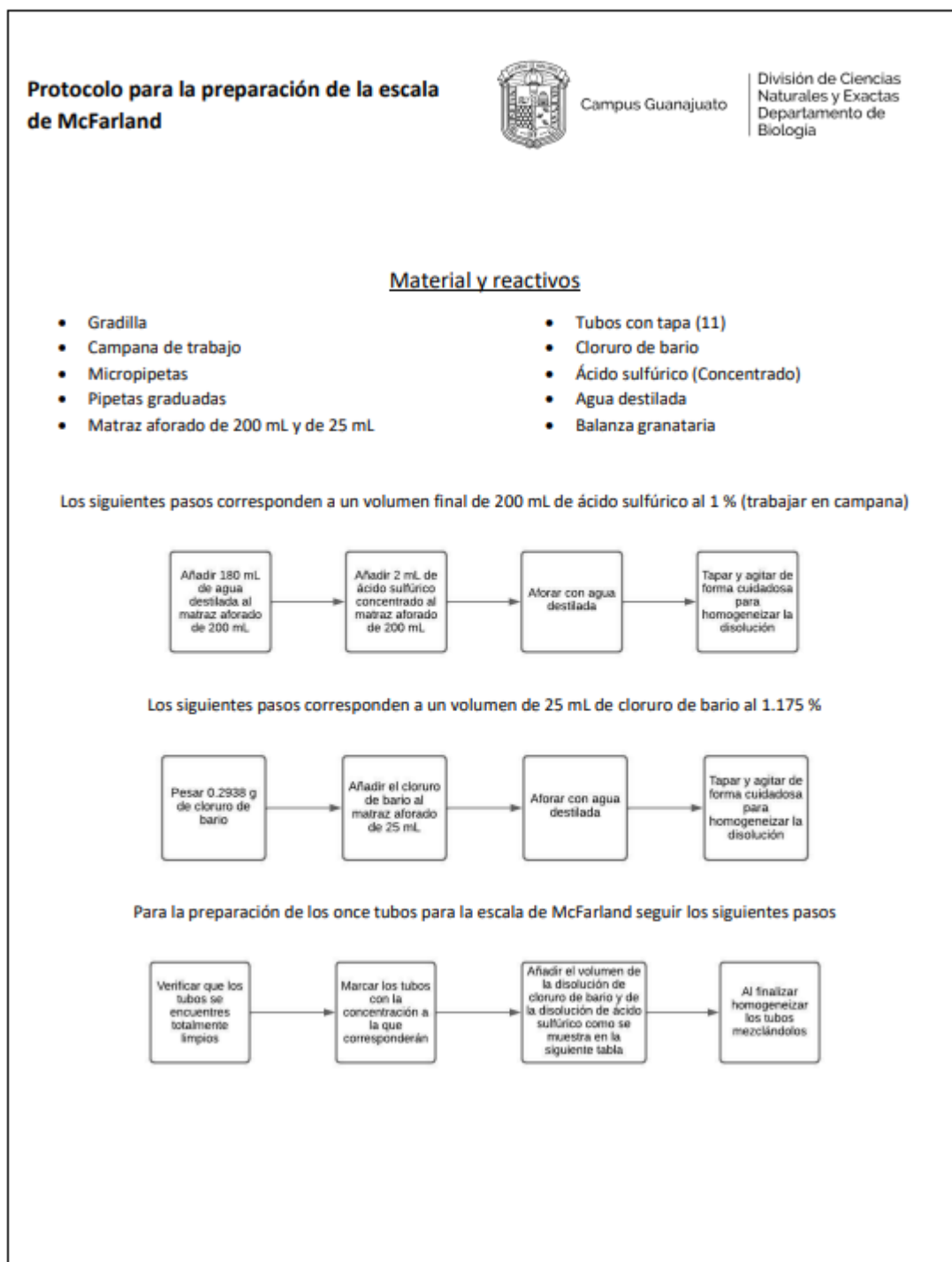
La alumna tesista contó con las barreras de protección necesarias para evitar el contacto directo y a través de vías respiratorias con los microorganismos a evaluar, estas incluyeron: bata, gorro, cubrebocas desechables, guantes estériles, y lentes de protección.

Los recipientes que contuvieron los irrigantes fueron sellados e identificados con una etiqueta y su nombre correspondiente, estos fueron resguardados en el laboratorio de microbiología de la FEBUAP.

Los desechos resultantes fueron colocados en bolsas de polietileno rojas de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM – 087 – ECOL – SSA1 – 2002, Protección ambiental – Salud ambiental – Residuos peligrosos – biológico – Infecciosos – Clasificación y especificaciones de manejo.

ANEXOS

1. Técnica estándar para la preparación del Nefelómetro de McFarland:



2. Ejemplo de tabla de captura de datos por cada prueba de sinergia para obtención de CMI₉₀ de cada microorganismo.

Tubo	Concentración SDS	Concentración AL	E. faecalis	C. albicans	K. pneumoniae
1	0.010625	0.2625	+	+	+
2	0.005313	0.13125	+	+	+
3	0.002656	0.065625	+	+	+
4	0.001328	0.032813	+	+	+
5	0.000664	0.016406	+	-	-
6	0.000332	0.008203	-	-	-
7	0.000166	0.004102	-	-	-
8	0.000083	0.002051	-	-	-
			S/NF BHI:	S/NF BHI:	S/NF BHI:
			1:10 - 71 UFC- 71,000	1:10 -4UFC-4,000	1:10 -20 UFC-20,000
			1:100- 22 UFC- 220,000	1:100- 0 UFC-0	1:100- 2 UFC- 20,000
			1:1000- 5 UFC- 500,000	1:1000-0UFC-0	1:1000-1 UFC- 100,000
	S: Siembra		S/Tubos BHI:	S/Tubos Papadextrosa:	S/Tubos BHI:
	POSIBLE MIC 90		T3 - 0UFC - 0	T2 - 0 UFC - 0	T2 - 0 UFC - 0
			T4 - 0UFC - 0	T3 - 0UFC - 0	T3 - 0UFC - 0
			T5 - 31 UFC - 3100	T4 - 7 UFC - 700	T4 - 35 UFC - 35000

3. Tablas de captura de datos de las pruebas independientes de superficies contaminadas de cada microorganismo.

Enterococcus faecalis prueba superficies													
	1'	5'	10'	20'	30'	60'	NEFELOMETRO	TESTIGO 1 min	TESTIGO 5 min	TESTIGO 10 min	TESTIGO 20 min	TESTIGO 30 min	TESTIGO 60 min
P1													
P2													
P3													
P4													
P5													
Promedio													

Candida albicans prueba superficies													
	1'	5'	10'	20'	30'	60'	NEFELOMETRO	TESTIGO 1 min	TESTIGO 5 min	TESTIGO 10 min	TESTIGO 20 min	TESTIGO 30 min	TESTIGO 60 min
P1													
P2													
P3													
P4													
P5													
Promedio													

Klebsiella pneumoniae prueba superficies													
	1'	5'	10'	20'	30'	60'	NEFELOMETRO	TESTIGO 1 min	TESTIGO 5 min	TESTIGO 10 min	TESTIGO 20 min	TESTIGO 30 min	TESTIGO 60 min
P1													
P2													
P3													
P4													
P5													
Promedio													

4. Ejemplo tabla de captura de datos para la cantidad de solución aplicada (CMI90) por cada atomizador a la prueba de superficies.

Atomizador = 1			
	Peso inicial	Peso a los 3 disparos	Diferencia (g)
Tubo 1	3.152	3.409	0.257
Tubo 2	3.152	3.417	0.265
Tubo 3	3.155	3.452	0.297
Tubo 4	3.152	3.485	0.333
Tubo 5	3.157	3.505	0.348
Tubo 6	3.153	3.5	0.347
Tubo 7	3.155	3.524	0.369
Tubo 8	3.147	3.473	0.326
Tubo 9	3.157	3.442	0.285
Tubo 10	3.146	3.443	0.297
	Promedio:		0.3124 = 312 µl

Bibliografía

1. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in Root Canal Therapy Reconsidered. *J Endod*. 2005;31(11):817–20.
2. Kanagasingam S, Blum IR. Sodium Hypochlorite Extrusion Accidents: Management and Medico-Legal Considerations. *Prim Dent J*. 2020 Dec 1;9(4):59–63.
3. Al-Nazhan S, Al-Sulaiman A, Al-Rasheed F, Alnajjar F, Al-Abdulwahab B, Al-Badah A. Microorganism penetration in dentinal tubules of instrumented and retreated root canal walls. In vitro SEM study . *Restor Dent Endod*. 2014;39(4):258.
4. Moradi Eslami L, Vatanpour M, Aminzadeh N, Mehrvarzfar P, Taheri S. The comparison of intracanal medicaments, diode laser and photodynamic therapy on removing the biofilm of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* in the root canal system (ex-vivo study). *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Jun 1;26:157–61.
5. Gregory T V., Ellis K, Valeriani R, Khan F, Wu X, Murin L, et al. MoWa: A Disinfectant for Hospital Surfaces Contaminated With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Other Nosocomial Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Jul 6;11.
6. Bukhari S, Babaeer A. Irrigation in Endodontics: a Review. Vol. 6, *Current Oral Health Reports*. Springer Science and Business Media B.V.; 2019. p. 367–76.
7. Haapasalo M, Qian W, Shen YA. Irrigation: beyond the smear layer. *Endod Topics*. 2013;27:35–53.
8. Idikó. J. Márton. How does the periapical inflammatory process compromise general health? *Endod Topics*. 2004;8:3–14.
9. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019 May 1;24(3):e364–72.
10. Siqueira JF, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *Br Dent J*. 2014 Mar 21;216(6):305–12.
11. Haapasalo Markus, Udnaes Trude, Endal U. Persistent, recurrent, and acquired infection of the root canal system post-treatment. *Endod Topics*. 2003;6:29–56.
12. Kasić S, Knezović M, Beader N, Gabrić D, Malčić AI, Baraba A. Efficacy of Three Different Lasers on Eradication of *Enterococcus faecalis* and *Candida*

albicans Biofilms in Root Canal System. Photomed Laser Surg. 2017 Jul 1;35(7):372–7.

13. Deng Z, Lin B, Liu F, Zhao W. Role of *Enterococcus faecalis* in refractory apical periodontitis: from pathogenicity to host cell response. Vol. 15, Journal of Oral Microbiology. Taylor and Francis Ltd.; 2023.
14. Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. J Endod. 2006 Mar;32(3):173–7.
15. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. *Enterococcus faecalis* Biofilms Eradication by Root Canal Irrigants. J Endod. 2009 May;35(5):711–4.
16. Jhajharia K, Parolia A, Shetty Kv, Mehta L. Biofilm in endodontics: A review. J Int Soc Prev Community Dent. 2015;5(1):1.
17. Shah N, Madhu K, Sreenivasa Murthy B, Hemanth B, Mathew S, Nagaraj S. Identification of presence of *Candida albicans* in primary root canal infections: An in vitro study. Endodontology. 2016;28(2):109.
18. Klotz S, Rutten M, Smith R, Babcock S, Cunningham M. Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. Academic Press Limited. 1993;14:133–47.
19. Shah N, Madhu K, Sreenivasa Murthy B, Hemanth B, Mathew S, Nagaraj S. Identification of presence of *Candida albicans* in primary root canal infections: An in vitro study. Endodontology. 2016;28(2):109.
20. Nouroloyouni A, Moghaddam N, Nuroloyuni S, Milani AS, Yavari HR, Majidi AR. Molecular Identification of *Candida albicans* in Endodontic Retreatment Cases by SYBR Green I Real-time Polymerase Chain Reaction and its Association with Endodontic Symptoms. Journal of Dentistry (Iran). 2023 Dec 1;24(4):429–37.
21. Jiang Q, Jing Q, Ren B, Cheng L, Zhou X, Lai W, et al. Culture Supernatant of *Enterococcus faecalis* Promotes the Hyphal Morphogenesis and Biofilm Formation of *Candida albicans*. Pathogens. 2022 Oct 1;11(10).
22. Alshanta OA, Albashaireh K, McKloud E, Delaney C, Kean R, McLean W, et al. *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* biofilm frenemies: When the relationship sours. Biofilm. 2022 Dec 1;4:72–100.
23. Siqueira Junior JF, Rôças I das N, Marceliano-Alves MF, Pérez AR, Ricucci D. Unprepared root canal surface areas: Causes, clinical implications, and therapeutic strategies. Braz Oral Res. 2018;32:1–19.

24. Boutsoukios C, Arias-Moliz MT. Present status and future directions – irrigants and irrigation methods. Vol. 55, *International Endodontic Journal*. John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 588–612.
25. Basrani B, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. *Endod Topics*. 2013;27:72–102.
26. Shetty S, Fuoad Al-Bayati S, Narayanan A, Hamed M, Shetty P. Sodium hypochlorite accidents in dentistry. A systematic review of published case reports. *Baltic Dental and Maxillofacial Journal*. 2020;22(1):17–21.
27. Ruksakiet K, Hanák L, Farkas N, Hegyi P, Sadaeng W, Czumbel LM, et al. Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. Vol. 46, *Journal of Endodontics*. Elsevier Inc.; 2020. p. 1032-1041.e7.
28. Chen D, Zhao T. Organic Acids, Detergents, and Their Combination for Inactivation of Foodborne Pathogens and Spoilage Microorganisms. In: *ACS Symposium Series*. American Chemical Society; 2018. p. 63–85.
29. Shen Y, Sun JK, Yi YX, Wang B, Xu F, Sun RC. One-pot synthesis of levulinic acid from cellulose in ionic liquids. *Bioresour Technol*. 2015 Jul 29;192:812–6.
30. Velichko NS, Guliy OI, Kanevsky M V., Kupryashina MA, Fedonenko YP. Whole-cell electric sensor for determination of sodium dodecyl sulfate. *World J Microbiol Biotechnol*. 2022 Jul 1;38(7).
31. Gregory T V., Ellis K, Valeriani R, Khan F, Wu X, Murin L, et al. MoWa: A Disinfectant for Hospital Surfaces Contaminated With Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Other Nosocomial Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Jul 6;11.
32. Chen D, Zhao T. Organic Acids, Detergents, and Their Combination for Inactivation of Foodborne Pathogens and Spoilage Microorganisms. In: *ACS Symposium Series*. American Chemical Society; 2018. p. 63–85.
33. Zhao T, Zhao P, Doyle MP. Inactivation of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on Lettuce and Poultry Skin by Combinations of Levulinic Acid and Sodium Dodecyl Sulfate. Vol. 72, *Journal of Food Protection*. 2009.
34. Beuchat LR, Mann DA, Alali WQ. Evaluation of sanitizers for inactivating *Salmonella* on in-shell pecans and pecan nutmeats. *J Food Prot*. 2012 Nov;75(11):1930–8.
35. Yan X, Xu Y, Shen C, Chen D. Inactivation of *Staphylococcus aureus* by Levulinic Acid Plus Sodium Dodecyl Sulfate and their Antibacterial

Mechanisms on *S. aureus* Biofilms by Transcriptomic Analysis. *J Food Prot.* 2023 Mar 1;26(3).

36. Ortega YR, Torres MP, Tatum JM. Efficacy of levulinic acid-sodium dodecyl sulfate against *Encephalitozoon intestinalis*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Cryptosporidium parvum*. *J Food Prot.* 2011 Jan;74(1):140–4.
37. Aydin A, Cannon JL, Zhao T, Doyle MP. Efficacy of a Levulinic Acid Plus Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-Based Sanitizer on Inactivation of Influenza A Virus on Eggshells. *Food Environ Virol.* 2013 Dec;5(4):215–9.
38. Ortega YR, Torres MP, Tatum JM. Efficacy of levulinic acid-sodium dodecyl sulfate against *Encephalitozoon intestinalis*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Cryptosporidium parvum*. *J Food Prot.* 2011 Jan;74(1):140–4.
39. Beuchat LR, Mann DA, Alali WQ. Evaluation of sanitizers for inactivating *Salmonella* on in-shell pecans and pecan nutmeats. *J Food Prot.* 2012 Nov;75(11):1930–8.
40. Wang BY, Zhao T, Doyle M, Biofilm Bacteria O, Hong J, Ciancio SG, et al. A novel formulation effective in killing oral biofilm bacteria A Novel Formulation Effective in Killing. *International Academy of Periodontology* [Internet]. 2012;14:53–8. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/230712598>
41. Aydin A, Cannon JL, Zhao T, Doyle MP. Efficacy of a Levulinic Acid Plus Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)-Based Sanitizer on Inactivation of Influenza A Virus on Eggshells. *Food Environ Virol.* 2013 Dec;5(4):215–9.
42. Chen D, Zhao T, Doyle MP. Control of pathogens in biofilms on the surface of stainless steel by levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate. *Int J Food Microbiol.* 2015 Aug 7;207:1–7.
43. Zhou Z, Zuber S, Cantergiani F, Butot S, Li D, Stroheker T, et al. Inactivation of viruses and bacteria on strawberries using a levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate based sanitizer, taking sensorial and chemical food safety aspects into account. *Int J Food Microbiol.* 2017 Sep 18;257:176–82.
44. Zhou M, Doyle MP, Chen D. Combination of levulinic acid and sodium dodecyl sulfate on inactivation of foodborne microorganisms: A review. Vol. 60, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Inc.; 2020. p. 2526–31.
45. Salazar JK, Tesfaldet B, Zamperlini M, Streufert R, Fay M, Keller SE. Desiccation Survival of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus faecium* Related to Initial Cell Level and Cellular Components. *J Food Prot.* 2022 Mar 1;85(3):398–405.