

### **Agradecimiento**

Primero que todo dedico este logro a Dios.

Agradezco a mi familia quienes son un pilar en mi vida un ejemplo de superación de cada día, a todas las personas cercanas compañeros y amigos que me han brindado su apoyo y su cariño.

A mis profesores de carrera especialmente al Dr. Heiner Rodríguez y al Dr. Hugo Leandro por su disponibilidad, amabilidad y sobre todo compartir sus conocimientos y ser una guía durante todo el proceso de mi trabajo de graduación.

Deseo que dios los bendiga enormemente.

**Agradecimiento**

### **Dedicatoria**

Dedico este logro a Dios por darme salud, paciencia, trabajo por bendecirme con la constancia y la determinación para no darme por vencido.

A mis padres Jorge Ramírez y Carolina Rodríguez por brindarme tanto apoyo y cariño por ser pilares fundamentales en mi vida, por siempre ser un hogar para mí.

Agradezco a mi novia Mariela Arce por siempre estar para mí, por ser ese motor y esa ayuda incondicional.

Agradezco a mis patronos, por muchas veces facilitarme permisos y brindarme días para asistir a clases.

~~Primero que todo dedico este logro a Dios.~~

~~Agradezco a mi familia quienes son un pilar en mi vida un ejemplo de superación de cada día, a todas las personas cercanas compañeros y amigos que me han brindado su apoyo y su cariño.~~

~~A mis profesores de carrera especialmente al Dr. Heiner Rodríguez y al Dr. Hugo Leandro por su disponibilidad, amabilidad y sobretodo compartir sus conocimientos y ser una guía durante todo el proceso de mi trabajo de graduación.~~

~~Deseo que dios los bendiga enormemente.~~

### **Dedicatoria**

~~Dedico este logro a Dios por darme salud, paciencia, trabajo por bendecirme con la constancia y la determinación para no darme por vencido.~~

~~A mis padres Jorge Ramírez y Carolina Rodríguez por brindarme tanto apoyo y cariño por ser pilares fundamentales en mi vida, por siempre ser un hogar para mí.~~

~~Agradezco a mi novia Mariela Arce por siempre estar para mí, por ser ese motor y esa ayuda incondicional.~~

~~Agradezco a mis patronos, por muchas veces facilitarme permisos y brindarme días para asistir a clases.~~

# UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS

## CARRERA DE FARMACIA

~~DESARROLLO DE UNA PREFORMULACIÓN DE UN FITOMEDICAMENTO A PARTIR DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (THYMUS VULGARIS) COMO COADYUVANTE EN EL TRATAMIENTO DE AFECCIONES BUCALES (AMIGDALITIS Y LARINGITIS)~~

**Con formato:** Fuente de párrafo predeter., Fuente: 12 pto, Sin Negrita

**DESARROLLO DE 3 FORMULACIONES A PARTIR DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (THYMUS VULGARIS) COMO COADYUVANTE EN EL TRATAMIENTO DE AFECCIONES BUCALES (AMIGDALITIS Y LARINGITIS BACTERIANAS)**

**Con formato:** Fuente de párrafo predeter., Fuente: 12 pto, Sin Negrita, Color de fuente: Negro, Español (Costa Rica), Borde: : (Sin borde), Contorno de texto

**JORGE RAMIREZ RODRIGUEZ**

**TUTOR**

**Dr. HUGO ALONSO LEANDRO ALPIZAR**

**SAN JOSÉ, COSTA RICA, DICIEMBRE 2020**

## Tabla de contenido

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b><i>xi</i></b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b><i>xiii</i></b>
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
Objetivo General .....	4
Objetivos Específicos .....	4
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>7</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>8</b>
Antecedentes Históricos .....	8
Antecedentes Internacionales.....	9
Antecedentes Nacionales.....	11
<b>PROYECCIONES</b> .....	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>14</b>
<i>Historia de los aceites esenciales</i> .....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Origen de los aceites esenciales .....	14
Aceite esencial .....	14
Características generales de los aceites esenciales.....	15
Flavonoides .....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Fuente: Revista mexicana de Ciencias Agrícolas (2012). .....	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Propiedades terapéuticas .....	15
Ecología de los aceites esenciales.....	15
Conservación de los aceites esenciales .....	16
<b>MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES</b> .....	<b>16</b>

Arrastre por vapor .....	16
Extracción con solventes.....	17
Extracción por prensado .....	¡Error! Marcador no definido.
Hidrodestilación .....	17
Características del disolvente de extracción .....	19
Hidrolatos .....	20
<b>Fitoterapia.....</b>	<b>27</b>
Planta medicinal.....	¡Error! Marcador no definido.
Fitofármacos .....	27
Fitofármacos y sus efectos terapéuticos .....	¡Error! Marcador no definido.
Droga vegetal .....	28
Metabolitos Primarios y Secundarios .....	¡Error! Marcador no definido.
Metabolitos secundarios .....	28
Principio activo.....	59
<b>TOMILLO (THYMUS VULGARIS L.).....</b>	<b>29</b>
Historia del Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> ).....	¡Error! Marcador no definido.
Descripción botánica .....	30
Taxonomía .....	31
Hábitat y suelo .....	31
Origen.....	32
Otros usos.....	¡Error! Marcador no definido.
<i>Thymus vulgaris</i> como droga vegetal.....	33
Farmacognosia .....	33
<b>COMPOSICIÓN QUÍMICA .....</b>	<b>34</b>
Composición cualitativa y cuantitativa de compuestos de <i>Thymus Vulgaris</i> .....	35
Timol.....	36
Carvacrol.....	40

<b>PROPIEDADES MEDICINALES DEL TOMILLO.....</b>	<b>44</b>
Actividad antifúngica y antibacteriana .....	44
Actividad Antiinflamatoria .....	45
Actividad antiespasmódica y expectorante.....	45
Actividad antiséptica .....	45
Otros Usos y Actividad biológica del tomillo .....	46
Análisis del aceite esencial de tomillo .....	34
Contraindicaciones .....	46
Efectos Secundarios.....	47
Toxicidad.....	¡Error! Marcador no definido.
Cavidad Oral.....	52
Rinofaringe .....	53
Orofaringe.....	53
Laringofaringe .....	53
Faringitis y la amigdalitis.....	54
Fisiopatología de la amigdalitis .....	54
Fisiopatología de la laringitis.....	54
Etiología y epidemiología de la faringoamigdalitis .....	54
Manifestaciones clínicas .....	55
Diagnóstico amigdalitis.....	56
Diagnostico laringitis .....	¡Error! Marcador no definido.
Tratamiento farmacológico.....	57
<i>Estudios de preformulación .....</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
Historia de la Preformulación.....	¡Error! Marcador no definido.
Preformulación.....	¡Error! Marcador no definido.
Desarrollo de Formulación.....	¡Error! Marcador no definido.
Soluciones farmacéuticas.....	¡Error! Marcador no definido.

Definición de Colutorio .....	¡Error! Marcador no definido.
Clasificación de algunos colutorios .....	¡Error! Marcador no definido.
Compuestos de amonio cuaternario.....	¡Error! Marcador no definido.
Fenoles y Aceites esenciales.....	¡Error! Marcador no definido.
Triclosan .....	¡Error! Marcador no definido.
Fluoruros.....	¡Error! Marcador no definido.
Enjuagues naturales .....	¡Error! Marcador no definido.
Composición de los colutorios.....	¡Error! Marcador no definido.
Composición de los colutorios.....	¡Error! Marcador no definido.
Características ideales de los colutorios .....	¡Error! Marcador no definido.
Excipientes .....	¡Error! Marcador no definido.
Farmacopea .....	¡Error! Marcador no definido.
Reacciones adversas .....	¡Error! Marcador no definido.
Reacción alérgica .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS .....</b>	<b>47</b>
Cromatografía de gases .....	47
Cromatografía de gases (Head Space).....	48
Cromatografía de capa fina .....	48
Espectroscopia del infrarrojo (NIR).....	48
Espectrofotometría infrarroja (IR) .....	50
<b><i>Streptococcus pyogenes</i> .....</b>	<b>57</b>
Antecedentes y características generales .....	57
<b>MICROBIOLOGÍA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....</b>	<b>32</b>
Agar chocolate .....	¡Error! Marcador no definido.
Agar sangre columbia CNA.....	34
Agar MacConkey .....	35
Agar Hektoen entérico (HE) .....	36

Método Kirby-Bauer .....	37
<b><i>CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO</i></b> .....	<b>39</b>
<b><i>ENFOQUE DE LA INVESTIGACIÓN</i></b> .....	<b>39</b>
<b><i>TIPO DE INVESTIGACIÓN</i></b> .....	<b>40</b>
<b><i>VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN</i></b> .....	<b>40</b>
Fase I. Adquisición de la materia vegetal .....	43
Fase II. Extracción del aceite esencial .....	43
Procedimiento del método de hidrodestilación .....	44
Fuente: Elaboración propia. ....	45
Concentración y recolección del aceite esencial.....	46
Fase III. Pruebas de identificación de compuestos .....	47
Cromatografía de gases (Head Space).....	48
Cromatografía de capa fina.....	50
Espectroscopia IR .....	52
Espectroscopia ultravioleta visible .....	53
Fase IV. Pruebas Microbiológicas .....	53
Procedimiento de la prueba microbiológica.....	54
Fase V. Preformulación del producto.....	55
Preformulación 1 .....	57
Preformulación 2 .....	58
Procedimiento.....	59
<b><i>CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS</i></b> .....	<b>84</b>
<b><i>Método de extracción</i></b> .....	<b>85</b>
<b><i>Promedio % de rendimiento</i></b> .....	<b>85</b>
<b><i>Hidrodestilación</i></b> .....	<b>85</b>
Cromatografía de gases (Head Space).....	87

Caracterización química mediante cromatografía de capa fina .....	92
<i>Espectroscopia IR</i> .....	94
UV-VISIBLE .....	97
Prueba de sensibilidad antibacteriana de los aceites esenciales de tomillo frente al <i>Streptococcus Pyogenes</i> .....	99
Preformulación.....	¡Error! Marcador no definido.
Elección de la forma farmacéutica y fórmula idónea .....	108
Elección y discusión sobre los excipientes utilizados .....	109
Preformulación 1 .....	109
Preformulación 2 .....	112
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES</b> .....	134
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	136
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	137
<b>ANEXOS</b> .....	145

### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura Química del Linalol .....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 2 Estructura Química del Limoneno .....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3 Estructura Química del Borneol.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 4 Estructura Química del P- cimeno .....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 5 Estructura Química del Y-terpieno .....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6. Estructura Química del Luteolina .....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 7. Estructura Química de la Apigenina .....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 8. Estructura Química de la Naringenina .....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 9. Estructura Química de Aromaticos .....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 10. Estructura Química Cafeico .....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 11 Estructura química del ácido Rosmarínico	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12. Tomillo.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 13. Estructura Química del Timol.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 14 Estructura química del Carvacrol.....	32

Figura 16 Cavidad Bucal. ....	37
Figura 17. Laringitis de la Cavidad Oral .....	40
Figura 18 Amigdalitis de la cavidad oral .....	52
Figura 19. S. Pyogenes .....	56
Figura 20. Agar sangre .....	56
Figura 21. Agar chocolate .....	58
Figura 22. Agar CNA .....	33
Figura 23. Agar Mac cConkey .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 24. Agar HE .....	35
Figura 25 Halo de inhibicion .....	36
Figura 26 Diferentes mediciones de halos de inhibicion.....	37
Figura 27 Proceso de hidrodestilacion .....	38
Figura 28. Recoleccion del hidrolato.....	39
Figura 29 Separacion de fases .....	45
Figura 30. Obtencion del aceite esencial mediante rotavapor. ....	45
Figura 31. Apariencia del extracto del aceite esencial .....	46
Figura 32 Viales y patron de aceite esencial de tomillo.....	46
Figura 33 Cromatografia de gases Head Space .....	49
Figura 34 Fase movil .....	49
Figura 35 Espectrofotometro Infrarrojo.....	94
Figura 36 Espectrofotometro Uv visible .....	97
Figura 37 .....	99
Figura 38 Equipo empleado para la elaboracion del colutorio antibacteriano .....	110
Figura 39. Caracterizaion quimica del tomillo extracto (Head Space) .....	125
Figura 40 Caracterizacion quimica del tomillo patron (Head Space). <b>¡Error! Marcador no</b>	

**definido.**

Figura 41. Placa de cromatografia patron vs extracto del aceite esencial de tomillo.	46
Figura 42. Espectro IR del patron de tomillo .....	46
Figura 43. Espectro IR del extracto de tomillo.....	49
Figura 44. ABS vs longitud de onda de patron de tomillo .....	49
Figura 45 Cepa S. Pyogenes .....	94
Figura 46 ATCC .....	97
Figura 47 Halos de inhibicion .....	99
Figura 48. Preformulación 1 .....	110

Figura 49 Preformulacion 2.....	125
Figura 50 Presentacion final de las preformulaciones. <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	

### ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades quimicas .....	37
Tabla 2. Diaolventes de extraccion con densidades mayores que el agua comunmente utilizadas.....	41
Tabla 3. Datos Fisicoquimicos del timol. ....	44
Tabla 4. Datos fisicoquimicos del carvacrol .....	44
Tabla 5. Informacion organolptica del <i>Tymus Vulgaris</i> .....	49
Tabla 6 Informacion fisicoquimica de <i>Tymus Vulgaris</i> .....	50
Tabla 7. Resumen monografia oficial Herba Thyme .....	48
Tabla 8 Resumen de la actividad farmacologica de Tymus Vulgarissegun la monografia oficial de la OMS .....	85
Tabla 9 Frecuencia aproximada donde se encuentra algunos grupos funcionales ....	93
Tabla 10. Resumen de los instrumentos de caracterizacion quimica .....	95
Tabla 11 Variables.....	100
Tabla 12 Cromatografia Head Space..... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Tabla 13 Condicioness cromatograficas para marcador. ....	100
Tabla 14 Porcentaje rendimiento..... <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
Tabla 15 Rf.....	100
Tabla 16 Grupos Funcionales y region optenida en el espectro IR delpatron de tomillo .....	100
Tabla 17 Grupos Funcionales y region optenida en el espectro IR del extracto de tomillo .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 18 Medida de los halos formados por diluciones del aceite esencial del tomillo sobre la cepa S. Pyogenes. ....	100

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Con formato: Justificado, Sangría: Primera línea: 0 cm

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con formato: Título 1

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2011) la medicina tradicional representa una parte trascendental de los servicios sanitarios a nivel mundial, y con frecuencia es subestimada en los servicios de salud, debido a que se les da prioridad a los medicamentos convencionales y costosos, sin considerar que la medicina alternativa es una forma de tratamiento natural, de bajo costo, y que trae múltiples beneficios para las personas que la consumen y utilizan en el tratamiento de las diversas patologías que las aquejan en su vida cotidiana.

Sin embargo, en la actualidad, la medicina tradicional está considerada, en el campo de la salud, como parte del enfoque intercultural que se fundamenta en los conocimientos tradicionales y en prácticas ancestrales, que permitan curar y prevenir diversas patologías en el proceso de salud y enfermedad. En este contexto, se establece que las plantas medicinales representan, a nivel mundial, un tesoro popular que ha sido utilizado desde tiempos muy remotos, donde la medicina alternativa y tradicional se encuentra ocupando un lugar preponderante en muchos países, el arte curativo de manera natural cumple con brindar el mínimo de riesgos para las personas que utilizan este tipo de tratamiento. (Braga, Sasso y Engelbertz, 2008).

Por ello, es conveniente mencionar que la medicina tradicional, desde una perspectiva teórica, es conceptualizada como la suma total de los conocimientos, destrezas, habilidades, capacidades y prácticas basadas en la aplicación de diversas teorías, experiencias y creencias propias de diversas culturas, y que son utilizadas para conservar el estado de salud, prevenir, diagnosticar, curar o tratar enfermedades biológicas, físicas y mentales. Dentro del conjunto de patologías que afectan a la población, un lugar preponderante lo ocupan las infecciones respiratorias agudas (IRAs) que en los últimos años se han constituido en uno de los principales problemas de salud en los niños menores de cinco años, representando una de las primeras causas de atención médica y de morbilidad infantil a nivel mundial (Engelbertz, 2010).

La Organización Mundial de Salud, en el año 2012, menciona que las enfermedades de la cavidad bucal son la cuarta causa más costosa de tratar. Costa Rica se encuentra entre uno de los países con mayor demanda de atención en los servicios básicos de emergencias. En países de altos

ingresos, la carga de la enfermedad oral se ha abordado, mediante la creación de avanzados servicios de salud bucodental, que ofrecen principalmente el tratamiento a los pacientes. La mayoría de los sistemas se basan en la demanda de atención recibida por los médicos privados. En la mayoría de los países de bajos y de ingresos medios, la inversión en el cuidado de la salud oral es baja, y los recursos se asignan principalmente a la atención oral de emergencia y alivio del dolor.

Las infecciones respiratorias superiores son más frecuentes en la población infantil, en los países desarrollados las infecciones en las vías respiratorias superiores agudas contabilizan el 20% de todas las consultas médicas, y el 75 % de todas las recetas de antibiótico. (Baugh, 2011). En el 2010, según datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), dichas infecciones representan del 30 al 50% de las consultas de pediatría, y del 20 al 40% de las hospitalizaciones. Se estima que, en la mayoría de los países, los niños menores de 5 años presentan de 4 a 8 episodios de infecciones por amigdalitis. (Valdés, Gómez y Báez, 2011).

Según reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), publicados en el 2017, se estima que en la actualidad las IRAs provocan el deceso de más de 6,6 millones de niños anualmente. Por su parte, según datos estadísticos presentados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en el año 2015, las infecciones respiratorias agudas representaron la primera causa de morbilidad en la población infantil de América Latina, siendo los dolores de garganta como uno de los síntomas de laringitis y amigdalitis en un 37% en niños, y en adultos entre un 5% y un 15%.

Las enfermedades de la cavidad oral tienen alta prevalencia en la población infantil, por lo que su estudio ha llamado la atención de muchos especialistas en el campo de la salud, para mejorar sus síntomas y para darles una mejor calidad de vida a las personas que lo padecen, también muchos especialistas apuntan a la importancia de crear conciencia en el uso desmedido de antibióticos que generan, razón por lo cual, sugieren el uso de antibióticos naturales, para tratar dichas patologías. (Úbeda, Murcia, García, Asensi y Manzó, 2013).

Muchos de los tratamientos en estas patologías representan mucho gasto para las mismas familias de los pacientes por lo que es de suma importancia buscar alternativas que complementen el tratamiento de los medicamentos convencionales, razón por la cual la medicina natural es una buena opción, ya que no solo ayuda en el cuidado y curación de los problemas de salud, sino también a la presencia de evidencia científica comprobada respecto a su seguridad eficacia, y

efectividad, fundamentalmente por ser productos naturales, que por su misma condición y naturaleza biológica, ya que producen menos efectos adversos que los medicamentos convencionales. (Newary, Shaffie y Omer, 2017).

Por lo tanto, nacen algunas interrogantes como: ¿El aceite esencial del tomillo podría ser utilizado~~s~~ como inmunoestimulador? ~~¿-del sistema inmune?-~~ ¿Podría una formulación de aceite esencial de tomillo ~~ser~~ una nueva opción terapéutica para tratar enfermedades del tracto respiratorio?, ¿Podrían el uso de hierbas medicinales mejorar el efecto del tratamiento convencional si se administran juntos?, ¿De qué manera mejorarían la calidad de vida del paciente si utiliza aceite esencial de tomillo como profilaxis?

Por consiguiente, se plantea la siguiente pregunta central:

¿Un colutorio a base de aceite esencial de tomillo puede usarse como coadyuvante para el tratamiento de enfermedades de la cavidad oral como la laringitis y la amigdalitis bacterianas?

## OBJETIVOS

### Objetivo General

- 1. Desarrollar tres ~~pre~~formulaciones en forma de colutorio a base de aceite esencial de tomillo para tratar afecciones de la cavidad oral como la laringitis y la amigdalitis bacteriana.

### Objetivos Específicos

1. Extraer el aceite esencial de tomillo a partir de las partes aéreas de las plantas mediante la técnica de hidrodestilación.
2. Determinar las características químicas del aceite esencial de tomillo mediante el uso de UV visible, cromatografía de capa fina, y de gases, con el fin de obtener una cuantificación relativa que permita la identificación de los componentes de la droga vegetal ~~seleccionar el diseño para la preformulación de aceite esencial de tomillo.~~
3. Proponer 3 formulaciones con base en excipientes que garanticen la calidad del producto, las propiedades organolépticas, fisicoquímicas y la eficacia antibacteriana de estos.

Con formato: Normal, Con viñetas + Nivel: 1 +  
Alineación: 1,27 cm + Sangría: 1,9 cm

## JUSTIFICACIÓN

A través de los años ha existido un avance positivo y de gran magnitud en el campo de la salud, ha habido más investigaciones acerca de enfermedades y de sus tratamientos, se ha descubierto el uso de medicamentos naturales que tienen una acción sobre el organismo, conocida como acción principal, que además puede tener otros efectos adicionales, que coexisten y pueden o no estar relacionados, y que pueden ser indeseables o beneficiosos para el tratamiento de múltiples patologías. Lo maravilloso de la medicina natural, radica en el poderoso efecto de sinergismo por potenciación, que se produce al mezclar varios medicamentos naturales para tratar una sola patología, y la cantidad mínima de efectos secundarios que estos producen. (Castañeda, Muñoz y Martínez, 2017).

Aunque a menudo los efectos nocivos de las sustancias sintéticas no son extrapolables a la especie humana, los consumidores perciben que las sustancias naturales son más inocuas que las sintéticas y, por ello, las prefieren. Ante esto, varias investigaciones están buscando, en las fuentes naturales, nuevas sustancias con propiedades beneficiosas para la salud, que puedan reemplazar a los productos sintéticos comúnmente utilizados, claro está, después de un estudio exhaustivo de sus propiedades fisicoquímicas y toxicológicas. (Tafurt, Martínez y Stashenko, 2005).

En los países en desarrollo como Costa Rica, una parte de la población no tiene acceso a medicamentos industrializados, constituyendo, por esta razón, el uso de medicamentos naturales, incluidos aceites esenciales, como el único recurso terapéutico disponible para la población más pobre en estos países, además, dichos medicamentos son consumidos por recomendación de personas, por lo general creyentes de la medicina oriental, (Dhatapin, 2010).

Las plantas aromáticas, como el tomillo, han sido utilizadas durante siglos en perfumería, alimentos y medicamentos; en la vida culinaria se utilizan de forma seca como condimentos y especias, además, en industria se utilizan como aromatizantes en productos de higiene como jabones y cremas, también en componentes de formulaciones veterinarias y farmacéuticas, y como antimicrobianos, repelentes, insecticidas y antifúngicos, por lo tanto, es importante investigar la extracción de aceites esenciales y su aplicación en diferentes productos comerciales. (Sharapin, 2010).

No se debe olvidar que los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas, los principios activos se hallan

siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades. (Estrada, 2011).

Las hojas de tomillo se utilizan para dar sabor a los alimentos como condimento. Desde la Antigüedad, el tomillo se ha utilizado en la medicina popular para múltiples condiciones médicas. Este se ha utilizado como antiespasmódico, ya que favorece la eliminación de mucosidades del tracto intestinal, sirve para tratar la indigestión, incrementar la secreción de bilis, combatir parásitos intestinales y facilitar los procesos digestivos, también funciona en el alivio de trastornos respiratorios. A su vez, tiene propiedades desinfectantes, antisépticas y cicatrizantes, que lo vuelven útil para tratar heridas. (Romeu, Botta y Diaz, 2007).

El conocer acerca de posibles tratamientos no convencionales tiene un alto impacto en la sociedad, ya que muchos de estos tratamientos se podrían llegar a utilizar como profilaxis y, como es el caso de las enfermedades de la cavidad oral, como lo son la faringitis y la amigdalitis, ya que podrían evitar el rápido progreso de estas, e incluso mejorar considerablemente los síntomas de las mismas, para mejorar la calidad de vida del paciente. (Breysen, 2010).

Las preparaciones farmacéuticas con base en productos naturales han despertado el interés de muchos profesionales en el campo de la salud en los últimos años, basando su interés en los múltiples mecanismos de acción que poseen los principios activos de las hierbas medicinales en el organismo de las personas, realizando investigaciones para lograr combinar dichos principios activos con moléculas sintéticas para el desarrollo de nuevos fármacos en la industria farmacéutica. (Meléndez, Pino y Stashenko 2010).

También se ha demostrado el bajo porcentaje de efectos secundarios que los principios activos de plantas naturales poseen, razón por la cual la industria farmacéutica ha centrado su atención en combinar la droga vegetal con la droga sintética, para, de esta forma, crear moléculas nuevas que generen avances significativos en tema de salud pública. Por sus múltiples aplicaciones, el tomillo es una planta que debe ser investigada para corroborar las múltiples aplicaciones que se le achacan, y descubrir otras que aún no se han descubierto. (Newary, Shaffie y Omer, 2017).

El conocer acerca de los posibles efectos del aceite esencial de tomillo despierta la curiosidad de investigar más, y poder utilizarlos en el tratamiento de otras enfermedades, como lo son la Cándida, por sus propiedades antifúngicas y antibacterianas, el tratamiento del herpes virus por su acción antiviral, y cuadros gripales por ser un potente estimulador del sistema inmunológico. (Santana, Cabrera y González, 2012). Así mismo, permite investigar sus efectos en cánceres, por ser un potente antioxidante, eczema de la piel, al tener propiedades antiinflamatorias, o, infección por *Helicobacter pylori*, salud urinaria y vaginal, halitosis y enfermedades del hígado, por mencionar algunas enfermedades. (Martinelli y Pamparo, 2005).

Según Reyes, Saavedra, Zúñiga y Salguero (2014) mencionan:

Se ha demostrado que el aceite de *Thymus vulgaris* muestra actividad antifúngica y antimicrobiana, por su componente mayoritario que es el 1,8-cineol en un 21.5%, seguido del B-pineno con el 20% y el o-cimeno con un 17.9%, variando su composición de acuerdo con el genotipo, localización geográfica, periodo de cosecha y método de extracción. Diversos estudios demuestran su acción contra *Streptococcus pyogenes* que causa la amigdalitis.

El aceite esencial de tomillo podría ser utilizados para el tratamiento profiláctico, no solo de enfermedades de la cavidad bucal, sino también para muchas patologías que no tienen relación con padecimientos de cuadros respiratorios, ya que este aceite regula muchas funciones biológicas y metabólicas, y aunque muchas de estas investigaciones están en proceso, no cabe duda de que estos representan una muy buena opción terapéutica para las distintas poblaciones. (Sánchez, 2012).

### **HIPÓTESIS**

¿Las formulaciones a desarrollar poseen actividad antibacteriana capaz de inhibir el crecimiento del *Streptococcus Pyogenes*?

## ANTECEDENTES

### Antecedentes Históricos

Según Santamaría Hernández (2011), desde la Antigüedad hasta el presente, exponentes de la flora han sido utilizados en función del tratamiento y erradicación de múltiples enfermedades que han aquejado a los seres humanos, todo ello, a partir de sus comprobadas propiedades curativas. Se consideraron el tomillo y el romero por su efectividad en colutorios, sobre todo ante la faringoamigdalitis y los resultados de estudios con base en las propiedades antimicrobianas frente a microorganismos anaerobios, respectivamente. Y con base en Partiendo de ahí, y de las concentraciones empleadas en dichos estudios, se desestimó la posibilidad real de obtención de un compuesto que sirviese como medicina alternativa.

**Con formato:** Sin Resaltar

**Con formato:** Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro, Borde: : (Sin borde), Contorno de texto

Según Cruz Suárez (2012), indica que el poder curativo de una especie medicinal viene dado por uno o más componentes que se encuentran en esa parte de la planta, los yerberos le llaman “sustancia” o “alma de la planta”. Científicamente, se denomina “principio activo” a la sustancia responsable de la actividad farmacológica o medicinal. Cruz Suárez indica que las primeras referencias históricas al tomillo se remontan al Antiguo Egipto, donde era empleado como ungüento en embalsamamientos y quemado como purificador del aire durante las epidemias. No obstante, las propiedades medicinales de esta planta eran conocidas también por el pueblo griego, utilizándolo como antiséptico o contra los dolores articulares, según escritos del médico y filósofo Galeno.

Según el libro “Los grandes remedios naturales”, entre las primeras referencias históricas, Plinio el Viejo, en su historia natural, relata las excelencias de la mezcla compuesta por miel y aceite de tomillo, ya que estos productos naturales protegen las vías respiratorias, en el catarro común, en la tos bronquial, facilitan la expectoración y calman la irritación de la garganta, faringitis y laringitis.

Según Buechi y Vogelin (2005) mencionan que la esencia del tomillo, fundamentalmente por sus componentes fenólicos, timol y carvacrol, tiene una actividad antibacteriana frente a los gérmenes. Este efecto es debido a su acción sobre la membrana bacteriana. La eliminación del timol y carvacrol por vía respiratoria produce una actividad antiséptica respiratoria. Por su actividad antibacteriana, el tomillo también tiene interés como antiséptico urinario y de la cavidad bucofaringea, así como para el lavado de heridas. Además, el timol y el carvacrol tienen una acción antimicótica, efectiva frente a distintos tipos de hongos en las mucosas.

Cuenta Stranburger (2010) que antes de que fuese considerada una planta medicinal, el tomillo sobresalía solo por su carácter aromático. En la antigua Roma se aprovechaba para perfumar quesos y vinos. Indagaciones llevadas a cabo por López (2006) y Gerdens (2010) han constatado que su nombre genérico, *Thymus*, proviene del vocablo thymon, con el cual los griegos reconocieron a esta planta. A juicio del autor, podría derivar a su vez de la palabra thyein, cuyo significado es “aroma, olor”, en alusión directa a una de las características más distintivas de la especie. Su potencial medicinal se remite al mismo Egipto, donde argumenta que dicha civilización notó bien pronto sus beneficios, de modo que no solo devino parte de los rituales, sino que también se aplicó en la momificación, al embalsamar los cuerpos de los ciudadanos fallecidos. En el presente, su uso va más allá de la cocina o la belleza. En virtud de las tantas otras propiedades que se le atribuyen, despunta por el aporte a la salud del hombre.

Según Estrada y Guagua, (2005) desde hace muchos años, la medicina tradicional o complementaria se ha constituido en una parte fundamental de la atención sanitaria en la mayoría de los países del mundo, que ha ido avanzando de acuerdo con la evolución de los pueblos, y que se presenta como producto de muchos siglos de experiencia, y que han sido transmitidos ancestralmente, de generación en generación, hasta la actualidad. En este contexto, se resalta que el tratamiento alternativo, mediante el uso de plantas medicinales, representa una forma costumbrista de medicina tradicional, debido a que existen suficientes evidencias científicas y empíricas que garantizan las propiedades beneficiosas y curativas de las plantas medicinales en el tratamiento de las diversas patologías, tanto crónicas como leves, y por ende, su amplio uso se atribuye a su fácil accesibilidad y asequibilidad, constituyéndose muchas veces en la única fuente que tienen para su atención sanitaria las personas con menores recursos económicos.

#### **Antecedentes Internacionales**

En la revista española “Fitoterapia ámbito farmacéutico” los autores Cañigüeral, Vanoclocha y Bruneton (2000) publicaron un estudio titulado “Eficacia del tomillo”, ellos discuten cómo, a pesar de ser una planta medicinal de amplio uso tradicional, son pocos los estudios clínicos publicados sobre su eficacia terapéutica, tanto de los extractos como del aceite esencial. Dichos autores comentan la actividad antiséptica y antiinflamatoria que presenta el tomillo, donde recomiendan el uso de este en enfermedades de la cavidad bucal, como aftas y piorrea; también mencionan que para estos casos se pueden usar colutorios con infusión de tomillo, o con el extracto

fluido diluido al 50%; también dictan que puede aplicarse puro en formas de toques o pinceladas en gargarismos para tratar la faringitis y la amigdalitis.

Los autores Fuentes, León y Matiz (2015) dentro de un estudio clínico sobre las actividades biológicas y organolépticas de los aceites esenciales, realizado en Colombia, llamado “Microencapsulación de aceite esencial de tomillo (*thymus vulgaris*) en matrices poliméricas de almidón de ñame”, discuten cómo su empleo suele verse limitado por su alta volatilidad y tendencia a degradarse, y proponen que la microencapsulación es una estrategia válida para superar estos inconvenientes. En dicho trabajo se empleó almidón de ñame, el cual fue sometido a procesos de hidrólisis y lipofilización, esto incrementó significativamente la capacidad captadora de aceite y emulsificante del almidón nativo, el cual se empleó para microencapsular el aceite esencial de tomillo, que en estudios previos demostró potente actividad antibacteriana en las cepas que producen la amigdalitis.

Por lo tanto, dentro del estudio clínico, los autores señalaron la importancia de realizar la microencapsulación por medio de la microparticulación lipídica sólida, seguida de emulsificación, donde esta técnica presenta una eficiencia superior al 98%, y el producto obtenido, desafiado en diversas pruebas, demostró capacidad de retener más del 90% del aceite esencial en condiciones de evaporación, evitando su oxidación y el cambio en su perfil de composición. Finalmente, las microcápsulas de aceites esenciales de tomillo, al ponerse en contacto con las bacterias de la amigdalitis, mantuvieron su actividad bactericida. Los resultados de este trabajo aportan al desarrollo de formulaciones farmacéuticas, cosméticas y alimentarias estables y funcionales de aceites esenciales, al protegerlos de la evaporación y degradación. (Salcedo, 2006)

Dentro de un estudio clínico sobre el tomillo realizado en México, llamado “Eficacia antiinflamatoria del aceite esencial del tomillo (*Thymus vulgaris*)”, los autores los autores Castro et al. (2006) midieron la eficacia antiinflamatoria de los extractos de tomillo, donde este se ha verificado en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo*, concluyeron que el aceite esencial de tomillo, por su componente carvacrol, inhibe la biosíntesis de prostaglandinas. Por su parte, el timol se comporta como un inhibidor de la liberación de elastasa de neutrófilos, por lo que podría ser útil en los procesos inflamatorios que se producen en algunas infecciones. Este compuesto es, además, antiinflamatorio tópico. También, observaron otros componentes del extracto, como el ácido rosmarínico y una arabino-galactana, donde determinaron que poseen actividad antiinflamatoria.

Solano, Alvares y Arellano (2006), dentro de un estudio clínico sobre el crecimiento *in vitro* de *Streptococcus pyogenes*  $\beta$ -hemolítico del grupo A, realizado en México, llamado “Efecto del aceite esencial de los extractos acuoso y etanólico de *Thymus vulgaris L*”, proponen un tratamiento alternativo de bajo costo, para conocer la efectividad del tomillo *Thymus vulgaris* sobre la faringoamigdalitis bacteriana. Al aceite esencial obtenido por destilación, extracto etanólico e infusión de tomillo, se les evaluó su actividad biológica sobre el crecimiento de *Streptococcus pyogenes*  $\beta$ -hemolítico del grupo A de Lancefield, principal causante de la faringoamigdalitis.

Por consiguiente, a dicho estudio se le realizaron pruebas de sensibilidad y se midieron las zonas de inhibición *in vitro*. El aceite esencial destilado, registró el mayor halo de inhibición (3.2 cm), incluso superó a la penicilina (2.4 cm). Con el extracto etanólico, la inhibición fue menor y con la infusión no hubo inhibición. El aceite esencial y el extracto etanólico fueron analizados por medio de cromatografía en capa fina y cromatografía de gases, para determinar su concentración y pureza, en comparación con el aceite esencial puro de tomillo, obteniéndose la presencia de timol y en menor grado carvacrol, agentes activos que producen inhibición en el crecimiento bacteriano.

Bermúdez, Oliveira, y Velásquez (2015) en su trabajo titulado “La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales. Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales”, exponen que, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, más del 80% de la población mundial, especialmente en los países en desarrollo, utiliza tratamientos tradicionales a base de plantas, pues estas constituyen un recurso valioso para sus necesidades de atención primaria de salud, y también en el aspecto económico. No obstante, en esos países ha ocurrido una pérdida importante del conocimiento tradicional sobre el uso de plantas medicinales, transmitido de padres a hijos y, además, su disponibilidad se ha visto reducida por la degradación de los ambientes naturales. Por esa razón, es necesario hacer esfuerzos para evitar la pérdida definitiva de esos conocimientos, tanto para preservar la herencia cultural como para continuar con el registro de información de nuevas fuentes vegetales de medicamentos.

### **Antecedentes Nacionales**

En el caso de los antecedentes nacionales, se encuentran tres investigaciones, las cuales se relacionan con el tema de estudio.

En el año 2013, en la Universidad de Costa Rica, se realizaron dos investigaciones en torno a las diferentes plantas que el folclore popular considera poseen propiedades medicinales, en las

cuales se hizo un estudio con las plantas de guízaró y juanilama, donde ambas presentaron una actividad antimicrobiana mínima. En una segunda etapa del trabajo de investigación, en el año 2014, se utilizaron alternativas no tradicionales para el control de afecciones bucales; se trabajó una muestra de macadamia y tomillo. Se concluyó que el extracto de macadamia no presenta propiedades como desinfectante de cavidades orales, por otro lado, el extracto de tomillo resultó tener una alta capacidad antimicrobiana, a diferencia de las otras plantas. Por ende, se concluyó que el aceite esencial de tomillo es la hierba que presenta mayor capacidad antimicrobiana, que sirve como desinfectante de la cavidad oral.

En el 2016, en la Universidad de Costa Rica, se realizó una investigación científica nombrada “Evaluación de las condiciones experimentales para la extracción de aceite esencial de romero y tomillo para su uso como antioxidante en aceites comerciales”, donde determinaron las diferentes técnicas de extracción de los aceites esenciales. Dicha investigación logró determinar las características antioxidantes que poseen dichas hierbas y cómo el uso de diferentes métodos de extracción favorece el estudio de las características químicas de estas plantas, en dicho estudio se concluyó la importancia de que una hierba posee actividad antioxidante, ya que estas características evitan los radicales libres que dañan las células.

García y García (2014) estudiaron de forma experimental la actividad antimicrobiana del tomillo, donde realizaron una propuesta de formulación que actúa a nivel de la piel, esta tesis fue realizada en la Universidad de Iberoamérica, la cual estudió experimentalmente la actividad antimicrobiana del aceite esencial del tomillo contra sepas de *Salmonella typhimurium*, *pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella pneumoniae* y *staphylococcus aureus*. Este trabajo demostró la funcionalidad antimicrobiana del aceite esencial contra los microorganismos antes mencionadas, lo cual refleja la importancia para el trabajo de investigación.

### **PROYECCIONES**

Esta investigación va dirigida al desarrollo de 3 colutorios a base del aceite esencial de tomillo, que cumplan con estándares altos de calidad, donde cumpla con las normas establecidas por el RTCA para soluciones farmacéuticas.

Mediante la caracterización química del aceite esencial de tomillo empleando la técnica de cromatografía de gases, cromatografía de capa fina y espectrometría UV se pretende obtener una cuantificación relativa de los componentes característicos de la droga vegetal, también mediante el uso de la cromatografía de gases (Head Space) se pretende identificar el PA (aceite esencial de tomillo) en las formulaciones a desarrollar, también se pretende medir el porcentaje de alcohol en una de las formulaciones.

Se busca desarrollar colutorios que cumplan con atributos críticos de calidad tanto en las propiedades organolépticas como en las fisicoquímicas, para esto se pretende consultar la USP específicamente capítulos generales para verificar si existen pruebas de calidad para emplear en colutorios.

Para este trabajo de investigación se requiere elaborar un análisis de riesgo de procesos y un plan de mitigación de estos riesgos, para de esta forma garantizar altos estándares de eficacia y seguridad al paciente.

Se pretende medir la actividad antibacteriana del aceite esencial de tomillo en las formulaciones a desarrollar, para esto se pretende aplicar diluciones de estas en placas que contengan el microorganismo de estudio y observar la formación de halos de inhibición.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### Origen de los aceites esenciales

Los aceites esenciales provienen de las plantas de todo el mundo, específicamente de las regiones cálidas, ya que la mayoría de ellas necesitan mucho sol y calor. Estos se forman en las vesículas oleosas y se acumulan en diversos tejidos y órganos de las plantas, semillas, tejido leñoso, raíces, piel de los frutos, hojas, flores e inclusive en toda la planta, más la composición puede o no ser diferente, tal como es el caso de las flores del naranjo, mejor conocidas como azahar, que contienen sustancias muy diferentes a las que se encuentran en la esencia de las naranjas. Algunos aceites esenciales se encuentran en la planta en forma de precursores no volátiles, frecuentemente glicósidos, la descomposición es enzimática o en medio ácido diluido. (Werner, 2006).

### Aceite esencial

Los aceites esenciales son una mezcla compleja de sustancias aromáticas responsable de las fragancias de las flores. Se caracterizan por poseer numerosas acciones farmacológicas, por lo que constituyen la base de la aromaterapia, pero además son ampliamente utilizados en perfumería y cosmética, en la industria farmacéutica y en la industria de la alimentación. Son productos que contienen los principios volátiles de los vegetales que se extraen de diferentes partes de las plantas, también se puede decir que es una mezcla de varias sustancias químicas donde son biosintetizadas por las plantas. (Edris, 2007).

Dichos aceites son sistemas naturales, complejos y multicomponentes compuestos principalmente de terpenos, además de algunos otros componentes no terpenos, también son metabolitos secundarios de las plantas, por lo que un metabolismo más activo puede asociarse con una mayor producción de aceites. En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados. (Arcilla y Loarca et al., 2004).

La Comisión Nacional Forestal (2005) define a los aceites esenciales como: "productos obtenidos a partir de una materia prima vegetal, por arrastre con vapor, o por procedimientos mecánicos a partir del epicarpio de los citrus, incluso por destilación seca". El aceite esencial se separa posteriormente de la fase acuosa por procedimientos físicos en los dos primeros modos de obtención, puede sufrir tratamientos físicos que no originen cambios significativos en su composición. Esta definición establece claramente las diferencias que existen entre los aceites

esenciales oficinales y otras sustancias aromáticas, empleadas en farmacia y perfumería, conocidas vulgarmente como esencias.

### **Características generales de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales, en general, constituyen del 0.1 al 1% del peso seco de la planta. Son líquidos con escasa solubilidad en agua, solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos. Cuando están frescos, a temperatura ambiente, son incoloros, ya que al oxidarse se resinifican y toman un color amarillento oscuro, lo que se previene depositándolos en recipientes de vidrio de color ambar, totalmente llenos y cerrados. La mayoría de los aceites son menos densos que el agua. Cabe destacar que los aceites esenciales son mezclas de un número variable de sustancias orgánicas con olores, también son el resultado de complejos procesos bioquímicos que se desarrollan en las plantas, principalmente en las glándulas secretoras estas estructuras se encuentran en todos los órganos vegetales, tales como flores, semillas, raíces, entre otros. (Toledo, 2005).

### **Propiedades terapéuticas**

Las propiedades de los aceites esenciales son muy variables, esto se debe a la heterogeneidad de sus componentes. Algunas de las moléculas presentes en los aceites esenciales de ciertas plantas poseen gran interés terapéutico, lo que ha dado origen a la aromaterapia. Algunas de estas acciones, por sus efectos sobre la piel, han encontrado también su aplicación en cosmética. Por otro lado, desde el punto de vista toxicológico, los aceites esenciales son potencialmente tóxicos, a pesar de estar considerados en el ámbito popular como productos naturales poco peligrosos, ya que fácilmente puede darse una sobredosificación, incluso con aceites esenciales de plantas que en sí mismas son muy poco tóxicas. Por otro lado, algunos muestran una toxicidad específica por tener componentes que atraviesan la barrera hematoencefálica y que afectan al sistema nervioso central, como ocurre con la tuyona, que abunda en las esencias de ajeno, tuya y salvia. (López, 2004).

### **Ecología de los aceites esenciales**

De acuerdo con la función ecológica de los aceites esenciales, existen estudios que afirman que los aceites esenciales intervienen como hormonas en la polinización, es decir, sirven de atrayente de insectos, regulan la transpiración y son productos de desecho metabólico. Se asegura también que los aceites esenciales protegen a las plantas de posibles enfermedades causadas por

hongos o bacterias. Además de luz y nutrientes, una planta necesita protección y autocuración, proporcionadas de forma natural por los aceites esenciales. (Werner, 2006).

### **Conservación de los aceites esenciales**

Los aceites esenciales se pueden deteriorar por medio de reacción de oxidación, polimerización o hidrólisis de ésteres, estas reacciones pueden ser causadas por aumento de temperatura, presencia de oxígeno, altos porcentajes de humedad y de luminosidad. El hierro es otro factor que causa deterioro, ya que este actúa como catalizador de varias reacciones de descomposición. Es por esta razón, que todos los aceites esenciales deben ser tratados antes de ser almacenados, donde se deben remover impurezas metálicas, humedad y materia suspendida. Los envases deben quedar completamente llenos, ser ubicados en un lugar fresco y protegidos de la luz. (Santa Cruz, 2005).

### **MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES**

Los aceites esenciales se pueden obtener por distintos métodos, entre los cuales están los siguientes:

#### **Arrastre por vapor**

Este proceso se lleva a cabo con vapor caliente, este atraviesa la materia vegetal a presión donde la presión rompe las células de la planta y arrastra los volátiles que se condensan al atravesar el medio refrigerante que es el condensador. Esto se logra mediante la inyección de vapor de agua directamente en el seno de la mezcla, pero la principal función no es la de solo arrastrar los compuestos volátiles, sino que se condensa y forma una fase inmisible que cede calor a la mezcla a destilar. En este proceso se tiene la presencia de dos fases inmiscibles a lo largo del condensador, una acuosa y otra orgánica. La condición más importante para que este proceso se lleve a cabo es que el componente volátil sea insoluble en agua, para que el producto destilado forme dos fases al condensarse. (Stashenko, 2009).

En la destilación por arrastre de vapor, los factores como el tamaño de partícula del material vegetal, el factor de empaquetamiento y el tiempo de extracción influyen en la composición y rendimiento de los aceites obtenidos. Al estudiar el efecto del tamaño de partícula y el tiempo de extracción en el rendimiento del aceite esencial, se ha observado un mayor rendimiento cuando se trabaja con menores tamaños de partículas y tiempos de extracción prolongados. (Arango, Hurtado, Castillo y Santacruz, 2009).

En este método se emplea vapor húmedo proveniente de agua en ebullición, que traspasa el material suspendido encima, y apoyado sobre una malla, se puede utilizar para hojas, tallos, y raíces. Al trabajar cerca de los 100 °C el rendimiento es bueno, al cargarse el material a una temperatura menor a la de trabajo, se producen condensaciones sobre él, y esta humedad origina cierta dificultad en la operación, especialmente en el paso y distribución del vapor por la muestra. Por su sencillez, bajo costo y rendimientos, esta técnica es la más usada en la industria de aceites esenciales. Donde varias farmacéuticas la recomiendan como el método óptimo de obtención de esencias. (Stashenko, 2009).

#### **Extracción con solventes**

Es un método en donde se emplea el calor, este se utiliza empleando solventes con puntos de ebullición bajo, para evitar la degradación de la muestra. Es preferible usarla para obtener los extractos crudos de las plantas. El material previamente debe de ser molido, macerado o picado, para permitir mayor área de contacto entre el sólido y el solvente. Para el proceso, se debe buscar que el sólido, el líquido, o ambos, estén en movimiento continuo (agitación), para lograr mejor eficiencia en la operación. Este se realiza preferiblemente a temperatura y presión ambientes. Los solventes más empleados son: etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo, no se usan clorados ni benceno por su peligrosidad a la salud. Los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados. (Peredo et al., 2009).

#### **Hidrodestilación**

Este es el método utilizado en el presente trabajo, el cual es uno de los métodos más sencillos, donde se aprovecha la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado de vapor de asociarse con moléculas de aceite esencial a partir del material vegetal lo más fresco posible, si un líquido orgánico es insoluble en agua y tiene una presión de vapor apreciable a la temperatura de ebullición de aquella, puede destilarse arrastrándolo con vapor de agua. Este método permite la máxima difusión del vapor a través del material vegetal, reduciendo los daños que pudiesen sufrir los componentes de las esencias extraídos de otros métodos. Los aceites esenciales son sustancias volátiles e insolubles en agua por lo que pueden ser arrastrados por una corriente de agua. (Lamarque et al., 2008, pp. 49-50).

Tabla 1. Resumen tipos de extracción

Extracción con solvente

Es un método en caliente, que se utiliza empleando solventes con puntos de ebullición bajo, para evitar la degradación de la muestra. Es preferible usarla para obtener los extractos crudos de las plantas

Arrastre por vapor

Dicho proceso se lleva a cabo con vapor caliente que atraviesa la materia vegetal a presión; la presión rompe las células de la planta y arrastra los volátiles que se condensan al atravesar el medio refrigerante.

Hidrodestilación

Este método permite la máxima difusión del vapor a través del material vegetal, reduciendo los daños que pudiesen sufrir los componentes de las esencias extraídos de otros métodos.

Fuente: (Elaboración propia, 2020)

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Primera línea: 0 cm

Características del disolvente de extracción

Según Wankat, 2008 la extracción de un componente en específico de una mezcla disuelta en un determinado disolvente se puede conseguir añadiendo otro disolvente que cumpla las siguientes condiciones:

- Que no sea miscible en el otro disolvente.
- Que el compuesto de interés sea más soluble en el otro disolvente que en original.
- Que las impurezas no sean solubles en el disolvente de extracción.
- Que no sea tóxico e inflamable.

Tabla 2. Algunos disolventes orgánicos Propiedades químicas

<u>Nombre</u>	<u>Formula</u>	<u>Densidad (g/</u> <u>ml)</u>	<u>Punto de ebullición</u> <u>(°C)</u>
<u>Éter dietílico</u>	<u>(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>O</u>	<u>0,7</u>	<u>35</u>
<u>Hexano</u>	<u>C<sub>6</sub>H<sub>14</sub></u>	<u>≈ 0,7</u>	<u>&gt; 60</u>
<u>Benceno</u>	<u>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub></u>	<u>0,9</u>	<u>80</u>
<u>Tolueno</u>	<u>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub></u>	<u>0,9</u>	<u>111</u>
<u>Acetato de etilo</u>	<u>CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></u>	<u>0,9</u>	<u>78</u>

Fuente: (Elaboración propia, tomado de Pasto y Johnson 2003).

**Tabla 3. Disolventes de extracción con densidades mayores que el agua comúnmente utilizados.**

<u>Nombre</u>	<u>Fórmula</u>	<u>Densidad</u> (g/mL)	<u>Punto de</u> <u>ebullición (°C)</u>	<u>Peligrosidad</u>
<u>Diclorometano</u>	<u>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></u>	<u>1.3</u>	<u>41</u>	<u>Tóxico</u>
<u>Cloroformo</u>	<u>CHCl<sub>3</sub></u>	<u>1.5</u>	<u>61</u>	<u>Toxico</u>
<u>Tetracloruro</u> <u>de carbono</u>	<u>CCl<sub>4</sub></u>	<u>1.6</u>	<u>77</u>	<u>Toxico</u>

Fuente: (Elaboración propia, 2020)

### Hidrolatos

El hidrolato es el agua que se recoge al finalizar un proceso de destilación. En ella queda retenida, de una forma totalmente natural, una pequeña cantidad de aceite esencial, así como metales, mucílagos y oligoelementos. Debido a esto, algunos de estos hidrolatos poseen propiedades terapéuticas interesantes. El hidrolato es el agua residual que se forma por condensación del vapor que ha atravesado la materia vegetal, durante el proceso de obtención de un aceite esencial por destilación por arrastre de vapor. Se le llama hidrolato por el color blanquecino que tiene antes de la decantación, este contiene alrededor del 0.1% de las moléculas hidrosolubles del aceite esencial, también contiene la fracción molecular hidrosoluble de la planta, información. (Ratajc, 2018).

El hidrolato no presenta necesariamente las mismas propiedades atribuidas al aceite esencial, y siempre su actividad será menor; sin embargo, queda mucho por descubrir, pues los hidrolatos no se están estudiando, ni tampoco se utilizan a gran escala a nivel terapéutico. (Ratajc, 2018).

Para hablar de la cavidad oral, primero se debe describir cómo está constituido el tubo digestivo, el cual está integrado: por la boca, faringe, esófago, estomago, intestino delgado, intestino grueso, cavidad oral. La cavidad oral se ubica en la primera parte del tubo digestivo, exactamente en la parte inferior de la cara, entre las fosas nasales y el cuello, es recubierto por una mucosa cuya estructura está formada por: el epitelio, membrana basal y extracto conectivo. (Martini, Timmons, 2009, pp662)

Con formato: Fuente: Color de fuente: Negro, Inglés (Estados Unidos), Borde: : (Sin borde), Contorno de

Con formato: Fuente: Negrita, Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Fuente: Sin Negrita, Color de fuente: Negro, Inglés (Estados Unidos), Borde: : (Sin borde), Contorno de texto

Con formato: Fuente: Color de fuente: Negro, Inglés (Estados Unidos), Borde: : (Sin borde), Contorno de

Con formato: Fuente: Negrita, Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Cuerpo

### **Anatomía de la cavidad Oral**

Se encuentra revestida por la mucosa oral, que presenta un epitelio escamoso con función protectora, no queratinizado a diferencia que el epitelio de la piel limitada por las mejillas y los labios. Esta estructura se caracteriza por su forma de herradura que está situada entre los dientes y los labios, a este espacio se le llama vestibular y la parte situada por detrás de los dientes es la cavidad oral. El techo de la cavidad bucal está formado por el paladar duro y blando mientras que la lengua ocupa la parte inferior (Martini et al. 2009, pp.661–663.)

### **Anatomía de la Lengua**

La lengua se diferencia en cuerpo anterior y una raíz posterior. Su superficie anterior contiene una gran cantidad de pequeñas proyecciones llamadas papilas gustativas, la lengua es un órgano impar, mediano y simétrico. Tiene la característica de ser muy móvil y está cubierta por una mucosa, este órgano tiene varias funciones importantes como lo son: la masticación, la deglución, la succión y la fonación. A nivel de la cavidad bucal hay una amplia diversidad microbiana debido a las agradables condiciones que proporcionan como las concentraciones de oxígeno, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, el pH, la exposición a factores inmunológicos y las características anatómicas que permita que estos vivan como comensales. (Martini et al. 2009, pp.662–664.)

### **Anatomía de la Faringe**

Es un órgano impar y simétrico, con una longitud promedio es de 14 cm en el hombre y 13 cm en la mujer. Está situada por delante de la columna vertebral, detrás de las fosas nasales, de la boca y de la laringe, inmediatamente por debajo de la apófisis basilar del occipital y por dentro de las regiones carotídeas y cigomáticas. Es un largo conducto irregularmente infundibuliforme, suspendido por arriba de la cara inferior del cráneo y continuándose hacia abajo con el esófago. Topográficamente se divide en 3 regiones: la nasofaringe, la orofaringe y la laringofaringe. (García, Algarra, Medina, Pinedo. 2008):

### **Rinofaringe**

Es la única porción puramente aérea de la faringe. Situada por delante del raquis cervical y por debajo de la base del cráneo, tiene una forma aproximadamente hexagonal en el adulto; en el niño se reduce a una simple hendidura cuyo diámetro anterosuperior es netamente mayor que el diámetro vertical. La superficie de la nasofaringe es en promedio de 249,6 a 289,9 mm<sup>2</sup>. Presenta

seis paredes: Las paredes superior y posterior forman un plano óseo continuo. La pared superior, también denominada bóveda o fórnix, se encuentra por debajo del esfenoides y está inclinada abajo y atrás, formando una curva armoniosa con la pared posterior que se vuelve vertical. Su unión está representada por una línea horizontal que pasa por el tubérculo faríngeo del occipital. (Suárez, Nieto, Careedo, 2008).

### **Orofaringe**

Funcionalmente es la subdivisión faríngea más compleja. Es el regulador del pasaje de aire y del alimento a través de la faringe. Debe tener la capacidad de limitar el reflujo faringo nasal, propulsar el bolo, facilitar el pasaje de aire y participar de la fonación. Su límite superior esta dado por el velo del paladar, a posterior, la columna y los músculos prevertebrales junto con la confluencia de los constrictores, hacia los laterales, las fosas amigdalinas y por debajo, está limitada por un plano imaginario que pasa por el borde superior de la epiglotis (Suárez, Nieto, Careedo, 2008)

### **Laringofaringe**

La porción más baja de la faringe corresponde a hipofaringe o laringofaringe que se extiende desde el borde superior de la epiglotis hasta el borde inferior del cartilago cricoides. Groseramente descrita, esta región presenta dos recesos laterales y una apertura medial. El hiato laríngeo o aditus laríngeo es el orificio de entrada a la vía respiratoria. A los laterales se extienden los senos piriformes, como depresiones en la mucosa que alojan entre ambos la eminencia laríngea, su eje mayor es vertical oblicuo y adquieren el aspecto de una semiluna de concavidad medial. Hacia superior finaliza con el repliegue faringoepiglótico, un desdoblamiento mucoso que se extiende desde el borde lateral de la epiglotis hasta la pared lateral y separa el seno piriforme a posterior de la valécula hacia anterior. (Suárez, Nieto, Careedo, 2008).

### **Fisiología de la Faringe**

Según la Revista Faso, 2014 dictan que en condiciones fisiológicas, las funciones de la faringe podrían englobarse en cuatro: la ventilatoria, la deglutoria, la fonatoria, determinada esta última principalmente a través de adaptaciones de volumen y diámetro de la caja de resonancia del timbre vocal, y la inmunológica, principalmente dada por los componentes linfocitiales del anillo de Waldeyer, que representan un sistema capaz de desarrollar una respuesta inmune frente a elementos patógenos.

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

### **Anatomía laringe**

La laringe es una estructura móvil, impar, que forma parte del conducto aerífero, actuando normalmente como una válvula que impide el paso de los alimentos deglutidos y de los cuerpos extraños hacia el tracto respiratorio inferior. Al mismo tiempo funciona como el órgano esencial en la fonación. Está compuesto de piezas cartilagosas múltiples y móviles, entre las cuales están extendidos repliegues membranosos, las cuerdas vocales, las cuales cuando vibran por la acción del aire espirado producen el sonido laríngeo. Se sitúa en la parte media y anterior del cuello, por delante de la faringe, por debajo del hueso hioides y por arriba de la tráquea. La relación con la columna varía según la edad y el sexo, es más alta en los niños que en los adultos y ligeramente más alta en las mujeres que en los varones. Está constituida por un esqueleto compuesto por piezas cartilagosas, articulaciones, ligamentos y músculos que relacionan estos cartílagos entre sí y con los órganos vecinos. Todo es tapizado por una mucosa (Leiva, Moncada,2010).

### **Fisiología laringe**

La laringe cumple tres funciones principales, respiratoria, deglutoria y fonatoria. Permite el pasaje de aire a través de ella, gracias a la acción del músculo cricoaritenideo posterior, dilatador de la glotis. Facilita el pasaje de los alimentos hasta el esófago evitando que ingresen a la vía aérea por la acción de la epiglotis. La vibración de las cuerdas vocales durante la espiración produce la voz. La intensidad de la voz depende de los músculos respiratorios. El sonido presenta tres características, tono, volumen y timbre (Suarez, Gareedo,2010).

### **Faringitis y la amigdalitis**

La faringitis es el enrojecimiento, dolor e inflamación de la garganta (faringe). La amigdalitis es una inflamación de las amígdalas. Las amígdalas son un par de masas de tejido que se encuentran a cada lado de la parte trasera de la garganta. Forman parte del sistema inmune, la parte del cuerpo que lucha contra las infecciones y otras enfermedades. (Álvez González, Sánchez, 2016).

### **Fisiopatología de la amigdalitis**

Los microorganismos penetran en la cavidad oral, se fijan a epitelio tonsilar y lo colonizan, se fagocitan y procesan por los macrófagos, la hipertrofia linfoide se produce por infiltrados de neutrófilos, se estimula la respuesta inmune celular y humoral, los antígenos vencen a los

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

anticuerpos, y se produce una intensa inflamación del tejido linfoide con acúmulos de leucocitos y en las criptas se producen exudados, el estadios evolutivos se determina de la inflamación y enrojecimiento de las amígdalas y claro el nivel de infección ( Yildirim N, Sahan M, Karslioglu, 2008)

### **Fisiopatología de la laringitis**

Es una inflamación de la mucosa de las cuerdas vocales y de la laringe que dura menos de tres semanas, las cuerdas vocales se vuelven edematosas y eritematosas, afectando la vibración, se produce inadecuada fonación, por lo tanto provoca ronquera ya fonía esto porque la infección comienza en la nasofaringe, se disemina al epitelio respiratorio de laringe y tráquea, ocasiona inflamación difusa, enfisema, edema en las paredes traqueales y deteriora la movilidad de las cuerdas (Fuentes, Peña, Vinet, 2014).

### **Etiología y epidemiología de la faringoamigdalitis.**

La etiología de la faringoamigdalitis se relaciona con la edad. Entre los niños menores de 3 años, los patógenos más habituales son los virus. Prácticamente todos los virus que afectan al aparato respiratorio pueden producir amigdalitis. Los más frecuentes son: adenovirus, virus de Epstein Barr, virus coxackie, rinovirus, coronavirus y virus influenza y parainfluenza. Entre los 5 y 10 años, los gérmenes más frecuentes son las bacterias, y en especial el estreptococo beta hemolítico del grupo A (Streptococcus pyogenes o SBHGA). Éste puede llegar a constituir el 40 % de todos los casos de faringoamigdalitis en las consultas de pediatría. Otras bacterias menos frecuentes que podemos encontrar son: estreptococos de los grupos C y D, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma pneumoniae, C. pneumoniae, estafilococos, bacterias anaerobias. También se ha comunicado la presencia de bacterias mucho más raras, como Actinomyces (Sánchez, Álvarez, 2010).

### **Manifestaciones clínicas**

Faringitis, es causada por la inflamación de la mucosa que reviste la faringe y suele ser repentina. Esta puede ser de origen viral la cual es la más frecuente, asociada a gripe, también puede ser de origen bacteriano (principalmente por Streptococcus pyogenes y Haemophilus influenzae), alérgico por una acción directa de alérgenos o por goteo nasal en rinitis alérgica, irritativo puede ser provocada por la sequedad ambiental, frío o inhalación de contaminantes como humo, polvo, entre otros (Montequi, 2006).

Laringitis es la inflamación de la membrana mucosa de la laringe. La cual afecta a las cuerdas vocales, provocando disfonía o afonía, y puede acompañarse de tos perruna, sobre todo en pacientes pediátricos. Suele deberse a un uso inadecuado de la voz, a la exposición a alérgenos e irritantes, a enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), a la presencia de infección, nódulos o pólipos, especialmente en fumadores, o presentarse como un efecto secundario de corticoides inhalados. La Amigdalitis, es una inflamación de las amígdalas, afecta a las amígdalas palatinas y se extiende al resto de la faringe. Tiene mayor prevalencia durante la edad escolar. Pueden ser víricas o asociadas generalmente a un cuadro catarral que no suele provocar fiebre, como mucha febrícula, o bacterianas la causa más frecuente son los estreptococos, que suelen provocar fiebre de hasta 39 °C o más. (Medina,2005)

**Figura 1. Laringitis de la Cavidad Oral**



**Fuente: Bailey, B. (2006)**

**Con formato:** Ninguno, Fuente: Negrita, Español (Costa Rica), Revisar la ortografía y la gramática

**Figura 2. Amigdalitis de la Cavity Oral.**



**Fuente: Bailey, B. (2006)**

**Con formato:** Ninguno, Fuente: Negrita, Español (Costa Rica), Revisar la ortografía y la gramática

#### **Diagnóstico amigdalitis**

La amigdalitis se caracteriza por fiebre, odinofagia y malestar general. Los hallazgos clínicos son poco específicos en cuanto a la etiología de la enfermedad. Clásicamente se han descrito dos grandes grupos de amigdalitis, las bacterianas y las víricas, donde se producen exudados (Camper, Canter, 2011).

#### **Diagnostico laringitis.**

Se evidencia por medio de una laringoscopia indirecta o una nasofibroscopia flexible que revela la presencia de signos inflamatorios en la mucosa laríngea, sobre todo en las cuerdas vocales. Estas se visualizan con aspecto congestivo o rojas en su totalidad, con filamentos de mucosidad entre las cuerdas por hipersecreción de la mucosa; podemos encontrarnos edema de las bandas ventriculares. Si la permeabilidad de la vía aérea está en cuestión, como lo sugieren el estridor, taquicardia y taquipnea la visualización de la laringe se realizará con extrema precaución, utilizando el endoscopio y si fuera necesario en un quirófano. (Falcon, Gonzales, Sánchez, 2016).

#### **Tratamiento farmacológico.**

Los tratamientos de sostén incluyen la analgesia, la hidratación y el reposo. Analgésicos sistémicos o tópicos, los AINE son analgésicos sistémicos eficaces. Algunos médicos también dan una dosis única de un corticosteroide (dexametasona 10 mg IM), que puede ayudar a acortar la

~~duración de los síntomas, sin afectar las tasas de recidiva o los efectos adversos. Los analgésicos tópicos están disponibles como aerosoles, sus ingredientes incluyen benzocaína, fenol, lidocaína, y otras sustancias. Estos analgésicos tópicos pueden reducir el dolor, pero deben utilizarse con frecuencia y suelen afectar el sentido del gusto. La benzocaína utilizada para la faringitis rara vez ha causado metahemoglobinemia. Para amigdalitis causada por bacterias, como en el caso de la faringitis, la antibioterapia es a base de penicilina G benzatina intramuscular, penicilina (Guerra,2010).~~

### Fitoterapia

La fitoterapia es la ciencia que estudia el manejo de los productos de origen vegetal con fines terapéuticos, ya sea para prevenir o curar una enfermedad, donde la medicina tradicional valida su uso popular mediante métodos químicos con pruebas de laboratorio. En salud pública, se considera un tipo de medicina alternativa, en la que la automedicación con hierbas es común, y existe una falta de garantía de calidad de los productos a base de hierbas, más sin embargo, la Organización Mundial de la Salud propone estrategias para incluir terapias complementarias y alternativas como herramientas de salud pública. (Avello y Cisternas, 2010).

### Fitofármacos

Son medicamentos cuya sustancia activa contiene la parte desecada de una determinada planta, a diferencia de un fármaco químico que proviene de una molécula químicamente sintetizada. En otras palabras, los fitofármacos son productos medicinales acabados y etiquetados, cuyos ingredientes activos estandarizados están formados por partes aéreas de las plantas o por las partes subterráneas de plantas u otro material vegetal. (Hernández, 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017) define a los fitofármacos como:

Productos que se obtienen mediante procesos especializados en el que se emplean materias primas de origen vegetal que tienen como finalidad profilaxis, curación, paliativo o diagnóstico que se caracterizan por el conocimiento de su eficacia y de los riesgos que puede desencadenar su uso, así como la reproductibilidad y constancia de su calidad.

### ▲ **Ventajas y desventajas de la medicina natural.**

**Con formato:** Fuente: Color de fuente: Negro, Borde: : (Sin borde), Contorno de texto

En la mayoría de los casos, la medicina natural, cuenta con la ventaja de ser mayoritariamente buscada por la población, ya que es muy accesible en cuanto a lo económico, también, por que producen menos efectos secundarios que los medicamentos sintéticos. Si hablamos de validación científica, en el espectro de la investigación médica, se le pone bastante énfasis ya que por medio de las entidades de salud, ya sea la FDA (Administración de Medicamento Alimentos), o la OMS (Organización Mundial de la Salud), y otras entidades, confirman que la manera adecuada en cuanto al tema de medicamentos, estos deben ser primeramente validados científicamente de cierta forma en el que aquel medicamento que no cumpla con la validez de eficacia y seguridad, no debe ser aceptado. Esta es una de las principales razones, por la cual muchos de los medicamentos basados en medicina natural cuentan con desventaja al no contar con los ensayos adecuados, en los que su eficacia no ha logrado ser demostrada mediante ensayos aleatorios controlados de doble ciego. (González & Cardentey, 2016).

~~Tal y como lo indica Hernández (2014, p. 78), los fitofármacos son medicamentos cuya sustancia activa contiene el extracto de una determinada planta, a diferencia de un fármaco químico que proviene de una molécula químicamente sintetizada. Una definición más amplia indica que los fitofármacos son productos medicinales acabados y etiquetados, cuyos ingredientes activos estandarizados están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de estos, en estado bruto o en forma de preparaciones vegetales~~

#### **Droga vegetal**

Es aquella parte de la planta medicinal (raíz, tallo, corteza, hojas, entre otras) o aquellas secreciones o excreciones particularmente ricas en determinadas sustancias biológicamente activas, y que no han sufrido ningún tipo de transformación, excepto recolección y secado u otros procesos físicos o mecánicos. Es toda materia, ya sea de origen humano, animal, vegetal, químico o de otro tipo, a la que se atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento. (Kuklinkski, 2000).

#### **Metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos sintetizados a partir de excedentes del metabolismo primario. Los productos provenientes del metabolismo primario llámese: aminoácidos, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos participan directamente en el crecimiento y supervivencia de las plantas, pero los metabolitos secundarios como fenoles, terpenos, alcaloides,

actúan como mediadores aleloquímicos, interviniendo en las funciones de la planta o de los organismos con los que interaccionan, ya que estos participan en las respuestas a innumerables variables. Cabe destacar, que la variación de las condiciones ambientales, incidencia de luz, precipitación, interacciones bióticas herbívoras, ataque por microorganismos, competencia por el espacio en suelo, los nutrientes o la luz influyen en la síntesis de metabolitos secundarios. ( Nakabayashi y Saito, 2015).

**TOMILLO (*THYMUS VULGARIS L.*)**

Reino	Plantae
Sub Reino	Tracheobionta
Super división	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Sub clase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Genero	Thymus L

**Tabla 4.**  
**Clasificación sistémica**  
***Vulgaris***

Especie	Thymus
	Vulgaris

**de *Tymus***

Fuente: Plants Database (2017).

Nombrado científicamente como *Thymus vulgaris*, su etimología proviene de la raíz griega que significa fumus, palabra que hace alusión a hacer humo, exhalar y aroma. El tomillo pertenece a la familia Lamiaceae. Es una planta aromática, vivaz, leñosa, muy polimorfa, de 10 a 40 cm de altura, con numerosas ramas leñosas, erectas, compactas, parduzcas o blanco-aterciopeladas. Las hojas de 3 a 8 mm son lineares, oblongas, sentadas o brevemente pediceladas, opuestas, tomentosas, sin cilios, con el pecíolo o sus márgenes revueltos hacia abajo y blanquecinas por su envés. Las flores son axilares y agrupadas en la extremidad de las ramas, formando una especie de capítulo terminal, a veces, con inflorescencia interrumpida. (Gil, 2002).

#### **Descripción botánica**

Esta especie forma una mata de un palmo de altura o poco más, muy poblada de hojas, a lo sumo de 1 cm incluido el rabillo, de figura entre aovada y lanceolada, pero por lo común aparentando ser más estrechas, porque la sequedad suele hacer que se arrollen por sus bordes hacia el reverso, que es blanquecino, por los muchos pelos blancos que lo recubren, y acopladas y enfrentadas en cada nudo. En el extremo de las ramas, las flores se agrupan en una especie de

cabezuelas y tienen el cáliz de color rojizo vinoso, de una sola pieza, con la garganta obstruida por pelos blancos, dividido en dos labios, el labio superior tiene tres dientes cortos y casi iguales, el inferior queda dividido en dos largas y estrechas lacinias. (Cáceres, 2004).

### **Taxonomía**

De acuerdo con Prasanth, Ravi, Varsha y Satyam (2014) su taxonomía se describe en pertenecer al reino plantae, el tomillo es una planta que pertenece a la familia de las labiadas, la cual puede ser distribuida en muchas partes del mundo. Tiene diferentes usos, tanto culinarios, para saborizar alimentos, como medicinales, con fines curativos. En su estado silvestre, el tomillo puede crecer sin mayores dificultades en un suelo calcáreo.

### **Hábitat y suelo**

Originaria del sur de Europa, esta planta aromática y medicinal es cultivada en climas de tipo montañoso, templado y subtropical de América y el Caribe. Esta se cultiva en el altiplano central y occidental, en lugares secos y soleados. Crece a partir de semillas o por división de raíces, florece en primavera, a partir de marzo. Se cría en los pasos de montaña, cabezos y laderas expuestas al sol, en matorrales de las tierras bajas calcáreas o arcillosas, con mucha menor frecuencia en las tierras silíceas. Se encuentra en una altitud entre 0 y 2.000 m. Sus especies perviven bajo temperaturas muy variadas, e incluso extremas. Resiste bien las heladas y sequías, pero no el encharcamiento ni el exceso de humedad ambiente. Aunque se adapta bien a los suelos ricos en aluvión y calcáreos, se adapta a los arcillosos, ligeros y silíceos. Prefiere la exposición a mediodía. Normalmente, se disponen en forma de matorral bajo en zonas de sol directo e intenso, que soportan gracias a la impregnación oleosa de sus hojas. (Fuentes, 2005).

**Figura 1. Tomillo**



Fuente: Emperatriz (2018).

### **Origen**

El tomillo se halló por primera vez en el Mediterráneo Occidental, también se presume que su primer cultivo fue visto en Inglaterra. Otras investigaciones manejan que la planta medicinal radicó en Los Alpes desde el año 859 hasta aproximadamente el 1250. Aunado a ello, Newman se encargó de extraer el aceite vegetal para usos farmacéuticos en el año 1725. (Fernández y Ulate, 2000).

### **Propiedades y usos medicinales**

El aceite esencial de tomillo ofrece una amplia multitud de propiedades antisépticas y bactericidas, así como tónicos y estimulantes. Además, refuerza los sistemas defensivos del organismo y, en la medicina herbolaria tradicional, se emplea contra la bronquitis, laringitis, resfriados comunes, sinusitis o el tratamiento de lombrices, antibacterianos, entre otros. (Gimeno, 2001).

**Con formato:** Fuente: Color de fuente: Negro, Español (España - alfabetización tradicional), Borde: (Sin borde), Contorno de texto

### ***Thymus vulgaris* como droga vegetal**

Sumidad florida de tomillo (Thymi herba). Según la Farmacopea Europea, consiste en las hojas y flores, enteras, separadas de los tallos previamente desecados de *Thymus vulgaris*, con un contenido mínimo de 12 mL/Kg de aceite esencial, respecto a la droga seca. Al menos un 40% del aceite esencial debe corresponder a la suma de contenidos de timol y carvacrol. Existe una Norma Internacional (ISO 6754:1996), que prescribe necesidades de calidad para el tomillo seco. La calidad prescribe necesidades del producto terminado. Las hojas deben contener un mínimo del 0,5% de aceite esencial, es decir, 5 ml/ kg de hierba seca, y el tomillo molido debe contener un mínimo del 0,2%

### **Partes medicinales de la planta de tomillo s**

Según Cimed (2002), el producto medicinal es el aceite extraído en fresco de la hierba florecida, en síntesis, las hojas secas y la parte aérea fresca de la planta. La esencia del tomillo presenta atributos tónicos, estimulantes del apetito, eupépticos, espasmolíticos, expectorantes, antisépticos, antihelmínticos y antifúngicos, también una de las propiedades **mas más** atractivas de la hierba es su potencial antibacteriano.

### **Farmacognosia**

La materia médica es la de las hojas y las flores secas. A nivel macroscópico, presenta tallos cuadrangulares, hojas ovadas, flores axilares, rosa claro, olor y sabor aromático. Microscópicamente, presenta células epidérmicas prolongadas en tricomas unicelulares, 60µm de largo, tricomas glandulares abundantes, tallo unicelular, cabezuelas esféricas unicelulares de 20 µm de diámetro. La ceniza no debe ser mayor de 12%, ceniza insoluble en ácido no más del 4% y no más del 15% de tallos menores de 1mm de diámetro. El aceite esencial tiene una gran heterogeneidad en cuanto a sus componentes es un líquido rojo de olor característico, que se extrae por destilación de las hojas y flores frescas (2%), presenta una densidad de 0.910-0.935, índice de

refracción 1.4950-1.5050, es soluble en etanol, tiene propiedad antiespasmódica, carminativa, antiséptica, aperitiva, eupéptica, colerética, antitusiva y expectorante. (Aceituno,2010).

La actividad antiséptica se atribuye al timol y flavonoides. El carvacrol y el timol presentan actividad neurotrópica y musculotrópica, por reducción de la disponibilidad de Ca<sup>2+</sup> estos poseen una débil actividad relajante de la tráquea, que no es resultado de la excitación de receptores β<sub>2</sub>, el valor terapéutico depende de los fenoles del aceite esencial. El extracto aumenta la secreción bronquial, y es espasmolítico. Los flavonoides le confieren propiedad diurética. La planta contiene moderadas cantidades de ácido rosmarínico (2.6% del peso seco) y derivados hidroxicinámicos totales (3.8% del peso seco), los cuales son responsables de su moderada actividad antioxidante (Aceituno,2010).

## COMPOSICIÓN QUÍMICA

### Análisis del aceite esencial de tomillo

Según Shabnum y Wagay (2011) pudieron identificar treinta compuestos por la destilación hidráulica de las partes aéreas de *Thymus vulgaris*. Algunos componentes del aceites esencial de tomilloes son los siguientes: timol y terpineno, p-cimeno, mirceno, alfa-pineno, eugenol y carvacol. Generalmente, el aceite vegetal se caracteriza por el alto porcentaje de fenoles monoterpénos. El aceite también muestra niveles relativamente abundantes del contenido fenólico, particularmente de timol, sustancia de la cual se le atribuye la actividad biológica de su aceite.

Los autores Hudaib, Speroni y Di Pietra (2002), pudieron identificar los distintos grupos funcionales del aceite esencial de tomillo, utilizando sus índices de retención, obtenidos a partir de dos columnas cromatográficas no polar y polar diferentes, en combinación con sus datos en el espectro de masas por captación de iones. El análisis GS-MS de los aceites generó la separación de cuarenta y seis componentes aceites, de los cuales cuarenta y cinco estructuralmente fueron bien identificados, usando sus datos de espectro de masas y de índice de retención.

**Tabla 5. Componentes de la droga vegetal *Thymus Vulgaris***

No.	Compound	Total oil %	Retention indices
1	$\alpha$ -Thujene	0.6	932
2	$\alpha$ -Pinene	1.9	936
3	Camphene	1.2	950
4	Oct-1-en-3-ol	1.0	962
5	$\beta$ -Pinene	0.3	978
6	Myrcene	1.1	987
7	<b><i>p</i>-Cymene</b>	<b>29.1</b>	<b>1,015</b>
8	1,8-Cineole	2.1	1,024
9	Limonene	0.2	1,025
10	<b><math>\gamma</math>-Terpinene</b>	<b>5.2</b>	<b>1,051</b>
11	<i>p</i> -Cymenene	0.1	1,075
12	Terpinolene	0.1	1,082
13	<b>Linalool</b>	<b>3.7</b>	<b>1,086</b>
14	Camphor	0.5	1,123
15	Borneol	1.9	1,150
16	Terpinen-4-ol	1.3	1,164
17	$\alpha$ -Terpineol	0.3	1,176
18	Thymol methyl ether	1.3	1,215
19	Carvacrol methyl ether	1.0	1,226
20	Borneol acetate	0.3	1,270
21	<b>Thymol</b>	<b>38.1</b>	<b>1,267</b>
22	<b>Carvacrol</b>	<b>2.3</b>	<b>1,278</b>
23	Thymol acetate	0.2	1,329
24	African-1-en	0.1	1,356
25	$\alpha$ -Copaene	0.2	1,379
26	$\beta$ -Bubonene	0.1	1,386
27	<b><math>\beta</math>-Caryophyllene</b>	<b>3.1</b>	<b>1,421</b>
28	Thymohydroquinone	0.1	1,509
29	$\alpha$ -Humulene	0.1	1,455
30	$\gamma$ -Muurolene	0.3	1,474
31	cis- $\beta$ Guaiene	0.1	1,488
32	Cuparene	0.1	1,498
33	$\gamma$ -Cadinene	0.6	1,507
34	Calamenene B	0.2	1,517
35	$\delta$ Cadinene	0.3	1,520
36	$\alpha$ -Cadinene	0.1	1,534
37	Caryophyllene oxide	0.5	1,578
38	$\gamma$ -Eudesmol	0.1	1,618
39	Eudesm-3-en-7-ol	0.1	1,650
40	Cadalene	0.1	1,659

Fuente: Microbial drug resistance (2012).

(Alfaro, Correa, Rivas, 2013) El tomillo posee en sus hojas distintos principios activos, entre éstos: **Composición cualitativa y cuantitativa de compuestos de *Thymus Vulgaris***

Según Alfaro, Correa y Rivas (2013), el tomillo posee en sus hojas distintos principios activos, los cuales alcanzan su concentración máxima durante la época de floración, entre estos se encuentran:

• Monoterpenos: como timol (20-55%), p-cimeno (14-45%), carvacrol (1-10%), gamma-terpineno (5-10%), borneol (8%), linalol (8%). Timol, carvacrol, metilehaviol, cineol, borneol,

• Flavonoides: Luteolina, apigenina, naringenina, eriodictol, cirsilinea, salvigenina, cirsimaritina, timonina, timusina, (apigenina, luteolina),

Con formato: Título 2

Con formato: Ninguno, Español (España - alfabetización tradicional)

Con formato: Con viñetas + Nivel: 1 + Alineación: 0,63 cm + Sangría: 1,27 cm, Punto de tabulación: 6,25 cm, Izquierda

Con formato: Ninguno, Español (España - alfabetización tradicional)

Con formato: Fuente: Color de fuente: Negro, Español (España - alfabetización tradicional), Borde: : (Sin borde), Contorno de texto

Con formato: Fuente: Times New Roman

Con formato: Ninguno, Español (España - alfabetización tradicional)

Con formato: Fuente: Color de fuente: Negro, Borde: : (Sin borde), Contorno de texto

- Taninos,
- Vitamina C, betacarotenos,
- 
- Minerales: aluminio, calcio, cobalto y magnesio (hojas), hierro (planta).
- 
- Ácidos orgánicos: ácido nicótico, cafeico, ácido ursólico (1.9%), oleanólico (0.6%), oleanólico, ursólico,
- Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico. Ácido cafeico, rosmarínico (0.15-1.35%).
- Triterpenos, saponinas y taninos.

Todos estos principios activos poseen una actividad farmacológica específica, la cual puede ser aprovechada al máximo si se aprende a elaborar fitofármacos destinados a una determinada enfermedad, apareciendo distintos componentes que le confieren distintas propiedades según la zona de recolección, altitud, composición del suelo, pluviosidad, y según la época de recolección. (Zambrano, 2016).

### Timol

El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es una sustancia cristalina incolora, con un olor característico, que está presente en la naturaleza en los aceites esenciales del tomillo o del orégano. El timol pertenece al grupo de los terpenos, un isómero del timol es el carvacrol, el timol se caracteriza por su poder desinfectante y fungicida. Por su sabor agradable, está presente en la formulación de diversos enjuagues bucales, pastas de dientes, entre otros. Una disolución del 5% de timol en etanol se utiliza para la desinfección contra hongos. En veterinaria, se aplica igualmente contra infecciones dermales y para estimular la digestión. En apicultura se usa para combatir un ácaro parasitario de la abeja llamado varroa. (Loarca, 2004).

Con formato: Fuente: Times New Roman

Con formato: Fuente: Color de fuente: Negro, Español (España - alfabetización tradicional), Borde: : (Sin borde), Contorno de texto

Con formato: Fuente: Times New Roman

Con formato: Fuente: Color de fuente: Negro, Español (España - alfabetización tradicional), Borde: : (Sin borde), Contorno de texto

Con formato: Fuente: Español (Costa Rica), Borde: : (Sin borde)

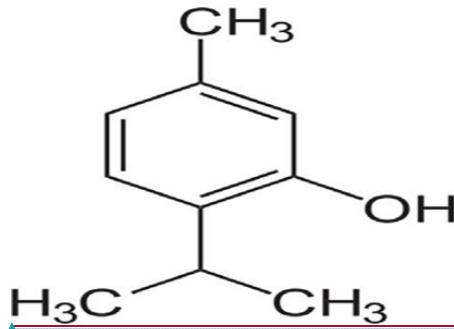
Con formato: Español (Costa Rica)

Con formato: Español (España - alfabetización tradicional)

Con formato: Con viñetas + Nivel: 1 + Alineación: 0,63 cm + Sangría: 1,27 cm

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

Figura 2. Estructura Química del Timol



Fuente: [Gutiérrez \(2019\)](#).

*Fuente: Gutiérrez (20*

*El timol se puede sintetizar por adición de m-cresol a propeno.*

Tabla 6. Datos fisicoquímicos del Timol

Fórmula	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
Masa molecular	150.22 g/mol
Punto de fusión	49 - 51 °C
Punto de ebullición	232 °C
Punto de inflamación	107 °C
Presión de vapor	2.5 Pa a 25 °C
Densidad de líquido	0.97 g/cm <sup>3</sup> (20 °C) 0.93 g/cm <sup>3</sup> (70 °C)
Solubilidad	0.98 g/L en agua a 25 °C 1000 g/L en etanol 1428 g/L en cloroformo

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

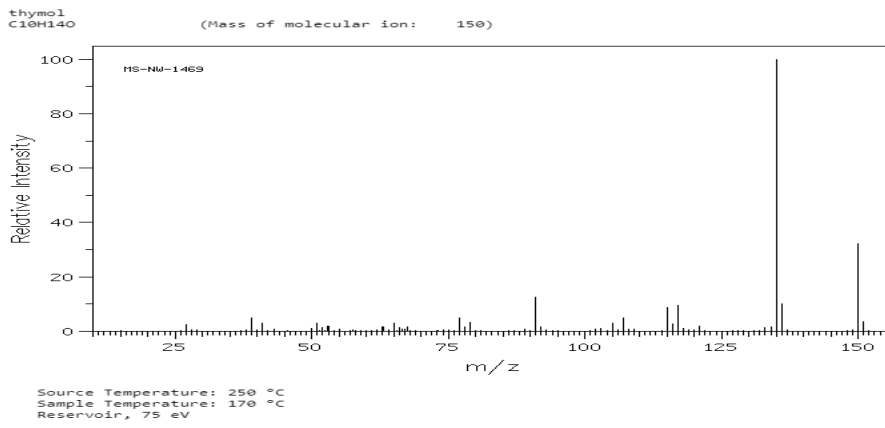
Con formato: Ninguno, Español (Costa Rica), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Centrado

LD50	980 mg/kg
------	-----------

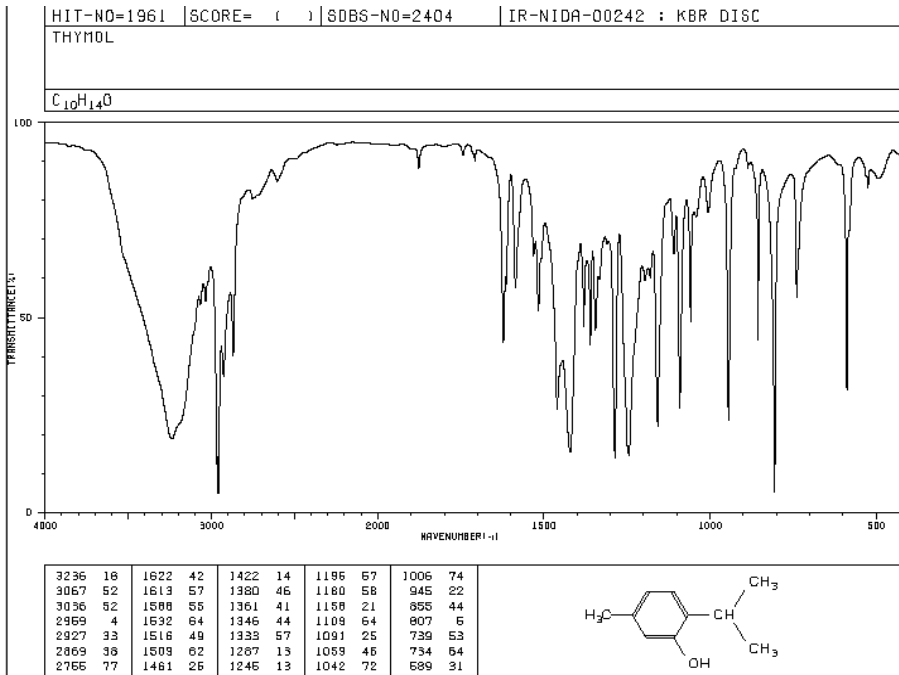
Fuente: (Elaboración propia, 2020)

**Figura 3. Masa molecular del Timol**



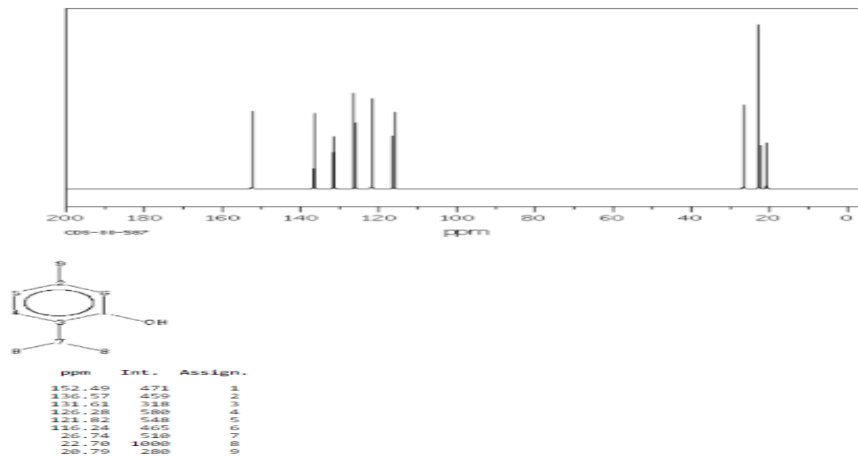
Fuente: Spectral Database for Organic Compounds (1999).

**Figura 4. Espectro IR del Timol**



Fuente: Spectral Database for Organic Compounds (1999)

Figura 5. NMR molécula Timol



Fuente: Spectral Database for Organic Compounds (1999).

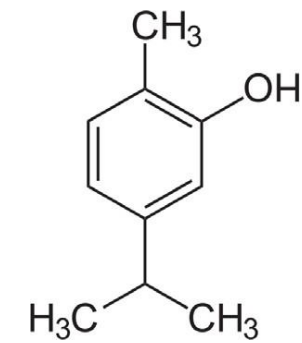
### Carvacrol

El carvacrol (~~(3-isopropil-6-metilfenol)~~), ~~también llamado cymophenol, C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>CH<sub>3</sub>(OH)~~ (~~C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>~~), es un fenol de monoterpenoide. Esto tiene un olor característico a acre, provoca una sensación como a -caliente, tiene un olor -parecido al orégano de orégano y un sabor gusto parecido

~~carvacrol.~~

a una pizza. ~~(Loarca, G,2004).~~

Figura 6. Estructura Química del Carvacrol



Fuente: Correa y Pinto ~~(2013).~~

El carvacrol está presente en el aceite esencial de *Origanum vulgare*, en el aceite de tomillo y en el aceite bergamota salvaje. El aceite esencial de subespecies de tomillo contiene entre el 5% y el 75% de carvacrol, mientras la subespecie *Satureja* (sabrosa) tiene un contenido entre el 1% y el 45%. La especie *Origanum majorana* y *Dittany de Creta* es rica en carvacrol. (Loarca, 2004)

Con formato: Centrado

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

**Tabla 7. Datos Físicoquímicos del Carvacrol**

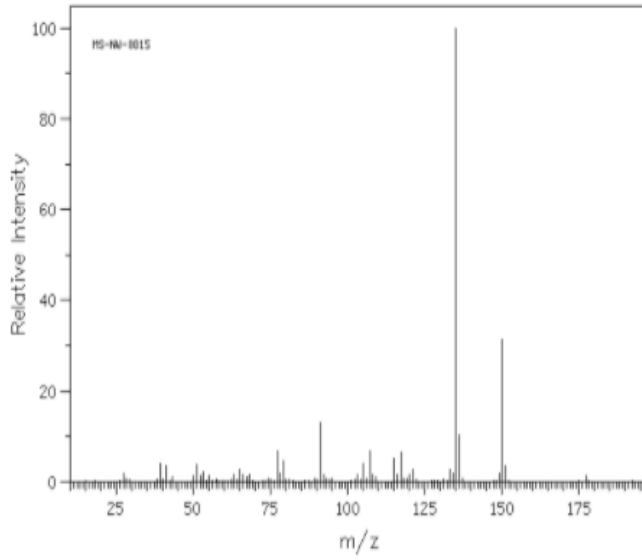
Fórmula	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O
Masa molecular	150.22 g/mol
Punto de fusión	1 °C
Punto de ebullición	273.7 °C
Solubilidad en agua	Ligeramente soluble
Densidad de líquido	0.977 g/cm <sup>3</sup> (20 °C)
Solubilidad	0.98 g/L en agua a 25 °C etanol

Fuente: Elaboración propia (2021)

**Figura 6. Masa del carvacrol**

**SDBS-Mass**

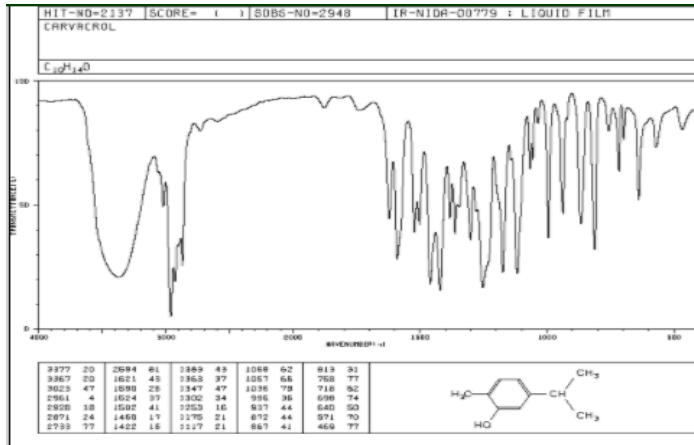
MS-NW-8815      SDBS NO. 2948  
carvacrol  
C10H14O      (Mass of molecular ion: 150)



Source Temperature: 228 °C  
Sample Temperature: 150 °C  
Reservoir, 75 eV

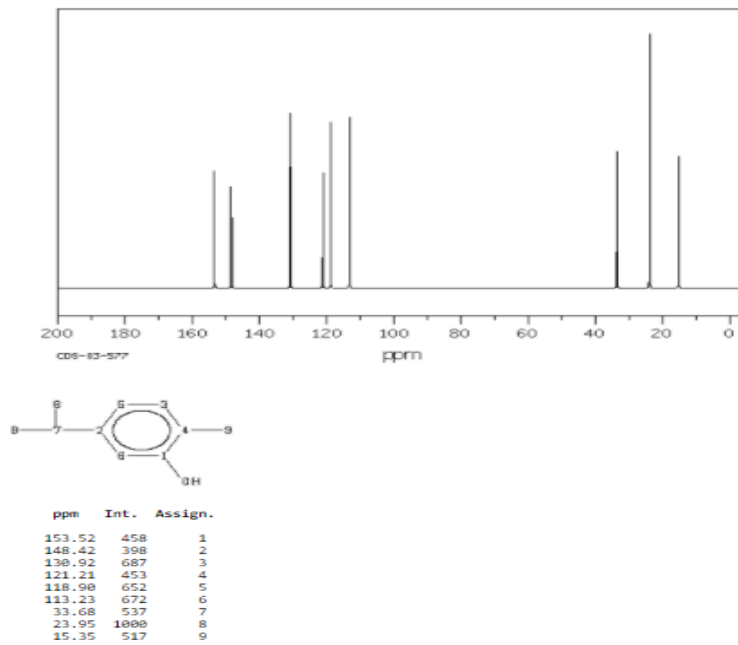
Fuente: Spectral Database for Organic Compounds (1999)

**Figura7. IR de la molécula carvacrol**



Fuente: Spectral Database for Organic Compounds (1999)

Figura8. NMR molécula carvacrol



Fuente: Spectral Database for Organic Compounds (1999).

**Tabla 8. Apariencia del aceite esencial de *Thymus Vulgaris***

<u>Aspecto</u>	<u>Líquido transparente.</u>
<u>Color</u>	<u>De incoloro a amarillo pálido.</u>
<u>Olor</u>	<u>Aromático, toque fenólico, toque ligero a especias.</u>

Fuente: Elaboración propia (2021)

**Tabla 9. Información fisicoquímica del aceite esencial de *Thymus Vulgaris***

<u>Densidad</u>	<u>0.900-0.950</u>
<u>Refracción</u>	<u>1.490-1.505</u>
<u>Rotación</u>	<u>(-5/+5<sup>0</sup>)</u>

Fuente: Elaboración propia (2021)

## PROPIEDADES MEDICINALES DEL TOMILLO

Diversas especies del género son ampliamente utilizadas en medicina tradicional. Sin duda, la más conocida y estudiada, utilizada en distintos campos, es *Thymus vulgaris*. Se ha empleado para tratar afecciones del aparato respiratorio como tosferina, laringitis, bronquitis, asma, entre otros. Igualmente, el aceite esencial obtenido por destilación de las partes aéreas de la planta y diversos extractos han mostrado su eficacia en casos de dolor de garganta, amigdalitis, enfermedades en las encías e infecciones de la cavidad bucal, reumatismo y artritis, debido a sus propiedades antisépticas, antiespasmódicas, antiinflamatorias, antitusígenas, expectorantes y antioxidantes. (Engelbertz et al., 2010).

### Actividad antifúngica y antibacteriana

Muchos ~~Entre las cualidades de la mayoría de de los~~ aceites esenciales, cabe destacar ~~conservan~~ que poseen efectos inhibidores, que han sido estudiados por su conocido uso antimicrobiano, antifúngico y antiviral, ya que hay numerosos estudios científicos que confirman esta actividad; por lo tanto, esto ha permitido su uso en preparaciones farmacéuticas, ya sea como conservantes o como fármacos. Entre ellos se encuentran el aceite de orégano el clavo de olor y el tomillo. (Labib y Aldawsari, 2015).

Como bien se sabe, los aceites esenciales son metabolitos secundarios producidos por las hierbas como fuente de defensa para su supervivencia; son mezclas de compuestos volátiles,

principalmente los terpenos y sus derivados oxigenados, producidos en pequeñas cantidades y con un gran potencial biológico, ya que poseen un efecto sinérgico, en el cual la acción de uno potencia la acción del otro, teniendo así un efecto de acción muy poderoso en el organismo. (Manou, Bouillard, Devleeschouwer y Barel, 1998).

### **Actividad Antiinflamatoria**

Según afirma Sancho (2014) en aplicación tópica, el aceite esencial es rubefaciente y ayuda en los procesos antiinflamatorios. López (2006) menciona que principalmente el carvacrol inhibe la biosíntesis de prostaglandinas, bloqueando el proceso inflamatorio, razón por la que se aprecia la esencia como uno de los componentes, en productos comerciales, que son usados para el tratamiento de dolencias musculares y osteoarticulares. Lagos (2012) menciona que el ácido rosmarínico también actúa bloqueando la acción del complemento, de esta manera interviene, asimismo, inhibiendo procesos de inflamación.

Con formato: Portugués (Portugal)

### **Actividad antiespasmódica y expectorante**

El tomillo es usado para aliviar los síntomas de la gripe y el resfriado, de manera que exhibe acción espasmolítica sobre las vías respiratorias y, además, actúa también como relajante sobre el músculo liso bronquial, justificándose como antitusivo. Según lo afirman Folcarà y Vanaclocha (2000), presenta un dinamismo expectorante, ya que su aceite esencial provoca la fluidificación de las secreciones bronquiales de esta manera favorece a su eliminación. López (2006) menciona también que el incremento en la actividad de los cilios bronquiales se debe a la presencia del aceite esencial, además, que el efecto irritante incrementa la producción de secreción bronquialveolar; de este modo, provoca la fluidificación y eliminación de las secreciones.

### **Actividad antiséptica**

Presenta acción contra las infecciones microbianas e impide que se desarrollen, utilizando compresas puede aliviar en casos de contusiones, hematomas, dolor de muelas y molestias en problemas reumáticos, en baños locales o completos para algunos tipos de dolor o inflamaciones (Sancho, 2014). La esencia de tomillo resulta un antiséptico con acción mayor, en comparación con el del fenol y el del agua oxigenada, cuya propiedad se evidenció a mediados del siglo XIX, donde se desconocían los antibióticos y el tomillo era considerado como un fuerte desinfectante. (Martínez, López y Solís, 2011). Folcarà y Vanaclocha (2000) mencionan que debido a sus

componentes timol y carvacrol, el aceite tiene acción antibacteriana frente a Gram positivos y gram negativos, ya que los componentes antes mencionados actúan sobre la membrana de las bacterianas y fúngicas, de manera que presenta también actividad antifúngica frente a *Candida albicans*.

**Con formato:** Fuente: Color de fuente: Negro, Español (España - alfabetización tradicional), Borde: : (Sin borde), Contorno de texto

### Otros Usos y Actividad biológica del tomillo

La utilidad principal que le ha otorgado a la humanidad es como uso de condimento culinario, favorece la conservación de los alimentos y útil en los procesos de elaboración de los licores. Se usa también en infecciones por bacterias y hongos, de igual manera en el cuidado de las encías y dientes, siendo de uso externo, empleado infusiones de tomillo. Los extractos de tomillo tienen actividad viral contra el virus del herpes simple tipo uno y tipo dos. Por su actividad diurética, está indicado para personas con retención urinaria, reumatismo, gota y distintos problemas con la vejiga o riñón. (Inlago, 2014).

### Contraindicaciones

~~Gracias a los taninos que contiene el tomillo, es posible que la persona involucrada con las infusiones de la planta sufra de estreñimiento agudo, con suma incapacidad de ir al baño. Por otro lado, si una persona es hipersensible, es recomendable no usar el *Thymus* para el consumo diario. Aparte de todo lo que se está dando a conocer sobre el tomillo, también puedes consultar los beneficios y las contraindicaciones, porque siempre es imprescindible conocer los pros y los contras. (Vidaurre, 2016).~~

~~Castillo, Roldan, Morales y Pérez Torner (2016) mencionan que no es recomendable el uso del *Thymus* en personas que sufren del corazón, porque puede producir taquicardias, o por el contrario, una severa disminución de la frecuencia cardíaca. Para el embarazo es totalmente prohibido consumir tomillo, en cualesquiera que sean sus etapas, pues podría provocar hasta aborto en el peor de los casos. Ni en mayor o menor medida se puede consumir esta planta medicinal en la lactancia. Es aconsejable que las futuras madres acudan con su ginecólogo para recomendar o no los alimentos con base en el *Thymus*.~~

### **Efectos Secundarios**

Resulta no viable el uso del aceite de tomillo por vía oral en especial mención durante la etapa de embarazo, lactancia, además, en infantes menores de seis años, por otra parte, no se recomienda en pacientes con insuficiencia renal o cardiaca. Se debe tener precaución con las esencias, ya que se pueden presentar alergias. En cuanto a la toxicidad, se establece que está contraindicado en caso de hipersensibilidad a algunos de los componentes de los preparados a partir del tomillo. (Cimed, 2002), p. 100.

### **IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS QUÍMICOS**

Al obtener los aceites esenciales, por medio de la técnica de hidrodestilación, se debe realizar una serie de pruebas de identificación, como, por ejemplo: cromatografía de gases (Head Space), Cromatografía de capa fina, Espectroscopia del infrarrojo ( IR ), para las cuales se realizó una revisión de los conceptos fundamentales, utilizando como principal referencia artículos científicos y el libro Análisis y control de medicamentos (2005).

### **Cromatografía de gases**

La cromatografía de gases por si sola representa un problema para la identificación de los componentes de una muestra ya que el único dato que proporciona es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos; de igual forma ocurre con la espectrometría de masas que puede identificar cualquier sustancia pura, pero no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes. Por tal razón se utiliza una técnica combinada GC-MS que permite tanto la separación como la identificación de mezclas complejas. Esta técnica consiste en inyectar una mezcla de compuestos en el cromatógrafo de gases donde se separa en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Al final cada componente se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica por su espectro de masas. (Gutiérrez & Droguet, 2002).

La técnica de cromatografía de gases acoplada con la espectrometría de masas es de gran utilidad para determinar los componentes de los aceites esenciales, así como la cantidad de los mismos y de esta forma revisar la calidad de los aceites esenciales (Stashenko & Martínez, 2010).

### **Cromatografía de gases por método (Head Space)**

Se ha desarrollado una técnica directa de extracción de ácidos grasos volátiles (AGVs), técnica Head space basada en la volatilización de estos hacia el espacio superior existente entre la muestra (fase líquida) y la tapa del tubo. Una vez volatilizados, los AGV que componen la muestra son retirados e inyectados directamente al cromatógrafo de gases. La técnica Head space elimina la necesidad de utilizar solventes para la extracción, es simple, rápida, sensible, y permite el análisis de componentes volátiles como los AGV a partir de soluciones o mezclas complejas sin la interferencia de otros compuestos no volátiles. (Boe, 2007).

### **Cromatografía de capa fina.**

Según Salazar (2005), la cromatografía de capa fina es una de las técnicas más antiguas, que se desarrolla a partir de la columna de sílica gel, que luego se traslada a la cromatografía sobre papel. El papel es celuloso, con una funcionalidad limitada, y siempre húmedo de agua, con lo que las separaciones quedan limitadas a compuestos polares de baja masa molecular; el empleo de una de una capa de gel de sílice sobre un soporte rígido como el vidrio, y más tarde con la adición de sulfato cálcico, conduce al incremento del empleo de la técnica, para que se puedan ya separar compuestos de mayor complejidad molecular, y la técnica se populariza. Se sigue hablado de una fase estacionaria hidrófila, sobre la que se desplaza una fase móvil rica en disolventes orgánicos, tamponados con sustancias inorgánicas u orgánicas. La utilización de esta técnica en el control de medicamentos ha quedado principalmente como técnica de identificación y semicuantitativa, salvo en el estudio de productos naturales, en su mayoría plantas y sus extractos. (p. 165).

### **Espectroscopia del infrarrojo (IR)**

Cuando se obtiene un compuesto de interés de una fuente natural, deben determinarse por completo sus estructuras, de ahí la importancia de la química orgánica, así, mientras la espectroscopia UV-VIS se ha aplicado al análisis cuantitativo a causa de su importante sensibilidad, la espectrometría IR se ha utilizado fundamentalmente en la identificación de los compuestos químicos a causa de su selectividad. Se clasifica según la región del espectro electromagnético en

la que se utiliza para hacer la medición, la cual se extiende de la radiación de menor longitud de onda hasta la de mayor longitud, estos son: rayos gamma, rayos X, rayos ultravioletas, infrarrojo, microondas y radiofrecuencias. (Salazar, 2005, p. 131).

La espectrometría de infrarrojo es un tipo de espectrometría de absorción, que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético, se basa en la vibración de los enlaces, y proporciona evidencia de los grupos funcionales presentes. La frecuencia de la vibración de la molécula dependerá de la masa atómica y de rigidez del enlace; los átomos más pesados vibran de forma más lenta que los ligeros, donde los enlaces más resistentes son más rígidos, y requieren mayor esfuerzo para estirar o comprimirse; los enlaces más fuertes generalmente vibran más rápido que los débiles. (Skoog, 2011, pp. 570-574).

**Tabla 10. Frecuencia aproximada donde se encuentra algunos grupos funcionales**

<u>Grupo Funcional</u>	<u>Absorción</u>	<u>Intensidad</u>
<u>Alcano (C-H)</u>	<u>2850-2960</u>	<u>Media</u>
<u>Alqueno(C=H)</u> <u>C=C</u>	<u>3020-3100</u> <u>1640-1680</u>	<u>Media</u>
<u>Alquino (≡C-H)</u> <u>C≡C</u>	<u>3300</u> <u>2100-2260</u>	<u>Fuerte</u> <u>Media</u>
<u>Haluro _____ de</u> <u>Alquilo (C-Cl)</u>	<u>600-800</u>	<u>Fuerte</u>
<u>Alcohol (O-H)</u> <u>C-O</u>	<u>3400-3650</u> <u>1050-1150</u>	<u>Fuerte</u> <u>Fuerte</u>
<u>Amina (N-H)</u> <u>C-N</u>	<u>3300-3500</u> <u>1030-1230</u>	<u>Media</u> <u>Media</u>
<u>Anillo aromático</u>	<u>1660-2000</u> <u>1450-1600</u>	<u>Débil</u> <u>Media</u>


<u>Ácido Carboxílico</u>	<u>2500-3100</u>	<u>Fuerte</u> <u>Amplia</u>
<u>Compuesto Carboxilo</u>	<u>1670-1780</u>	<u>Fuerte</u>
<u>Nitrilo (C=N)</u>	<u>2210-2260</u>	<u>Media</u>
<u>Nitro NO<sub>2</sub></u>	<u>1540</u>	<u>Fuerte</u>

Fuente: Elaboración propia, con datos tomados de Mc Murry (2008).

### (IR) infrarrojo

Constituye una de las mejores herramientas para identificar compuestos, tanto orgánicos como inorgánicos. En el análisis cualitativo la espectroscopia de infrarrojo puede usarse para la identificación de sustancias puras o para la absorción, localización e identificación de impurezas. Para localizar una impureza en una sustancia, se hace una comparación en el espectro de las sustancias que se estudian y una muestra de la sustancia pura. Las impurezas causan bandas de absorción adicionales, que aparecen en el espectro. En el IR también están encontrando uso cada vez mayor en el análisis cuantitativo, el principal campo de aplicación de este tipo de análisis se halla en la cuantificación de contaminantes atmosféricos que provienen de procesos industriales. Una parte del espectro electromagnético, que se extiende desde 0.8 a 1000  $\mu\text{m}$ , que corresponde al número de onda comprendidos entre los 12800 y los 10  $\text{cm}^{-1}$ , se considera como la región del infrarrojo, la cual se divide en IR (cercano), IR (Medio) e IR (Lejos). (Skoog, 2011, p. 361).

**Tabla 11. Resumen de los instrumentos de caracterización química**

<u>Cromatografía de gases</u>		<u>Separa el analito en dos fases, una móvil y otra estacionaria; permite</u>
-------------------------------	---	---

**Con formato:** Fuente: 12 pto, Sin Cursiva, Color de fuente: Negro, Borde: : (Sin borde), Contorno de texto

**Con formato:** Ninguno, Español (Costa Rica), Revisar la ortografía y la gramática

		<u>detectar</u> <u>compuest</u> <u>os</u> <u>volátiles.</u>
<u>Cromatografía</u> <u>de capa fina</u>		<u>Identifica</u> <u>compuest</u> <u>os</u> <u>químicos,</u> <u>mediante</u> <u>una fase</u> <u>móvil y</u> <u>una fase</u> <u>estacionar</u> <u>ia de</u> <u>sílica gel;</u> <u>para ver</u> <u>estos</u> <u>compuest</u> <u>os se debe</u> <u>emplear</u> <u>un</u> <u>revelador.</u>
UV		
<u>Espectrofotome</u> <u>tría IR</u>		<u>El IR se</u> <u>basa en la</u> <u>vibración</u> <u>de los</u> <u>enlaces</u> <u>molecular</u> <u>es, y</u> <u>proporcio</u> <u>na</u> <u>evidencia</u>

**Con formato:** Ninguno, Español (Costa Rica), Revisar la ortografía y la gramática

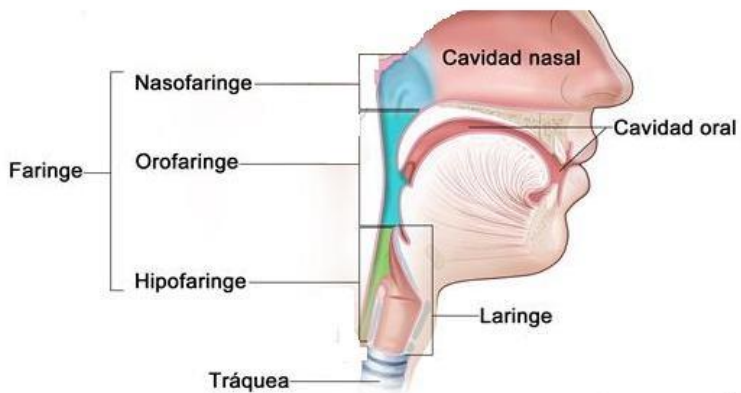
		<u>de grupos</u> <u>funcional</u> <u>es</u> <u>presentes</u> <u>en las</u> <u>moléculas</u> .
--	--	---

Fuente: (Elaboración propia, 2021)

### Cavidad Oral

Para hablar de la cavidad oral, primero se debe describir cómo está constituido el tubo digestivo, el cual está integrado: por la boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, cavidad oral. La cavidad oral se ubica en la primera parte del tubo digestivo, exactamente en la parte inferior de la cara, entre las fosas nasales y el cuello, es recubierto por una mucosa cuya estructura está formada por: epitelio, membrana basal y extracto conectivo. (Martini y Timmons, 2009, p. 662).

**Figura 9. Cavidad Bucal**



Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

Fuente: West (2012).

### **Rinofaringe**

Es la única porción puramente aérea de la faringe. Situada por delante del raquis cervical y por debajo de la base del cráneo, tiene una forma aproximadamente hexagonal en el adulto; en el niño se reduce a una simple hendidura, cuyo diámetro anterosuperior es netamente mayor que el diámetro vertical. La superficie de la nasofaringe es en promedio de 249,6 a 289,9 mm<sup>2</sup>. Presenta seis paredes, las paredes superior y posterior forman un plano óseo continuo; a pared superior, también denominada bóveda o fórnix, se encuentra por debajo del esfenoides y está inclinada abajo y atrás, formando una curva armoniosa con la pared posterior que se vuelve vertical. Su unión está representada por una línea horizontal que pasa por el tubérculo faríngeo del occipital. (Suárez, Nieto y Carcedo, 2008).

### **Orofaringe**

Funcionalmente, es la subdivisión faríngea más compleja. Es el regulador del pasaje de aire y del alimento a través de la faringe. Debe tener la capacidad de limitar el reflujo faringonasal, propulsar el bolo, facilitar el pasaje de aire y participar de la fonación. Su límite superior esta dado por el velo del paladar, a posterior, la columna y los músculos prevertebrales junto con la confluencia de los constrictores, hacia los laterales, las fosas amigdalinas y por debajo, está limitada por un plano imaginario que pasa por el borde superior de la epiglotis (Suárez, Nieto y Carcedo, 2008).

### **Laringofaringe**

La porción más baja de la faringe corresponde a hipofaringe o laringofaringe, que se extiende desde el borde superior de la epiglotis hasta el borde inferior del cartílago cricoides. Groseramente descrita, esta región presenta dos recesos laterales y una apertura medial. El hiato laríngeo o aditus laríngeo es el orificio de entrada a la vía respiratoria. A los laterales se extienden los senos piriformes, como depresiones en la mucosa, que alojan entre ambos la eminencia laríngea; su eje mayor es vertical oblicuo y adquieren el aspecto de una semiluna de concavidad medial. Hacia superior finaliza con el repliegue faringoepiglótico, un desdoblamiento mucoso que se extiende desde el borde lateral de la epiglotis hasta la pared lateral y separa el seno piriforme a posterior de la vallécula hacia anterior. (Suárez, Nieto y Carcedo, 2008).

### **Faringitis y la amigdalitis**

La faringitis es el enrojecimiento, dolor e inflamación de la garganta (faringe). La amigdalitis es una inflamación de las amígdalas. Las amígdalas son un par de masas de tejido que se encuentran a cada lado de la parte trasera de la garganta. Forman parte del sistema inmune, la parte del cuerpo que lucha contra las infecciones y otras enfermedades. (Álvez González y Sánchez, 2016).

### **Fisiopatología de la amigdalitis**

Los microorganismos penetran en la cavidad oral, se fijan a epitelio tonsilar y lo colonizan, se fagocitan y procesan por los macrófagos; la hipertrofia linfoide se produce por infiltrados de neutrófilos, se estimula la respuesta inmune celular y humoral, los antígenos vencen a los anticuerpos, y se produce una intensa inflamación del tejido linfoide con acúmulos de leucocitos, y en las criptas se producen exudados, el estadio evolutivo se determina por la inflamación y enrojecimiento de las amígdalas y, claro, el nivel de infección (Yildirim, Sahan y Karslioğlu, 2008).

### **Fisiopatología de la laringitis**

Es una inflamación de la mucosa de las cuerdas vocales y de la laringe que dura menos de tres semanas, las cuerdas vocales se vuelven edematosas y eritematosas, afectando la vibración, se produce inadecuada fonación, por lo tanto, provoca ronquera y afonía, porque la infección comienza en la nasofaringe, se disemina al epitelio respiratorio de laringe y tráquea, ocasiona inflamación difusa, enfisema, edema en las paredes traqueales, y deteriora la movilidad de las cuerdas, (Fuentes, Peña y Vinet, 2014).

### **Etiología y epidemiología de la faringoamigdalitis**

La etiología de la faringoamigdalitis se relaciona con la edad. Entre los niños menores de tres años, los patógenos más habituales son los virus. Prácticamente, todos los virus que afectan al aparato respiratorio pueden producir amigdalitis. Los más frecuentes son: adenovirus, virus de Epstein-Barr, virus coxsackie, rinovirus, coronavirus y virus influenza y parainfluenza. Entre los 5 y 10 años, los gérmenes más frecuentes son las bacterias, y en especial el estreptococo beta hemolítico del grupo A (Streptococcus pyogenes o SBHGA). Este puede llegar a constituir el 40% de todos los casos de faringoamigdalitis en las consultas de pediatría. Otras bacterias menos frecuentes que se encuentran son: estreptococos de los grupos C y D, Neisseria gonorrhoeae,

Mycoplasma pneumoniae, C. pneumoniae, estafilococos, bacterias anaerobias. También se ha comunicado la presencia de bacterias mucho más raras, como Actinomyces. (Sánchez y Álvarez, 2010).

### **Manifestaciones clínicas**

La faringitis es causada por la inflamación de la mucosa que reviste la faringe, y suele ser repentina. Esta puede ser de origen viral, la cual es la más frecuente, asociada a gripe; también puede ser de origen bacteriano (principalmente por Streptococcus pyogenes y Haemophilus influenzae), alérgico, por una acción directa de alérgenos o por goteo nasal en rinitis alérgica, irritativo, porque puede ser provocada por la sequedad ambiental, frío o inhalación de contaminantes como humo, polvo, entre otros. (Montequi, 2006).

La laringitis es la inflamación de la membrana mucosa de la laringe, la cual afecta a las cuerdas vocales, provocando disfonía o afonía, y puede acompañarse de tos perruna, sobre todo en pacientes pediátricos. Suele deberse a un uso inadecuado de la voz, a la exposición a alérgenos e irritantes, a enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), a la presencia de infección, nódulos o pólipos, especialmente en fumadores, o presentarse como un efecto secundario de corticoides inhalados.

La amigdalitis, es una inflamación de las amígdalas, afecta a las amígdalas palatinas y se extiende al resto de la faringe. Tiene mayor prevalencia durante la edad escolar. Pueden ser víricas o asociadas generalmente a un cuadro catarral que no suele provocar fiebre, como mucha febrícula, o bacterianas; la causa más frecuente son los estreptococos, que suelen provocar fiebre de hasta 39 °C o más. (Medina, 2005).

**Figura 10. Laringitis de la Cavidad Oral**



Fuente: Bailey (2006).

**Figura 11. Amigdalitis de la Cavidad Oral**



Fuente: Bailey (2006).

### **Diagnóstico amigdalitis**

La amigdalitis se caracteriza por fiebre, odinofagia y malestar general. Los hallazgos clínicos son poco específicos en cuanto a la etiología de la enfermedad. Clásicamente, se han descrito dos grandes grupos de amigdalitis, las bacterianas y las víricas, donde se producen exudados. (Camper y Canter, 2011).

**Con formato:** Ninguno, Fuente: Negrita, Español (Costa Rica), Revisar la ortografía y la gramática

**Con formato:** Ninguno, Fuente: Negrita, Español (Costa Rica), Revisar la ortografía y la gramática

### **Tratamiento farmacológico**

Los tratamientos de sostén incluyen la analgesia, la hidratación y el reposo. Analgésicos sistémicos o tópicos, los AINE son analgésicos sistémicos eficaces. Algunos médicos también dan una dosis única de un corticosteroide (dexametasona 10 mg IM), que puede ayudar a acortar la duración de los síntomas, sin afectar las tasas de recidiva o los efectos adversos. Los analgésicos tópicos están disponibles como aerosoles, sus ingredientes incluyen benzocaína, fenol, lidocaína y otras sustancias. Estos analgésicos tópicos pueden reducir el dolor, pero deben utilizarse con frecuencia, y suelen afectar el sentido del gusto. La benzocaína utilizada para la faringitis rara vez ha causado metahemoglobinemia. Para amigdalitis causada por bacterias, como en el caso de la faringitis, la antibioterapia es a base de penicilina G benzatina intramuscular, penicilina. (Guerra, 2010).

Para la realización de esta tesis, se ha escogido al Streptococcus Pyogenes. La selección de este microorganismo se ha basado en la importancia que este tiene en la producción de algunas enfermedades comunes en la población como: amigdalitis y la faringoamigdalitis.

### **Streptococcus pyogenes**

#### **Antecedentes y características generales**

El estreptococo beta hemolítico del grupo A es conocido también como Streptococcus pyogenes, y “es uno de los patógenos bacterianos de mayor importancia en el ser humano.” Es un coco gram positivo, anaerobio facultativo, crece en pares o en cadenas en medio líquido, inmóviles, capsulados, requieren medio nutricionalmente rico y una baja tensión de oxígeno para crecer, son catalasa negativa y sensibles a la bacitracina. El rango de temperatura de su crecimiento varía entre 25 a 45 °C, siendo 37 °C la temperatura óptima. El S. Pyogenes es parte de la flora normal de la cavidad bucal, este es el causante del 15 al 30%, de las faringoamigdalitis bacterianas, otras bacterias que pueden producir faringitis son: estreptococos β-hemolíticos grupo C y G, anaerobios, Corynebacterium diphtheriae, Neisseria gonorrhoeae. (Añanca, 2010).

La faringoamigdalitis ocurre principalmente en niños y adolescentes de edad escolar (5-15 años), con una gran incidencia en los primeros años escolares. Es importante recalcar que todas las edades son susceptibles a esta enfermedad, y no existe ningún tipo de predilección por el sexo. La incidencia de esta es mayor en climas templados y fríos, debido al contacto cercano entre las personas. La transmisión del agente causante, S. pyogenes, es mayor durante la fase aguda (3-5 días) sin tratamiento, y disminuye durante la etapa de colonización. Durante la fase aguda de la

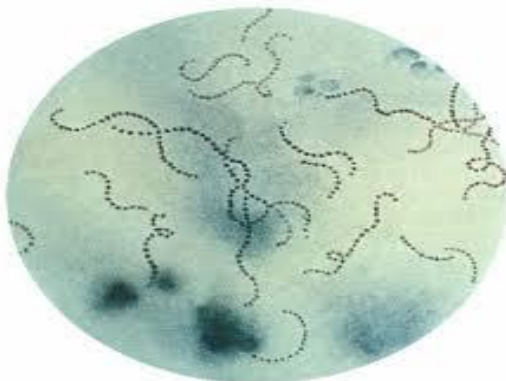
faringoamigdalitis, el *S. pyogenes* se encuentra en grandes cantidades en la nariz y garganta, y si no existe un tratamiento adecuado, este microorganismo persiste durante algunas semanas, pese a que desaparecen los síntomas y signos en pocos días. (Savio, 2010).

**Tabla 12. Determinante de patogenicidad de *S. Pyogenes***

<b>Determinante patogenicidad</b>	<b>Propiedades</b>
Mucopeptido (peptidoglicano)	Activación complemento, antigénico, aumenta patogenicidad
Proteína M	Aumenta virulencia SGA, anti fagocítica
Factor de opacificación del suero (Fo)	Antigénicos
Capsula mucoide	Dificulta fagocitosis, envuelve al microorganismo
Peptidasa	Inhibe quimiotaxis
Proteína F	Aumenta adherencia SGA
<b>Enzimas</b>	<b>Propiedades</b>
DNAasas A, B, C y D	Antigénicos, degradan DNA
Hialuronidasa	Degrada el ácido hialuronico
Estreptoquinasa	Disolución coagulo
Proteinasa, Amilasa y Esterasa	Antigénicos
<b>Productos extracelulares (toxinas)</b>	<b>Propiedades</b>
Hemolisinas O	Antigénica
Hemolisina S	No antigénica, daña membrana leucocitos
Exotoxina (SPE)	RASH (fiebre escarlatina), pirogenicidad, citotoxicidad

Fuente: (Elaboración propia, 2021)

**Figura 12. *S. Pyogenes***



Fuente: Marín (2013).

## **Formulación**

### **Principio activo**

Sustancia pura, principal responsable de las acciones y efectos farmacológicos que posee la droga y, por tanto, de su uso terapéutico, que puede servir para la elaboración de medicamentos. Es el componente responsable de la actividad del medicamento, y es el que alcanza el lugar diana, es decir, donde tiene que hacer su acción. Es toda materia de origen humano, animal, vegetal químico o de otro tipo, a la que se le atribuye una actividad apropiada para constituir un medicamento. Un mismo medicamento puede contener uno o varios principios activos. Es la sustancia que actúa por sí misma en el organismo. (García et al., 2010).

### **Excipientes**

Según la farmacopea de los Estados Unidos de América (USP), los excipientes son como cualquier componente que se agrega intencionalmente a la formulación de una forma farmacéutica, el cual es diferente del principio activo. La comisión internacional de los excipientes los define como sustancias aparte del principio activo, que se encuentran en una forma de dosificación las cuales ya han sido evaluadas de forma apropiada con respecto a la seguridad y que son incluidos en un sistema de suministro de fármacos para ayudar en su procesamiento, con la finalidad de proteger, apoyar y mejorar la estabilidad, biodisponibilidad o aceptabilidad por el paciente.

(Villafuerte, 2011).

### **Estabilidad del principio activo**

Vargas, 2013 recomienda que los productos farmacéuticos comerciales, cuenten con un periodo establecido de caducidad de 3 años como tentativo, donde la potencia de ellos no debe bajar del 95% en las condiciones de conservación recomendadas y el producto debe representar el mismo aspecto y con el mismo accionar que el día de fabricación, un fármaco puede degradarse por condiciones de hidrólisis, oxidación, solvólisis, fotólisis, por lo que el principio activo debe someterse a condiciones de tención las cuales son utilizadas para valorar la estabilidad en la fase de la preformulación.

### **Compatibilidad principio activo – excipiente**

Un preparado farmacéutico que pretenda ser estable y eficaz, siempre va a depender que se lleve a cabo una cuidadosa selección de cada uno de los excipientes por utilizar para de esta forma facilitar la administración, conseguir una liberación y una biodisponibilidad mantenidas en el tiempo, así como proteger el fármaco de posibles panoramas que causen degradación. De la misma forma en análisis de compatibilidad, se puede recurrir a análisis térmico para investigar y predecir las interacciones fisicoquímicas entre los componentes de un preparado, y de esta forma seleccionar los excipientes adecuados y compatibles químicamente para evitar todo tipo de interacción. (Vargas, 2013).

### **Preformulacion**

Es la investigación de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de un principio activo, solo o cuando se combina con excipientes, para de esta manera, generar información útil para la formulación en el desarrollo de una forma farmacéutica. Las actividades de preformulación van desde la identificación de los nuevos agentes activos descubiertos, hasta la caracterización de las propiedades físicas necesarias para el diseño de las formas farmacéuticas. (Ryman, 2015).

### **Desarrollo de Formulación**

Según escribano et al (2015) las formulaciones son los estudios requeridos para que la combinación entre el principio activo, los excipientes y el envase, resulten en un producto con las

características físicas y químicas requeridas, también se debe realizar un resumen describiendo el desarrollo de la formulación, incluyendo la identificación de los atributos críticos de calidad del principio activo en el producto, dicho autor menciona que otra cosa que se debe de tener en consideración es el uso y la vía de administración. Por consiguiente, el desarrollo de la formulación suministra la información básica sobre el principio activo, la fórmula y el impacto de los excipientes sobre el producto.

### **Enjuague bucal**

Los enjuagues bucales o colutorios son soluciones que se emplean después del cepillado con el fin de eliminar gérmenes y bacterias. Existen diferentes enjuagues, cuyo efecto varía en función de su composición. Así, podemos encontrar colutorios ricos en flúor, para la prevención de la caries, especialmente eficaz durante la calcificación del diente. Otros enjuagues están específicamente indicados para combatir y eliminar la placa bacteriana y la halitosis. Hay que destacar que la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, Food and Drug Administration), ha clasificado los enjuagues bucales como de tipo cosmético, terapéutico o la combinación de ambos y admite que algunos productos no hacen nada para detener o disminuir el proceso de la enfermedad Carlos, G (2006).

### **Reglamento técnico centroamericano**

Son los respectivos Comités Técnicos de Normalización a través de los entes de normalización de los países centroamericanos, son los organismos encargados de realizar el estudio o la adopción de las normas. Donde se encargan de definir la calidad, las características organolépticas, especificaciones, estabilidad durante el tiempo de uso, forma farmacéutica, medicamento, y muestra de retención. También se encargan de realizar una evaluación técnica mediante el etiquetado y pruebas específicas.

Este trabajo de investigación se realizó conforme al reglamento del RTCA sobre las soluciones farmacéuticas.

### **Tabla 13. Pruebas Soluciones, Suspensiones y Emulsiones según RTCA**

<u>Soluciones, Suspensiones y Emulsiones</u>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <u>Características Organolépticas</u></li> <li>• <u>Volumen de entrega</u></li> <li>• <u>pH</u></li> <li>• <u>Densidad</u></li> <li>• <u>Identificación general o específica</u></li> <li>• <u>Contenido alcohólico</u></li> <li>• <u>Recuento microbiano</u></li> </ul>
--	---

(Reglamento Técnico Centroamericano, 2013)

#### **Pruebas de calidad de medicamentos para mucosas**

Los atributos de calidad de las formas farmacéuticas para mucosas deben reflejar requisitos aceptables para los productos que se hallan en el mercado. Existen una serie de pruebas que se les debe realizar de manera general a todas las formas farmacéuticas destinadas para administración de mucosas y estas son: definición, identificación, valoración e impurezas tanto orgánicas como inorgánicas. (USP capítulos generales, 2019).

**Tabla 14. Medicamentos administrados por la vía orofaríngea (pruebas específicas)**

<b>Forma farmacéutica</b>	<b>Pruebas específicas del producto</b>
Parches bucales	Ver capítulo 3 para requisitos de prueba comunes para parches
Películas	En la actualidad no existen pruebas específicas (pueden aplicarse requisitos adicionales de las monografías)
Geles	(753)
Gomas	En la actualidad no existen pruebas específicas (pueden aplicarse requisitos adicionales de las monografías)

Tableta de disolución bucal	En la actualidad no existen pruebas específicas (pueden aplicarse requisitos adicionales de las monografías)
Ungüentos	(755)
Soluciones	En la actualidad no existen pruebas específicas (pueden aplicarse requisitos adicionales de las monografías)
Esprais	(5)
Tabletas	(5)

Fuente: Elaboración propia, tomado de la USP capítulos generales (2019).

### **Control microbiológico**

#### **Presencia y análisis de microorganismos en productos farmacéuticos y cosméticos.**

La contaminación microbiana de los productos farmacéuticos y cosméticos ha sido extensamente estudiada. Las preparaciones farmacéuticas y los cosméticos pueden contaminarse con hongos filamentosos, levaduras y bacterias. Las materias primas naturales, el equipo, el agua, el aire, y el material de empaque pueden ser fuentes de contaminación de dichos productos. Donde la presencia de microorganismos puede alterar la calidad, eficacia y seguridad del producto. Por esta razón, el producto debe llegar al consumidor con un contenido bajo o nulo de microorganismos. Por consiguiente, se deben realizar tres procedimientos: control microbiológico de las materias primas, donde hay que prestarle atención al agua, buena higiene en la fabricación y envasado, y utilización de conservantes. (Elsevier, 2008).

Hay que destacar que los conservantes antimicrobianos son sustancias añadidas a los productos farmacéuticos y cosméticos, para evitar el desarrollo microbiano o de microorganismos que se

introducen sin ser advertidos durante el proceso de fabricación o después de este, ya que dichos productos son una fuente excelente de nutrientes para bacterias, hongos y levaduras. Por lo tanto, es difícil, encontrar el tipo de conservante, que satisfaga todo criterio de conservación y seguridad toxicológica. Es importante considerar que los conservantes antimicrobianos no deben emplearse en lugar de las buenas prácticas de manufactura o simplemente para disminuir la población microbiana. (USP-36, Pruebas microbiológicas. Prueba de eficacia antimicrobiana, 2013)

#### Microorganismo de prueba.

**Tabla 15. Características de los microorganismos de prueba. Prueba de eficacia antimicrobiana USP-36**

Microorganismo	características
<b>Streptococcus Pyogenes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bacilo gram positivo</li> <li>• Anaerobio facultativo</li> </ul>

Fuente: Elaboración propia, tomado de USP 31 (2013).

#### Prueba de eficacia antimicrobiana.

El principio fundamental del análisis de los conservantes consiste en inocular envases separados del producto con concentraciones conocida ( $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  ufc/mL de producto) de los microorganismos de prueba, a continuación, tomar muestras de cada envase en intervalos de tiempo determinados de acuerdo con la categoría del producto y determinar la proporción del inóculo que sobrevive, mediante el recuento en placa. Empleando las concentraciones calculadas de ufc/mL presentes al inicio de la prueba, se calcula el cambio en valores en  $\log_{10}$  de la concentración de ufc/ml en los intervalos de prueba correspondientes y se expresan los cambios en términos de reducción logarítmica, los cuales son comparados con los criterios para microorganismos evaluados (USP-36, Pruebas microbiológicas. Prueba de eficacia antimicrobiana, 2013).

**Tabla 16. Categoría de productos farmacopeicos**

Categoría	Producto farmacéutico
-----------	-----------------------

1	Inyectables, parenterales incluyendo emulsiones, productos óticos, productos nasales estériles y productos oftálmicos
2	Productos empleados de manera tópica preparados con bases o vehículos acuosos, productos nasales no estériles y emulsiones, incluyendo aquellos que se aplican a membranas mucosas
3	Productos orales a excepción de antiácidos, preparados con bases o vehículos acuosos.
4	Antiácidos preparados con una base acuosa

Fuente: Elaboración propia, tomado de USP- 36, Pruebas Microbiológicas <51> (2013).

Tabla 17. Criterios para microorganismos evaluados. Pruebas de eficacia antimicrobiana (USP)

<b>En producto de la categoría 1</b>	
<b>Bacterias:</b>	A los 7 días una reducción logarítmica de no menos de 1,0 desde el recuento calculado en el inicio; a los 14 días, una reducción logarítmica de no menos de 3,0 del recuento inicial; y a los 28 días ningún incremento del recuento de los 14 días.
<b>Levaduras y Hongos filamentosos:</b>	Ningún incremento a los 7,14 y 28 días respecto al recuento inicial.
<b>En producto de la categoría 2</b>	
<b>Bacterias:</b>	A los 14 días, una reducción logarítmica de no menos de 2,0 desde el recuento calculado en el inicio; y a los 28 días ningún incremento del recuento de los 14 días.

<b>Levaduras y Hongos filamentosos:</b>	Ningún incremento a los 7,14 y 28 días respecto al recuento inicial.
<b>En producto de la categoría 3</b>	
<b>Bacterias:</b>	A los 14 días, una reducción logarítmica de no menos de 1,0 desde el recuento calculado en el inicio; y a los 28 días ningún incremento del recuento de los 14 días
<b>Levaduras y Hongos filamentosos:</b>	Ningún incremento a los 14 y 28 días respecto del recuento inicial
<b>En producto de la categoría 4</b>	
<b>Levaduras y Hongos filamentosos:</b>	Ningún incremento a los 14 y 28 días respecto del recuento inicial
Fuente: Elaboración propia, tomado de UPS-36. Pruebas microbiológicas <51>prueba de eficacia antimicrobiana 2013)	

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Primera línea: 0 cm

## MICROBIOLOGÍA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. La diversidad metabólica de estos es tan grande, que la variedad de medios de cultivo es enorme, no existiendo un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos, ni siquiera refiriéndonos a las bacterias con exclusividad. (Bonifaz, 2015, p. 1000).

~~(Bonifaz, 2015, p.1000).~~

Para permitir el crecimiento de microorganismos en el laboratorio, es necesario aportarles un medio con nutrientes y condiciones fisicoquímicas adecuadas para su desarrollo.

El medio de cultivo es aquel que contiene agua y una serie de nutrientes, necesarios para su metabolismo. Normalmente, se utilizan placas de Petri con agar más nutrientes específicos (según el microorganismo que se desea aislar), aunque también existen medios de cultivo en tubo. (Bonifaz, 2015, p.1000).

En placa de Petri anterior, se determinó un medio de cultivo en tubo, y sobre la placa de agar se pudo apreciar crecimiento microbiano (áreas de color rosa intenso). En la placa, las zonas de crecimiento aisladas son masas de células que han crecido a partir de una célula original y se denominan colonias. No todos los microorganismos son cultivables en el laboratorio, pero sí una enorme cantidad de ellos. Podría hablarse de cultivos bacteriológicos, porque en la mayoría de los casos las que se cultivan en el laboratorio clínico son bacterias, pero también lo pueden hacer otro tipo de microorganismos, como es el caso de los hongos. Debido a esto, es mejor hablar de cultivo de microorganismos. La gran diversidad metabólica, que tiene este conjunto de organismos, explica la amplia gama de medios de cultivo que existen en el mercado. (Brum, 2010).

Medios de cultivo utilizados habitualmente en un laboratorio de microbiología, según Barrero (2015) existen diferentes tipos de medios de cultivos pero para este TFG solo se utilizó el medio de agar sangre, el cual permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias con importancia clínica, está compuesto por un medio base rico en nutrientes más un suplemento de sangre desfibrilada animal en una proporción del 5-10 %. Es un medio diferencial porque permite comprobar si las bacterias son hemolíticas, es decir, si tienen capacidad para romper los glóbulos rojos presentes en el medio donde existen tres tipos de hemolisis, beta hemolisis, alfa hemolisis, y gamma hemolisis.

***Figura 13. Agar sangre***



Fuente: Cavalieri (2005).

#### Agar sangre columbia CNA

~~Es un medio rico en nutrientes, con un 5% de sangre de carnero. Las siglas CNA son las de dos antibióticos de su composición (colistina y ácido nalidíxico) que inhiben el crecimiento de la mayoría de las bacterias gramnegativas. Esto permite el crecimiento selectivo de cocos grampositivos. Es especial para uso clínico y hospitalario, donde se realizan cultivos de secreciones y demás muestras, que normalmente presentan microbiota de cocos y bacilos.~~

Con formato: Normal

Con formato: Fuente de párrafo predeter., Fuente:  
Color de subrayado: Automático, Color de fuente: Texto  
1, Español (España - alfabetización tradicional), Borde: :  
(Sin borde), Contorno de texto

**Figura 22. Agar CNA**



Fuente: Cavalieri (2005).

#### **Agar MacConkey**

Es un medio diferencial y selectivo muy utilizado para el aislamiento e identificación de enterobacterias (bacilos gramnegativos). Llevan en su composición sales biliares y cristal violeta que inhiben el crecimiento de grampositivos y hongos. Contienen también lactosa y rojo neutro como indicador de pH. Las bacterias fermentadoras de lactosa (lactosa+) acidifican el medio y adquieren un color rosado (por ejemplo, E. coli), mientras que las no fermentadoras de lactosa (lactosa-) aparecen incoloras (por ejemplo, Salmonella).

**Figura 23. Agar Mac Conkey**



Fuente: Cavaliere (2005).

#### **-Agar Hektoen entérico (HE)**

-Es un medio selectivo y diferencial para el aislamiento y diferenciación de especies del género *Salmonella* y *Shigella*. Entre otros componentes, tiene sales biliares y colorantes como fucsina ácida y azul de bromotimol. Estos retrasan el crecimiento de otras bacterias, favoreciendo el desarrollo de especies de *Salmonella* y *Shigella*. Es también diferencial porque las bacterias lactosa- (*Salmonella* y *Shigella*) aparecen de color verdeazulado (color original del medio); mientras que las lactosa+ por ejemplo, (*E. coli*) adquieren un color de amarillo a salmón por el cambio de color del azul de bromotimol. Además, se pueden diferenciar las especies de *Salmonella* porque forman un precipitado negro debido a la formación de H<sub>2</sub>S a partir del citrato férrico de amonio que contiene el medio.

**Figura 24. Agar HE**



Fuente: Cavalieri (2005).

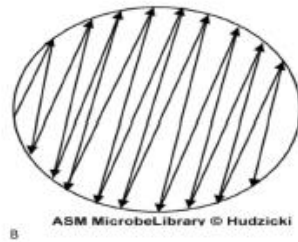
### **Método Kirby-Bauer**

Las pruebas de difusión por disco han sido utilizadas por más de 70 años en los laboratorios de microbiología. Alexander Fleming utilizó una variante de esta técnica cuando trabajaba con la penicilina en los años cincuenta. Los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turek, en 1966, publicaron su estudio describiendo la prueba, probaron todas las variables involucradas en el proceso, como los medios de cultivo, la temperatura y el espesor del agar. Esta técnica sigue siendo utilizada en la actualidad. (Cavalieri, 2005).

Es el más utilizado en bacteriología clínica, permitiendo obtener resultados con buena exactitud. Al ser un método estandarizado, sencillo, rápido y económico, permite ser utilizado de modo cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo; este último es el más utilizado. (Talavera, 2014).

En este método, el medio de cultivo se siembra con la cepa microbiana mediante un vertido en placas sobre el medio de cultivo; se colocan cantidades definidas del antimicrobiano a ensayar y del estándar como patrón de comparación, en puntos distanciados entre sí. Para la aplicación de estos antibióticos se utilizan pequeños cilindros, pocillos o discos con el antibiótico incorporado. (Cavalieri, 2005, p. 41).

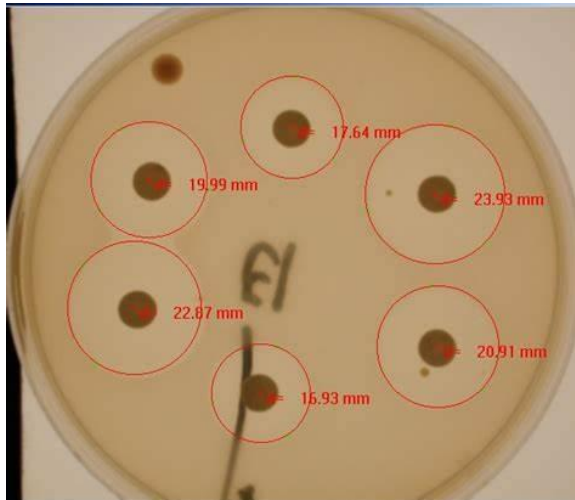
**Figura 25. Halo de inhibición**



Durante la incubación en temperaturas adecuadas, se producen alrededor de los pocillos de aplicación unos halos de inhibición, impidiendo el crecimiento microbiano, el diámetro define una medida relativa de la actividad del antimicrobiano en cuestión; al comparar el diámetro de los halos de inhibición del patrón de antibióticos con el antibiótico sometido a ensayo, puede calcularse la actividad de este último. (Talavera, 2014).

Talavera (2014) menciona que, cualitativamente, se puede describir si el halo es sensible, resistente o intermedio. El poco desarrollo alrededor del disco indica que la bacteria es "S, sensible" al antimicrobiano, lo que lleva a pensar que el antimicrobiano puede utilizarse en dosis terapéuticas. El crecimiento del microorganismo alrededor del disco indica que es "R, resistente" al antimicrobiano, por lo cual no debe emplearse. Existe un tercer tipo, cuando los diámetros de los halos son menores a "S" y mayores a "R", que es la que exigen las dosis de antimicrobianos superiores a las habituales para obtener respuesta terapéutica favorable, siempre y cuando no produzca efectos secundarios.

**Figura 26. Diferentes mediciones de halos de inhibición**



Fuente: Cavalieri (2005).

### CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

#### ENFOQUE DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación es de carácter cuantitativo, según Hernández, Fernández y Baptista (2014). Este es secuencial y probatorio; cada etapa procede a la siguiente, y no se puede “saltarse” o eludir pasos; se intenta probar una hipótesis con base en el análisis de resultados obtenidos (con frecuencia utilizando métodos estadísticos), y se establece una serie de conclusiones respecto de la hipótesis planteada. (p. 4).

La razón de esto es porque se pretende realizar una extracción del aceite esencial de *Thymus Vulgaris* somillo, mediante la técnica de hidrodestilación, por medio de la técnica de cromatografía de gases se pretende determinar cualitativamente los componentes de la droga vegetal y mediante el uso de excipientes se pretende desarrollar 3 formulaciones que posean efecto antibacteriano.

Con formato: Fuente: Cursiva

**TIPO DE INVESTIGACIÓN**

**VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN**

**Tabla 11. Tabla de Variables**

Objetivos	Variables	Definición Conceptual	Indicadores	Instrumento
Extraer el aceite esencial de tomillo, mediante la técnica de hidrodestilación	Aceite esencial.	Son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por <del>hidrodestilación</del> <del>arrastre con vapor de agua</del> , que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas. (Cruz, 2012)	% porcentaje de rendimiento del aceite esencial.	Hidrodestilación.

Tabla con formato

<p>Determinar las características químicas del aceite esencial de tomillo mediante el uso de UV visible, cromatografía de capa fina, y de gases, con el fin de obtener una cuantificación relativa de aceite esencial de tomillo.</p>	<p>Características químicas.</p>	<p>Es una cualidad o rasgo distintivo que describe a una persona o a algo, sea un objeto, un conjunto de objetos, un lugar o una situación, y lo destaca sobre un conjunto de semejantes. (Fernández, 2010).</p>	<p><u>Identificar compuestos químicos de la droga vegetal</u> <u>Porcentajes en la composición química de los compuestos.</u></p>	<p>Cromatografía fina y de gases.</p>
---	----------------------------------	--	---	---------------------------------------

<p>Proponer 3 formulaciones con base en excipientes que garanticen la calidad del producto, las propiedades organolépticas, fisicoquímicas y la eficacia antibacteriana de estos.</p>	<p><u>Excipientes</u> <u>Propiedades organolépticas.</u></p>	<p><u>Son aquellas Sustancias inactivas que se mezcla con los medicamentos para darles consistencia, forma, sabor u otras cualidades y a sí facilitar su administración.</u> <del>Son todas aquellas descripciones de las características físicas que tiene la materia en general, según las pueden percibir los sentidos, como, por ejemplo, su sabor, textura, olor, color o temperatura.</del> (Garbayo, 2002).</p>	<p>Visualización homogénea de la formulación.</p>	<p>Handbook <u>de excipientes</u></p>
---	--	--	---	---------------------------------------

Fuente: (Elaboración propia, 2020)

**Método de análisis**

Consiste en la ejecución y observación de los procedimientos y técnicas realizadas en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas, en una industria nacional y en el laboratorio de Microlabs, donde, a través de las técnicas y conocimientos de métodos químicos se aplica, mediante la extracción e identificación de las sustancias en análisis, la preparación de la fórmula fitofarmacéutica, además del análisis microbiológico para demostrar el posible efecto antibacteriano, y lograr cumplir los objetivos de estudio.

**Instrumentos y técnicas de recolección**

En este apartado se describen las técnicas y los instrumentos necesarios para el desarrollo de la investigación, que se separan mediante fases.

**Fase I. Adquisición de la materia vegetal**

Esta fue obtenida en la empresa de Hierbas Aromáticas Mynis Costa Rica, con las especificaciones necesarias de pureza del material; se excluyeron cualquier otro tipo de planta y las partes que fueran distintas de las hojas de tomillo.

**Fase II. Extracción del aceite esencial**

Esto se realizó mediante la técnica de hidrodestilación, y se procedió a describir el equipo utilizado y el método empleado para el desarrollo experimental del presente trabajo de investigación.

**Método por hidrodestilación****Material y equipo**

- Tomillo fresco 100 gramos.
- Soportes.
- Prensas.
- Mangueras.
- Calentador eléctrico.
- Balón 1L.
- Condensador.
- Beaker 500 ml.

- Pastilla de agitación.
- Balanza electrónica digital.
- Agua destilada.
- Pizeta.
- Termómetro.
- Alargadera.
- Erlenmeyer.
- Soporte.
- Espátula.
- Embudo separador.
- Kitasato.

#### **Procedimiento del método de hidrodestilación**

Se pesó en una balanza granataria el material vegetal, aproximadamente 100 gramos de tomillo; en un beaker de 500 ml se colocó en un balón de fondo plano de 1L seguido de la adición de 500 ml de agua destilada medidos en una probeta de 500ml. Se procedió a colocar el equipo de destilación, se ensambló el balón y se aseguró que las mangueras de entrada y salida estuvieran donde correspondían; posterior a eso, se revisó que las prensas aseguraran bien.

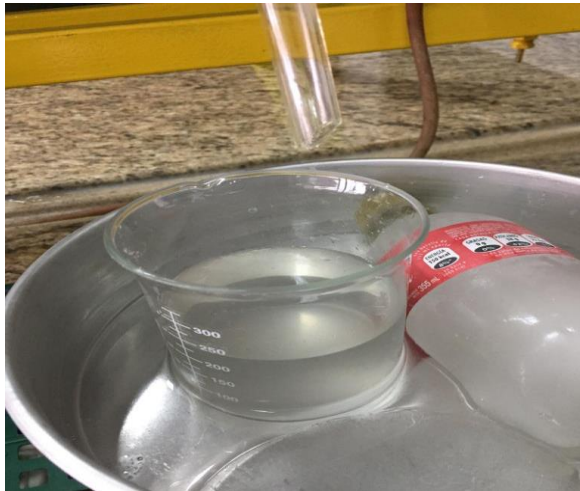
Se graduó la temperatura a 400 °C y a 100 revoluciones por minuto, llevándolo a una temperatura de ebullición ~~a entre 100 y~~ 90 °C; debido que, a esta temperatura, se observó la primera destilación; posterior a eso, se bajó la temperatura a 300 °C y se procedió a que continuara por un tiempo de tres horas. Se recogió el destilado (hidrolato) en un beaker de 300ml; al transcurrir el tiempo se apagó el equipo.

**Figura 14. Proceso de Hidrodestilación**



Fuente: (Elaboración propia, 2021)

**Figura 15. Recolección del Hidrolato**



Fuente: (Elaboración propia, 2021)

### Concentración y recolección del aceite esencial

Se colocó el embudo separador en la base; al destilado se le realizaron tres lavados con cloroformo; para esto se colocaron aproximadamente 235 ml del destilado en el embudo separador de 250ml con 15 ml de cloroformo. la razón de usar cloroformo fue porque presenta un bajo punto de ebullición de tan solo 61°C. Se agitó el contenido y se dejó reposar por diez minutos, hasta observar cómo se separa el agua del cloroformo por diferencia de densidades; la fase orgánica se sitúa en la parte inferior. Se recogió el cloroformo con el aceite esencial, ya que el aceite es miscible con la sustancia orgánica, y se vertió en un embudo que contenía algodón con un gramo de sulfato de sodio, con el objetivo de retirar agua residual en la muestra para ser concentrada en un rotavapor, con el agua a 61 °C de temperatura (punto de ebullición del cloroformo) hasta que todo el cloroformo fue separado. para esto se procedió a oler el extracto y verificar así que no contenía restos de cloroformo. Posterior a esto, se observó un residuo oleoso y de color característico del aceite. Se recogió la muestra del aceite esencial en viales de 15 ml; posteriormente pesado, se procede a calcular el porcentaje de rendimiento.

Figura 16. Separación de fases



Fuente: (Elaboración propia,2021)

**Figura 17. Obtención del aceite esencial mediante el rotavapor**



Fuente: (Elaboración propia,2021)

**Figura 17. Apariencia del extracto de esencial del aceite**



Fuente: (Elaboración Propia,2021)

### **Fase III. Pruebas de identificación de compuestos**

Son necesarios para determinar la presencia de grupos químicos con posible actividad antibacteriana en el aceite esencial. Esto se realizó mediante cromatografía de gases acoplado a masas, cromatografía de capa fina, y espectroscopia infrarroja (IR), y espectrofotometría UV visible (NIR).

### Cromatografía de gases (Head Space)

Se hicieron correr muestras del extracto de aceite esencial de tomillo vs. el estándar de aceite esencial de tomillo; ~~dicho estándar fue donado-facilitado~~ por un laboratorio nacional; ~~se utilizó la industria Zepol por~~ el cromatograma de gases en las condiciones especificadas en la siguiente tabla.

**Tabla 19. Cromatografía Head Space**

Horno de muestra	120 °C
Temperatura de la línea de muestreo	150 °C
Temperatura de la línea de transferencia	160 °C
Nivel de agitación	5
Tiempo de equilibrio	1 minutos
Tiempo de presurización	0,5 minutos
Tiempo de presurización y equilibrio	<del>0,1</del> minutos
Tiempo de carga	0,5 minutos
Tiempo de carga y equilibrio	0,1 minutos
Tiempo de inyección	0,8 min
Tiempo de descarga de la aguja	0 minutos
Tiempo del ciclo del GC	25 minutos

Fuente: (Elaboración propia,2021)

**Figura 18. Viales de aceite esencial de tomillo y patrón del aceite**



Fuente: (Elaboración propia,2021)

**Figura 19. Cromatografía de gases Head Space**



Fuente: Elaboración propia.

### Cromatografía de capa fina

Se analizaron comparativamente las muestras obtenidas; se utilizó como fase estacionaria sílica gel por ser polar, considerando que el extracto esté compuesto por sustancias ~~no~~ polares, las cuales se adhieren fácil a esta fase.

Para la preparación de la solución se usó como referencia un artículo científico de Plant Drug Analysis, en el cual se indica cuáles son las fases móviles a utilizar y en qué proporción, para identificar el timol y el carvacrol de la droga *Thymus vulgaris*. Para esto se utilizó un beaker de 2L, y se le adicionó la fase móvil, que consistió en acetato de etilo y tolueno en relación de 93:7, y se reveló con vainilla sulfurico.

Se aplicó una gota del extracto y otra gota del estándar de tomillo, un centímetro arriba de la fase móvil, tolueno-acetato de etilo en relación (93:7) los cuales se taparon con vidrio de reloj. Se hicieron correr muestras del extracto de aceite esencial de tomillo vs. el patrón de aceite esencial de tomillo; se dejó que la fase móvil se desplazara ascendentemente por capilaridad 13 cm antes del borde superior de la placa. Se retiraron y se dejaron secar al aire las placas. Por ~~último~~último, se reveló con vainilla -sulfúrico, logrando observar la ~~separaci~~separación de sustancias mediante el UV.

**Tabla 20. Condiciones cromatográficas capa fina para marcador.**

Marcador	Fuente de información	Fase móvil	Fase estacionaria	Revelador	Detección
Thymi herba	Plant Drug Analysis	Tolueno: Acetato de Etilo 93:7	Silica gel	Vainillina sulfúrico	366nm

Fuente: Elaboración propia

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Centrado

Con formato: Fuente: Español (Costa Rica), Borde: : (Sin borde)

### Materiales equipo y reactivos utilizados

- Beaker 2000ml.
- Placas de sílica gel.
- Tolueno.
- Acetato de etilo.
- Vainilla- ácido sulfúrico.
- TLC.

**Figura 21. Fase Móvil**



Fuente: (Elaboración propia,2021)

### Espectroscopia IR

Se ~~utilizo un espectrofotómetro infrarrojo Cary 630 FTIR;~~ se colocó la muestra líquida de los aceites entre una placa transparente a la radiación infrarroja.

- Utilizar el equipo de Espectroscopia infrarroja de la marca Agilent Cary 360.
- Acondicionar el sistema.
- Ingresar al Software y programar.
- Para el análisis colocar una gota de forma directa en el equipo, de la muestra.
- Limpiar el equipo una vez que se obtenga el IR, y proceder a colocar otra muestra para analizar y así sucesivamente.
- Procesar los resultados obtenidos.

Figura 22. Espectrofotómetro infrarrojo ~~empleado en la caracterización de las muestras del patrón de aceite esencial de tomillo vs. el extracto de aceite esencial de tomillo~~



Fuente: (Elaboración propia, 2021)

### Espectroscopia ultravioleta-visible

Se utiliza un espectrofotómetro; en él se colocan un blanco de etanol y la muestra líquida del aceite esencial de tomillo (patrón y extracto); se procede a realizar un barrido, que va desde los 200nm hasta los 800nm en las celdas de cuarzo.....

**Figura 36. Espectrofotómetro UV-visible**



Fuente: Elaboración propia.

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm, Primera línea: 0 cm

Con formato: Justificado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Primera línea: 0 cm

### Fase IV. Pruebas Microbiológicas

En este caso, se efectuaron pruebas del microorganismo de estudio en el laboratorio microbiológico Microlabs, situado a 125 metros sur de la escuela Pilar Jiménez, en Guadalupe. El cual consistió en medir los halos de inhibición de las disoluciones a distintas concentraciones de los colutorios A,B y C.

**Materiales, equipo y reactivos utilizados en la prueba microbiológica**

- Medio de cultivo de la cepa de Streptococcus Pyogenes.
- ~~3+~~ placas Mueller Hinton.
- Hisopos.
- Micropipeta 10-100µl.
- Diluciones de los colutorios piloto ~~1-aceite esencial de tomillo al~~ 100%, 75%, 50%, 25%.
- Tubos de ensayo.
- Cámara de flujo laminar.
- Incubadora.
- Regla.

♦

**Procedimiento de la prueba microbiológica**

Se realizaron las diluciones de los colutorios A, B y C ~~1-aceite esencial de tomillo~~ al 100%, 75%, 50% y 25% utilizando como diluyente etanol para el colutorio A, - los cuales se colocaron en frascos ámbar. Para los colutorios B y C se realizaron diluciones con diluyente agua. En la placa de Mueller Hinton se realizó un pequeño hoyo, y se procedió a inocular con un hisopo toda la placa con el medio de cultivo que contenía el microorganismo. Con la micropipeta se recogió una muestra aproximadamente de 5µl de cada una de las concentraciones, y se procedió a colocarlas en cada uno de los hoyos. Se selló la placa y se colocó en la incubadora por un periodo aproximado de 48h. Con una regla, se midieron los halos formados de inhibición. Cabe destacar que la cepa proviene del banco mundial de cepas y genes (ATCC) Streptococcus Pyogenes R 4607000.

Figura 23. Diluciones de los colutorios-aceite esencial de tomillo sobre la cepa de *S. Pyogenes*



Fuente: (Elaboración propia, 2021)

#### Fase V. Formulación del producto

Es la última fase experimental de la investigación, donde se procedió a elaborar 3 ~~colutorios~~ colutorios antibacteriales para esto se tomó en cuenta el RTCA, la USP específicamente capítulos

generales y se verifico en la AEMPS.

#### Material y equipo utilizado para la preparación del colutorio A antibacteriano

- Balanza electrónica digital.
- Beakers.
- Probeta 25 y 100ML.
- Agitador de vidrio.
- Espátula.
- Ácido bórico.
- Tymol.
- Eucalipto.
- Salicilato de metilo.
- Aceite esencial de tomillo.
- ~~Aceite de coco~~ Mentol.
- Alcohol etílico 95%.
- Agua tridestilada.

**Figura 24. Equipo empleado para la elaboración del colutorio antibacteriano**



Fuente: (Elaboración propia, 2021)

**formulación A1**

- Ácido bórico 1.5g
- Tymol 0.1g
- Eucalipto 0.5g
- Salicilato de metilo 0.1g
- Aceite esencial de tomillo 0.03g
- Mentol 0.1g
- Alcohol etílico 95% 67.67g

Agua destilada

**Tabla 21. Formulación para 100g del colutorio A al 0.1%**

Excipientes	Porcentaje en gramos	Usos
Ácido bórico	1.00g	Conservante antimicrobiano
Eucalipto	0.5g	frescura
Salicilato de metilo	0.1g	Frescura
Aceite esencial de <i>Thymus Vulgaris</i>	0.1g	Agente antibacteriano
Alcohol etílico	40g	Disolvente
Aceite de coco	0.20g	Emulsificante
Agua	57.67 g	Diluyente

• (Elaboración propia, 2021)

Con formato: Color de fuente: Rojo

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Primera línea: 1,25 cm, Derecha: 0 cm

Tabla con formato

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Tabla con formato

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Fuente: Cursiva

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

**Procedimiento**

- Disolver el ácido bórico en el 60% del agua, y los demás ingredientes en el 40% del alcohol.
- Verter la solución acuosa en la solución alcohólica,
- Dejar reposar la mezcla con agitación ocasional durante cuarenta y ocho horas
- Filtrar el resto del alcohol y el agua
- Añadir un colorante al gusto.

**Figura 43. Materiales utilizados para la segunda Preformulación.**



Fuente: Elaboración Propia

### formulación 2B

- Aceite esencial de tomillo 0,05g
- Propilenglicol 12g
- Glicerina 12g
- Sacarina sódica 0,06g
- Citrato de sodio 0,08
- Polisorbato 80 0,963g
- Metilparabeno 0,200g
- Propilparabeno 0,200g
- Agua destilada 77,280g

Tabla 22. Formulación para **100g de colutorio B al 0,2%**

Excipientes	Cantidad administrada	Usos
Propilenglicol	12 g	Disolvente oconservante
Glicerina	12 g	Disolvente
Metilparabeno	0,1 g	Agente antimicrobiano
Propilparabeno	0,1 g	Agente antimicrobiano
Lauril sulfato de sodio	0,2 g	Emulsificante
Sacarina sódica	0.06g	Agente edulcorante
Citrato de sodio	0.08g	Agente alcalinizante
Agua	75 g	Diluyente
Aceite esencial de <i>Thymus Vulgaris</i>	0,2g	Agente antibacteriano

(Elaboración propia, 2021)

Con formato: Sangría: Izquierda: 1,27 cm, Sin viñetas ni numeración

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

### Procedimiento

- 1) Pesar cada una de las materias primas líquidas como las sólidas.
- 2) Adicionar los solventes, preservantes y excipientes.
- 3) Adicionar cosolventes para mejorar solubilidad del aceite esencial.
- 4) Adicionar el aceite esencial seguido del solubilizante seleccionado para la incorporación de este.
- 5) Adicionar correctores organolépticos.
- 6) Realizar análisis de pH
- 7) Adicionar el colorante seleccionado para la formulación.

### Formulación C

**Tabla 23. Formulación para 100g del colutorio C al 0.5 %**

<u>Excipientes</u>	<u>Porcentaje en gramos</u>	<u>Usos</u>
Eucalipto	0.1g	Frescura
Borato de sodio	2g	Agente alcalinizador
<u>Glicerina</u>	<u>9 g</u>	<u>Disolvente</u>
<u>Sacarina sodica</u>	<u>0,05g</u>	<u>Agente edulcorante</u>
Bicarbonato de potasio	2g	Agente alcalinizador
<u>Agua</u>	<u>86g</u>	<u>Diluyente</u>
Aceite esencial <u>de thymus vulgaris</u>	<u>0,5g</u>	Agente antibacteriano
Aceite rojo de Turquía	0.4g	Emulsificante

(Elaboración propia, 2020)

### Procedimiento colutorio C

- Disolver el borax y el bicarbonato de potasio en el 50 % de agua.
- Disolver el aceite de tomillo, el aceite rojo de Turquía junto con la glicerina y el resto del agua.
- Agregar el eucalipto.
- Mezclar la solución durante 2 horas y luego filtrar la solución.

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm, Derecha: 0 cm

**Método para identificación del aceite esencial de tomillo en los colutorios A, B y C**

**Con formato:** Fuente: Negrita

**PROCEDIMIENTO:**

**Con formato:** Fuente: Negrita

**A- Prepare una disolución utilizando el patrón secundario de Aceite Esencial de Tomillo pesando 0.12 a 0.15 gramos. llévelo a un balón de 10 mL con etanol al 95%.**

**Con formato:** Ninguno

**Con formato:** Párrafo de lista, Sangría: Primera línea: 0 cm, Borde: Superior: (Sin borde), Inferior: (Sin borde), Izquierda: (Sin borde), Derecha: (Sin borde), Entre : (Sin borde), Barra : (Sin borde)

**B- Prepare una disolución de muestra, pesando 0.12 a 0.15 gramos. llévelo a un balón de 10 mL con etanol al 95%.**

**Con formato:** Ninguno

**C- Pese exactamente 1.5 g de cada disolución (patrón y muestra) en viales apropiados para el equipo Headspace. Coloque el septum y el sello metálico a cada vial, asegúrese que estos quedan bien cerrados (la tapa no debe girar), para ello utilice la herramienta apropiada.**

**Con formato:** Ninguno

**D- coloque las muestras en el carrusel del head space y cargue el siguiente método de trabajo:**

**Con formato:** Sangría: Izquierda: 1,27 cm, Sin viñetas ni numeración

**Tabla 24. Condiciones específicas del equipo Head Space para la determinación del PA**

Modo de Inyección	Split			
Relación de Split	20			
Flujo de Columna	1ml/min			
Temperatura de la Columna	80 (°C)			
Rampa de Temperaturas	Rate	Temperatura	Tiempo	
	0	--	80.0	0.00
	1	7.00	125.0	0.00
	2	20.00	225.0	4.00
	3	0.00	0.00	0.00
Tiempo Programado	15.43min.			
Temperatura del detector	250 °C			
Temperatura de la línea de la muestra	150 °C			
Temperatura de la línea de transferencia	150 °C			
Tiempo de equilibrio	5 min			
Presurización	0.5 min			
Equilibrio de Presurización	0,10 min			
Carga	0.50 min			
Equilibrio de carga	0.10 min			
Tiempo de ciclo GC	25 min			
Nivel de agitación	0			
Conteo de multi-inyección	1			
Presurización del gas presurizado	10 kPa			

Fuente: (Elaboración propia, 2021)

### Método para identificación de % de alcohol en el colutorio A

#### Procedimiento

Para el etanol, las condiciones cambian:

A-Pese exactamente 1.5 g de muestra en viales apropiados para el equipo Headspace. Coloque el septum y el sello metálico a cada vial, asegúrese que estos quedan bien cerrados (la tapa no debe girar), para ello utilice la herramienta apropiada.

B- Coloque las muestras en el carrusel del equipo Headspace y cargue el siguiente método de trabajo:

Tabla 25. Condiciones específicas del equipo head space para la determinación del % de alcohol

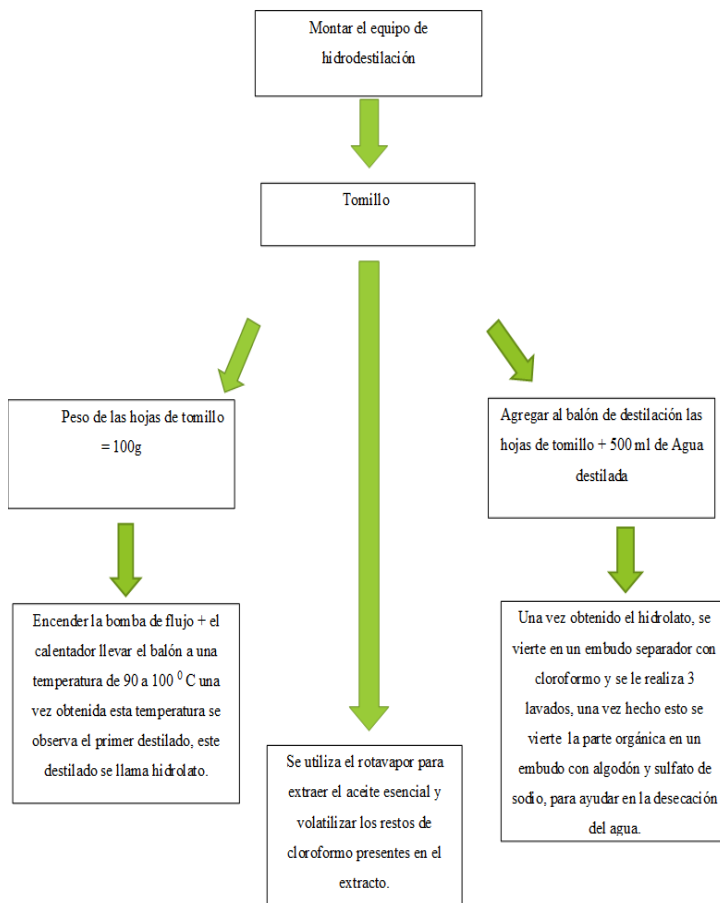
Modo de Inyección	Split			
Relación de Split	20			
Flujo de Columna	1ml/min			
Temperatura de la Columna	80 (°C)			
Rampa de Temperaturas	0	Rate	Temperatura	Tiempo
	1	--	80.0	0.00
	2	7.00	125.0	0.00
	3	20.00	225.0	0.00
	3	0.00	0.00	0.00
Tiempo Programado	15.43min.			
Temperatura del detector	250 °C			
Temperatura de la línea de la muestra	150 °C			
Temperatura de la línea de transferencia	150 °C			
Tiempo de equilibrio	5 min			
Presurización	0.5 min			
Equilibrio de Presurización	0,10 min			
Carga	0.50 min			
Equilibrio de carga	0.10 min			
Tiempo de ciclo GC	25 min			
Nivel de agitación	0			
Conteo de multi-inyección	1			
Presurización del gas presurizado	10 kPa			

Fuente: Elaboración propia, 2021

## CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

### Esquema de proceso de extracción del aceite esencial de tomillo

#### Esquema del proceso de hidrodestilación



Una vez finalizado el proceso de extracción del aceite esencial de tomillo, mediante la técnica de hidrodestilación, se obtiene el resultado mostrado en la tabla 26.

**Tabla 26. Porcentaje de rendimiento**

Método de extracción	Promedio % de rendimiento
Hidrodestilación	<u>0,50,5%</u>

Fuente: (Elaboración propia,2021)

El rendimiento de los aceites esenciales se define como la relación de gramos de aceite esencial obtenido con respecto a la cantidad en gramos de material vegetal utilizado y se calcula mediante la siguiente ecuación:  $x = \frac{m_{a.e}}{m_{MV}} \times 100$

Donde,

m a.e masa de aceite esencial en g

**Con formato:** Sangría: Izquierda: 0 cm, Primera línea: 0 cm

**Con formato:** Ninguno, Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Sin subrayado, Color de fuente: Negro, Español (España - alfabetización tradicional), Sin Elevado / Disminuido

**Con formato:** Ninguno, Fuente: (Predeterminada) Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Negro, Español (España - alfabetización tradicional), Sin Elevado / Disminuido

m M.v masa de material vegetal en g

Según McGimpsey, (1993) para cumplir los requerimientos de los estándares internacionales de calidad, el contenido mínimo en aceite esencial determinado en plantas desecadas de Tymus Vulgaris debe alcanzar el 0,5 % (5ml/ kg) si el aceite se extrae de la planta intacta, y el 0,2 % si procede de tomillo molido. También manifiesta que el aceite obtenido es de color amarillo pálido y en general, los rendimientos alcanzados oscilan entre el 0,7 % y el 2 % de la droga vegetal. Estos valores dependerán de muchos factores, como: el origen, la especie, las condiciones ambientales, climáticas, y del crecimiento de la planta, también, como la técnica de extracción empleada. Por lo tanto, para este trabajo de investigación se obtuvo un porcentaje de rendimiento de 0,2 % que se refleja a continuación:

$$0.2\% = \frac{10g}{5000g} \times 100$$

Por lo general, las destilaciones por hidrodestilación duran entre tres, cuatro o más horas, según la hierba que se trate, obteniéndose muy poca cantidad de esencia. Esto se debe a que el contenido en aceites de las plantas es bajo, y por ello hace falta destilar abundante cantidad de hierbas para obtener un volumen que justifique el gasto de destilación. Los rendimientos suelen ser menores al 1%; es decir destilando 100 kg. de hierba fresca, se obtendrá menos de 1 kg. de aceite esencial. Esto no solo obliga a optimizar la destilación, sino a contar con muchas toneladas de hierba a destilar, inclusive con muchas personas que la provean.

~~Otro aspecto importante para destacar, en cuanto al porcentaje de rendimiento mediante la técnica de hidrodestilación, es la extracción con solvente orgánico; esto produce que se pierda eantidad de la muestra; por ende, se obtiene un porcentaje de rendimiento menor.~~ Una de las razones principales del porqué se extrae el aceite esencial de tomillo de las partes aéreas de las hojas es porque, de acuerdo con normas internacionales de calidad, que para el caso del tomillo es la ISO 6754:1996, que fija: las hojas frescas de tomillo deben contener un mínimo de 0.5% de aceite esencial y molidas al menos 0.2%, y el timol debe ser el componente mayoritario.- (Alpaslan, 2013).

Se obtuvieron bajos porcentajes de rendimiento de aceite esencial comparados, con los de la bibliografía; esto es debido a que el porcentaje de aceite esencial, en las plantas de la especie del

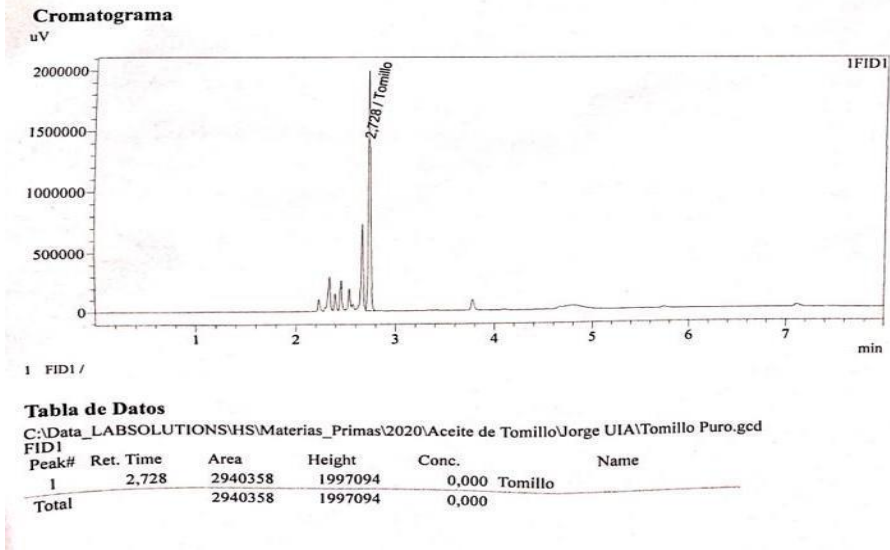
tomillo, deben recolectarse cuando se inicia la floración; además, influyen que cuando en el área de cultivo hay períodos secos y lluviosos muy definidos, la recolección se debe hacer durante el período seco, lo que permite que la planta se regenere durante el período de las lluvias. Además, los expertos en aceites esenciales refieren que, después de las lluvias, el porcentaje de aceite esencial aumenta, y además los aceites esenciales alcanzan su máxima concentración alrededor del mediodía. (Sharapin, 2000). Todos estos factores no se pudieron controlar, debido a que los proveedores de la materia prima, para la presente investigación, manifestaron que el producto era fresco, pero no recién sacado de la tierra.

#### **Cromatografía de gases (Head Space)**

Los análisis de calidad para los aceites esenciales se realizan comúnmente por cromatografía de gases. Aun cuando este método es considerado el más adecuado para analizar estos compuestos, el equipo y reactivos necesarios tienen un alto costo, y no siempre se cuenta con ellos ni con el presupuesto necesario para implementarlo. ~~Es importante tomar también en cuenta que la cromatografía de gases no tiene una respuesta lineal en todos los rangos de concentraciones, por lo que, en algunos casos, se pueda requerir el empleo de otro método.~~

La cromatografía de gases por Head Space, básicamente, lo que hace es el estudio de los componentes volátiles presentes en las plantas; una de las ventajas que presenta esta técnica es que hay tiempos cortos del análisis, y que no requiere el uso de disolventes orgánicos. La extracción se realiza dentro de un vial sellado, el cual se calienta a una temperatura constante, en este se introduce un jeringa, que contiene una fibra de sílice fundida, recubierta de una fase absorbente polimérica, en el que cubrirá la primera etapa de la extracción, la cual consiste en un reparto de los analitos entre el recubrimiento polimérico y la matriz de la muestra, mediante un equilibrio entre las fases existentes dentro del vial. La segunda etapa consiste en la adhesión de los analitos contenidos en la fibra polimérica al inyectarse en el cromatógrafo.

#### **Figura 25. Caracterización Química de Tomillo (Extracto) por Head Space**



Fuente: (Elaboración propia, 2021)



## Departamento de Calidad

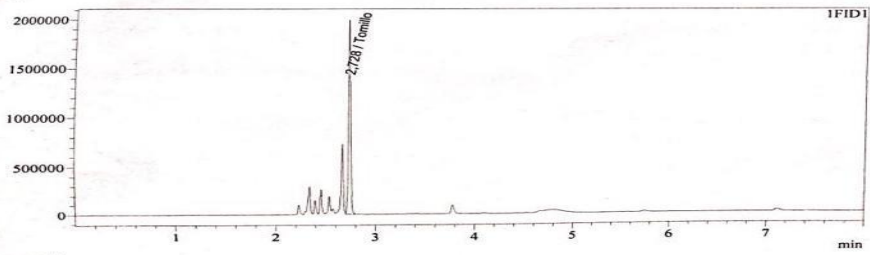
### Reporte de analisis

Nombre de la muestra: Tomillo Puro  
 Tipo de muestra: Unknown  
 ID Muestra: Tomillo Puro  
 Señal: Tomillo Puro.gcd  
 Metodo: Tomillo\_con\_Nitrogeno\_3.gcm

Fecha de la Inyeccion: 13/10/2020 02:22:07 p.m.  
 Fecha de procesado: 13/10/2020 02:30:12 p.m.

Analista: ASDRUBAL RUIZ  
 Analista: ASDRUBAL RUIZ

#### Cromatograma



1 FID1 /

#### Tabla de Datos

C:\Data\_ABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2020\Aceite de Tomillo\Jorge UIA\Tomillo Puro.gcd  
 FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	2.728	2940358	1997094	0,000	Tomillo
Total		2940358	1997094	0,000	

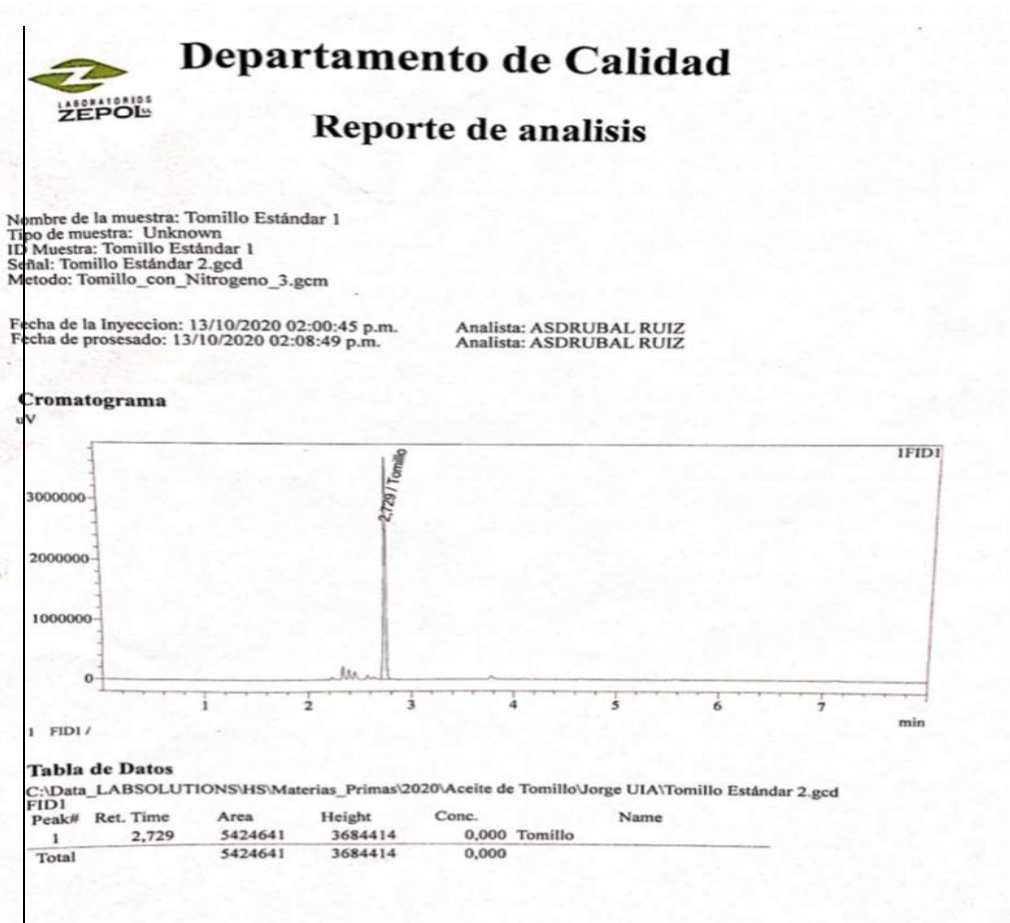
Fuente: Elaboracion Propia

Con formato: Ninguno, Español (Costa Rica), Revisar la ortografía y la gramática

Con formato: Justificado, Sangría: Primera línea: 0 cm

Con formato: Justificado, Sangría: Primera línea: 0 cm

Figura 26. Caracterización Química de Tomillo (Patrón) por Head Space



Con formato: Ninguno, Español (Costa Rica), Revisar la ortografía y la gramática

Fuente: (Elaboración propia, 2021)

Fuente: Elaboración Propia

Con formato: Justificado, Sangría: Primera línea: 0 cm

Con las condiciones especificadas en la tabla 12, del cromatógrafo de gases mencionado en la parte metodológica, a una temperatura de 250 °C se realizaron tres corridas a ocho minutos cada una, donde el primer vial era una gota del blanco; el segundo vial era una gota de la solución patrón de tomillo y el tercer vial era una gota del extracto de tomillo. Se ~~visualiza~~ ~~obtuvo~~ una relación de partición de 100 a 1; esto quiere decir que lo que se inyecta se divide en 100 partes, se desechan 99 y se inyecta solo una parte; a esto se le conoce como relación de partición del equipo. Después se ~~compara~~ ~~comparó~~ una muestra con la otra, sobreponiendo las inyecciones, y se obtuvo para el patrón de ~~timol~~ ~~tomillo~~ un tiempo de retención de 2,729 y para el extracto de tomillo un tiempo de retención de 2,728, evidenciando así que el extracto de tomillo posee, al igual que la sustancia, patrón, el pico característico del *Thymus Vulgaris*: en este caso, ese pico evidencia la presencia de timol, el cual se encuentra en mayor proporción según la monografía de la OMS sobre el *Thymus Vulgaris*.

~~Otro dato curioso fue el hecho de evidenciar que el patrón de tomillo posee mayor cantidad de compuestos químicos que el extracto; esto se puede deber a que el extracto, al usar solventes orgánicos a la hora de su extracción, pierde parte de su composición química; otra causa podría ser la adquisición de la planta en cuanto al clima, región geográfica, estado de la hierba (fresca o no tan fresca), entre otros asuntos. Hay que destacar el hecho de que la sustancia patrón, facilitada por la industria, Zepol, no contaba con la especificación del porcentaje puro del aceite; por esta razón~~

~~no se pudieron determinar los porcentajes en la composición química de los compuestos presentes en el extracto, cuán,~~

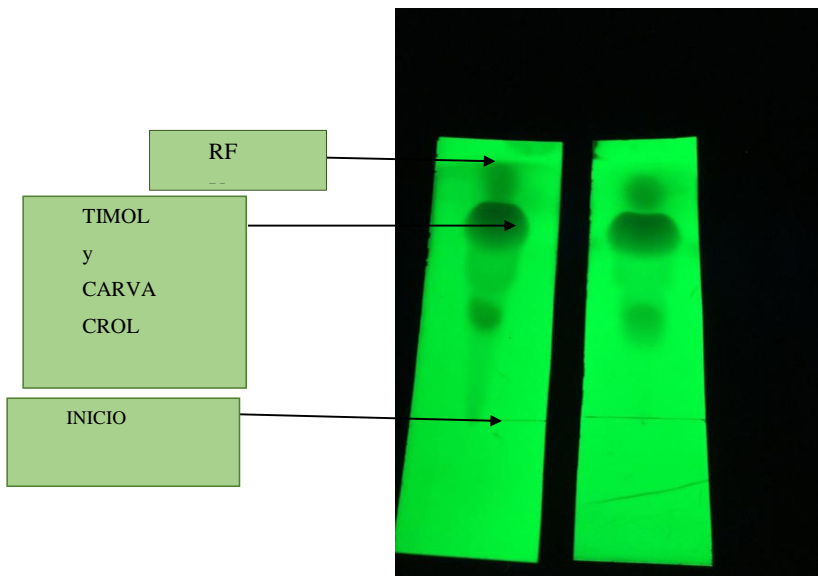
### Cromatografía de capa fina

En una placa de sílica gel de 3×10 cm, se aplicó una gota del estándar y una gota del aceite esencial de tomillo. La placa se colocó en una cámara con un eluyente compuesto de tolueno-acetato de etilo (93:7), y poder observar a luz ultravioleta, para marcar las manchas correspondientes a los compuestos del aceite esencial. Posteriormente, las placas se pusieron en beaker con un revelador de vainillina-ácido sulfúrico, y se calentó durante 5 min a 100 °C. Para obtener el valor de retención (Rf) se calculó el cociente de la distancia recorrida, desde el centro del origen, por el compuesto, entre la distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente. La distancia recorrida por el compuesto se midió desde el centro de la mancha. Se realizó la comparación correspondiente con los estándares elegidos de acuerdo con la literatura.

Los resultados revelados en las placas de sílica gel mostraron similitud en las manchas y en los valores de retención (Rf), ~~para todos los tratamientos~~. Bajo luz ultravioleta, se observó la presencia de un componente. Con la aplicación de un revelador de vainillina-ácido sulfúrico, se ~~revelaron~~~~acentuaron~~ tres componentes más. En esta prueba, para ~~ambas placas~~ ~~todos los tratamientos~~, destaca una mancha azul-verdosa, la cual, de acuerdo con Wagner y Bladt (2001), coincide con trazas de timol y carvacrol respectivamente. En la tabla 11 se describen los ~~valores~~~~tiempos~~ de retención para cada mancha observada del extracto y del patrón de aceite esencial de tomillo. Los ~~valores~~~~tiempos~~ de retención obtenidos coincidieron con los que han sido reportados en la literatura.

Con formato: Sangría: Primera línea: 1,25 cm

**Figura 27. Placa de Cromatografía patrón del aceite esencial de tomillo vs. extracto de aceite esencial de tomillo**



Fuente: (Elaboración propia, 2021)

**Tabla 27. R<sub>f</sub> obtenidos para distintas corridas cromatográficas utilizando el patrón extracto de la droga vegetal con reactivo de vainilla-ácido sulfúrico como solvente**

Muestras	R <sub>f</sub>
Patrón de aceite esencial de tomillo	0,5
Extracto de aceite esencial de tomillo	0,5

Fuente: (Elaboración propia, 2021)

La trayectoria de cada muestra en función de su factor de retardo R<sub>f</sub> se puede definir como:

$$R_f = \frac{\text{Distancia del movimiento del soluto}}{\text{Distancia del movimiento del disolvente}}$$

R<sub>f</sub> obtenidos por las distintas corridas cromatográficas utilizando el patrón de la droga vegetal con reactivo de vainilla-ácido sulfúrico como solvente:

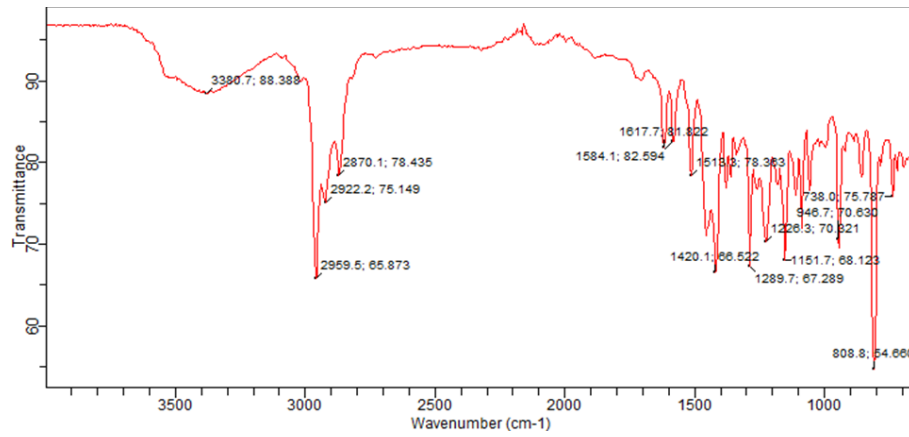
$R_f$  Patrón del aceite esencial de tomillo =  $\frac{3}{6} = 0,5$

$R_f$  obtenidos por las distintas corridas cromatográficas utilizando el patrón de la droga vegetal con reactivo de vainilla ácido sulfúrico como solvente.

$R_f$  Extracto del aceite esencial de tomillo =  $\frac{3}{6} = 0,5$

### **Espectroscopia IR**

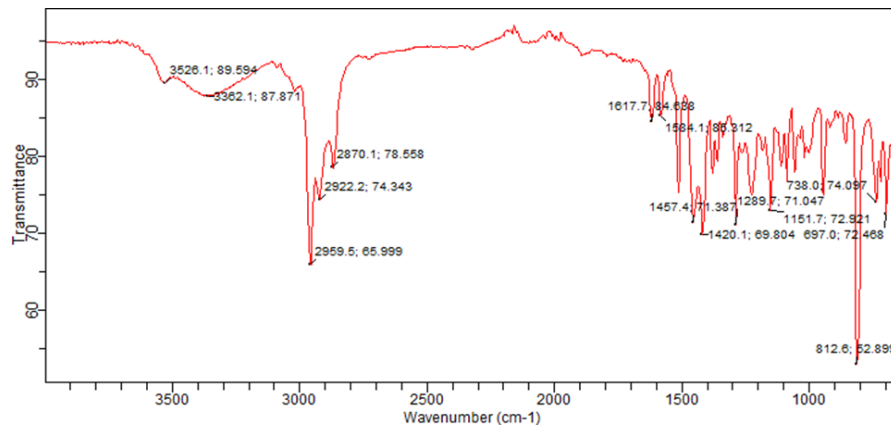
**Figura 28. Análisis cualitativo por espectroscopia infrarrojo del aceite esencial de tomillo (Patrón)**



Fuente: (Elaboración Propia, 2021)

Con formato: Título 1

**Figura 29. Espectro IR obtenido de una muestra de (extracto) del aceite esencial de tomillo**



Fuente: (Elaboración propia, 2021)

De las señales obtenidas en el espectro FTIR, expuestas en las figuras, se procede a enlistar las señales más representativas en el caso del patrón y el extracto de aceite esencial de tomillo, según el grupo funcional que corresponda.

**Tabla 28. Señales Grupos Funcionales y Región Obtenidas en el espectro IR del patrón de Tomillo**

TIPO DE MUESTRA	DE	SEÑAL DETECTADA CM <sup>-1</sup>	GRUPOS FUNCIONALES	REGIÓN DE ABSORCIÓN CM <sup>-1</sup>
PATRÓN DE TOMILLO		3380	Alcoholes OH	3400-3650
		2870	Alcano C-H	2850-2960
		1617	Alqueno C=C	1640-2000
		1420	Aromático	1450-1600

Fuente: (Elaboración propia,2021)

**Tabla 29. Grupos Funcionales y Región obtenidas en el espectro IR del extracto de Tomillo**

TIPO DE MUESTRA	SEÑAL DETECTADA CM <sup>-1</sup>	GRUPOS FUNCIONALES	REGIÓN DE ABSORCIÓN CM <sup>-1</sup>
EXTRACTO DE TOMILLO	3362	Alcoholes OH	3400-3650
	2870	Alcano C-H	2850-2960
	1513	Alqueno C=C	1640-2000
	1420	Aromático	1450-1600

Fuente: (Elaboración propia,2021)

Según los resultados obtenidos, en el espectro de infrarrojo de la muestra de aceite esencial del tomillo, se observa la primera señal de importancia en el caso del patrón de tomillo en  $3380\text{cm}^{-1}$  y del extracto en  $3362\text{cm}^{-1}$ , la cual le corresponde a un hidroxilo, donde esto es característico del grupo fenol presente en las moléculas, ya sea de carvacrol o timol, encontrado en la planta de tomillo. En cuanto a la región, comprende aproximadamente entre  $3400\text{-}3650\text{cm}^{-1}$ . En el rango de  $2850\text{-}2960\text{cm}^{-1}$  se encuentra la señal que se puede establecer como un alcano C-H  $\text{sp}^3$ , donde ambos aceites revelan la señal  $2870\text{cm}^{-1}$ ; además, se detecta una señal del patrón en  $1617\text{cm}^{-1}$  y del extracto en  $1513\text{cm}^{-1}$  correspondiente de un C=C alqueno.

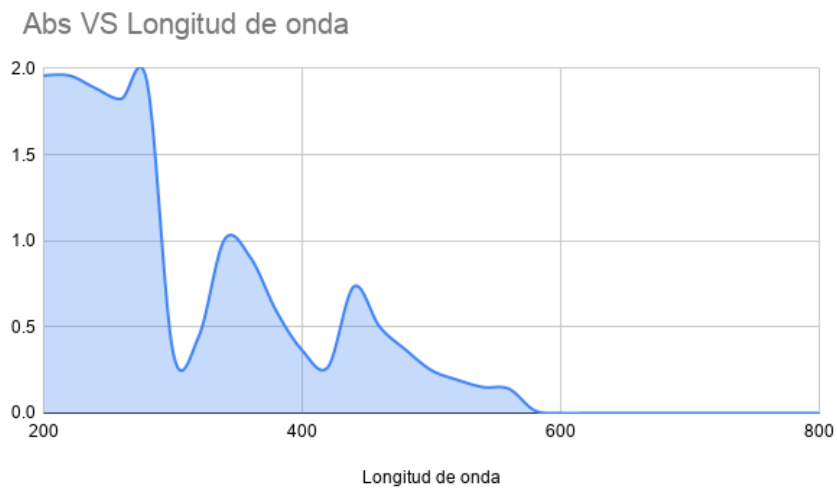
La región característica de este es alrededor de los  $1640\text{-}1680\text{cm}^{-1}$ . Una de las señales más útiles que se obtuvieron fue la del grupo isopropilo presente en ambos aceites, donde mostraron una señal en  $1420\text{cm}^{-1}$ ; esto se debe a que la región característica para este grupo funcional es cerca de  $1450\text{-}1600\text{cm}^{-1}$ . Interpretar el espectro del infrarrojo posee cierto grado de dificultad a la hora de hacerlo, debido a que casi todas las moléculas orgánicas tienen distintos movimientos de vibración de enlace y movimientos de doblamiento; por lo tanto, múltiple cantidad de absorciones.

Para efectos de este análisis, no es necesario interpretar todas las necesidades mostradas en los espectros, ya que basta con identificar los grupos funcionales más representativos de la molécula para establecer la presencia de los compuestos de interés. En este caso, los componentes

que se necesitaba identificar son el carvacrol y el timol, donde, según los resultados obtenidos en el espectro de infrarrojo, las estructuras concuerdan al existir compuestos aromáticos y alcoholes.

## UV-VISIBLE

**Figura 44. Abs vs. Longitud de onda del patrón de Tomillo**



Fuente: Elaboración propia.

En contraposición con el espectro infrarrojo, el ultravioleta no se emplea fundamentalmente para demostrar la presencia de grupos funcionales individuales, sino más bien, para establecer relaciones entre ellos, principalmente conjugación de dos o más enlaces de carbonos y anillos aromáticos, donde se pudo observar que una molécula, dependiendo de sus estados vibracionales

y rotacionales, puede ir desde cualquiera de varios subniveles; esto se traduce en la observación de las bandas de absorción. La principal diferencia entre el análisis IR y el UV es que el IR muestra muchos picos muy marcados, y el ultravioleta solo muestra algunas bandas anchas de absorción,

Con respecto al análisis por espectrofotometría ultravioleta visible, se llevó a cabo el procedimiento descrito en la parte metodológica, recolectando la información en la región comprendida desde los 200 a los 800nm.

Para lograr determinar el solvente adecuado, en el cual se disolviera la muestra y se utilizara como blanco en el equipo UV, se tomaron como referencia las propiedades físicas del timol, de las cuales, según los artículos científicos, el timol posee mayor solubilidad en presencia de etanol; se procedió a leer el blanco, como lo indica la metodología, y posteriormente se procedió a analizar cada una de las muestras, observándose, en la región visible, la ausencia de absorbancias y de picos característicos, razón por la cual se redujo en el rango de lectura desde los 200 hasta los 600nm, siendo la región ultravioleta aproximadamente en el rango de los 200 a los 450 nm, donde se observan los grupos funcionales presentes en el aceite esencial de tomillo.

En el espectro UV-VIS se observaron picos a partir de 200 a 600nm. El extracto de tomillo que se analizó no está en su composición más pura, ya que se implementaron solventes orgánicos para su extracción, pudiendo quedar trazas de compuestos orgánicos; por esta razón, no es posible observar picos definidos, ya que no corresponden a un elemento puro. En este sentido, las bandas aparecerán en rangos cercanos a los reportados por bibliografía de compuestos puros.

Según Mackay et al. (2006), los aceites vegetales están compuestos en mayor proporción por ácidos grasos, los mismos que tienen absorbancias máximas en el rango de 200 a 275nm, en relación con la primera señal de la figura 44. Se conoce que la longitud de onda de 175 a 200nm absorbe los grupos hidroxilos (OH). En el caso del patrón de tomillo, se observa un pico que comienza en los 200nm, el cual podría corresponder a compuestos hidroxilos polares; esta característica es la que le permite al timol ser ligeramente soluble en agua.

En el rango de 230 a 246 como absorbancia máxima, según Alves et al. (2018), esta señal se puede relacionar con la presencia de un anillo aromático; en los rangos de 200nm también se pueden observar alquenos; estos grupos funcionales son característicos de la molécula timol. Con respecto al UV visible del extracto de tomillo, se pudo evidenciar la presencia de alcoholes en el

rango de 200nm, la presencia de alquenos también en el rango de 200nm, y la presencia de un posible anillo aromático en un rango de 240nm.

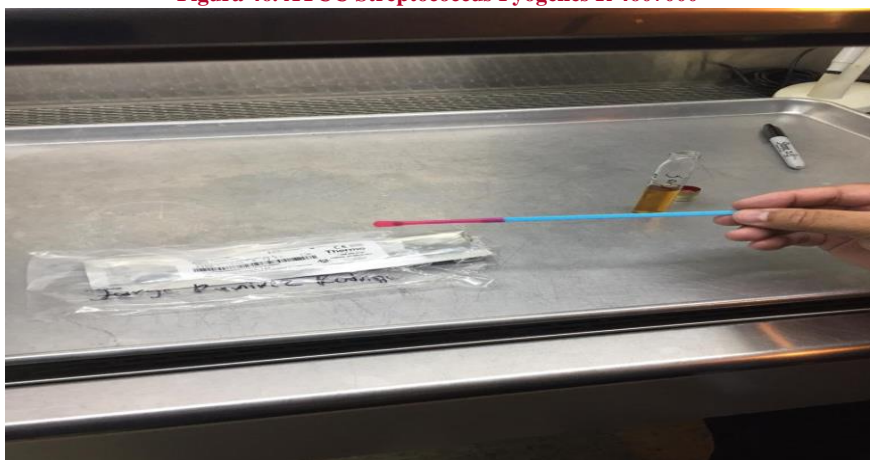
**Prueba de sensibilidad antibacteriana de los aceites esenciales de tomillo frente al *Streptococcus Pyogenes***

**Figura 45. Cepa S. Pyogenes**



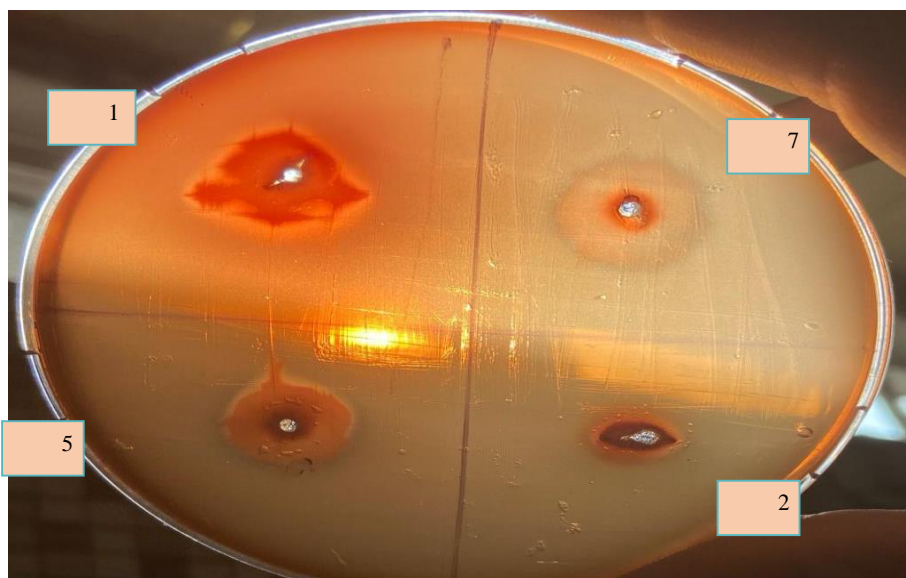
Fuente: Elaboración propia.

**Figura 46. ATCC Streptococcus Pyogenes R 4607000**



Fuente: Elaboración propia.

**Figura 47. Halos de Inhibición obtenidos con diluciones al 100%, 75%, 50% y 25% del aceite esencial de Tomillo**



Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 18. Medidas de los halos formados por diluciones del aceite esencial de Tomillo sobre la cepa del S. Pyogenes**

Porcentaje del aceite esencial de tomillo	Halos de inhibición debido a la dilución del aceite de tomillo/ mm
100%	20mm
75%	15mm
50%	13mm
25%	7mm

Fuente: Elaboración propia.

A partir de la figura 47, se logró demostrar la potente actividad antibacteriana del aceite esencial de tomillo frente al *Streptococcus Pyogenes*, el cual produce el cuadro de faringitis y amigdalitis en la cavidad oral; se puede observar y medir la formación de los halos de inhibición presentes en la placa de agar sangre. Inicialmente, se realizó el análisis en una placa de agar de Mueller Hinton, pero el *Streptococcus* no creció en dicho medio, por lo cual se utilizó una placa de agar sangre, ya que este microorganismo requiere de condiciones especiales para crecer, y la sangre es una condición especial.

Los resultados obtenidos en la tabla 18 revelan que el *Streptococcus Pyogenes* es sensible a la esencia del tomillo. El potencial antibacteriano va de acuerdo con las diluciones realizadas de los aceites, donde los halos de inhibición con diámetros menores a 8mm, según la escala de Duraffourd, mencionado por el autor Quintanilla (2016), se interpreta como una cepa de levadura resistente; por esta razón se puede determinar que el valor aproximado de la concentración mínima inhibitoria del tomillo es del ,50%, ya que presentó un halo de inhibición que superó los 8mm.

### Diseño para el desarrollo de las formulaciones

Para el desarrollo de las formulaciones se indagó, primeramente, el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 11.03.56:09, para productos farmacéuticos, productos naturales medicinales para uso humano y verificación de la calidad, el cual tiene como objetivo el establecimiento de las pruebas analíticas que deben ser realizadas para verificar la calidad de los productos naturales medicinales de uso humano por parte de la autoridad reguladora. (Reglamento Técnico Centroamericano, 2016).

Las disposiciones de este reglamento son de aplicación para todos los productos naturales medicinales de uso humano importados y fabricados en los países de la región Centroamericana, donde las directrices establecidas, deben ser aplicadas a todo producto de origen natural cuya forma farmacéutica se administre por cualquier vía excepto la oftálmica y parenteral.

Para la realización de pruebas físicas, químicas y microbiológicas, el RTCA 11.04.41:06

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

establece que deben cumplirse para formas farmacéuticas como soluciones, suspensiones y emulsiones con las siguientes pruebas. (Reglamento Técnico Centroamericano, 2013).

**Figura 30. Pruebas Soluciones, Suspensiones y Emulsiones según RTCA**

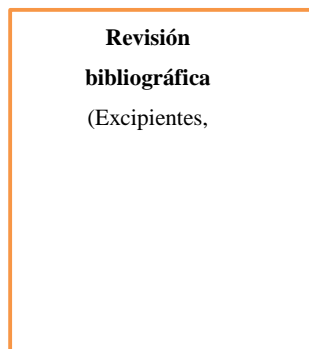
Soluciones, Suspensiones y Emulsiones	<ul style="list-style-type: none"> <li>● <u>Características Organolépticas</u></li> <li>● <u>Volumen de entrega</u></li> <li>● <u>pH</u></li> <li>● <u>Densidad</u></li> <li>● <u>Identificación general o específica</u></li> <li>● <u>Contenido alcohólico</u></li> <li>● <u>Recuento microbiano</u></li> </ul>
---------------------------------------	---

(Reglamento Técnico Centroamericano, 2013)

El RTCA 11.04.41:06, establece lo siguiente:

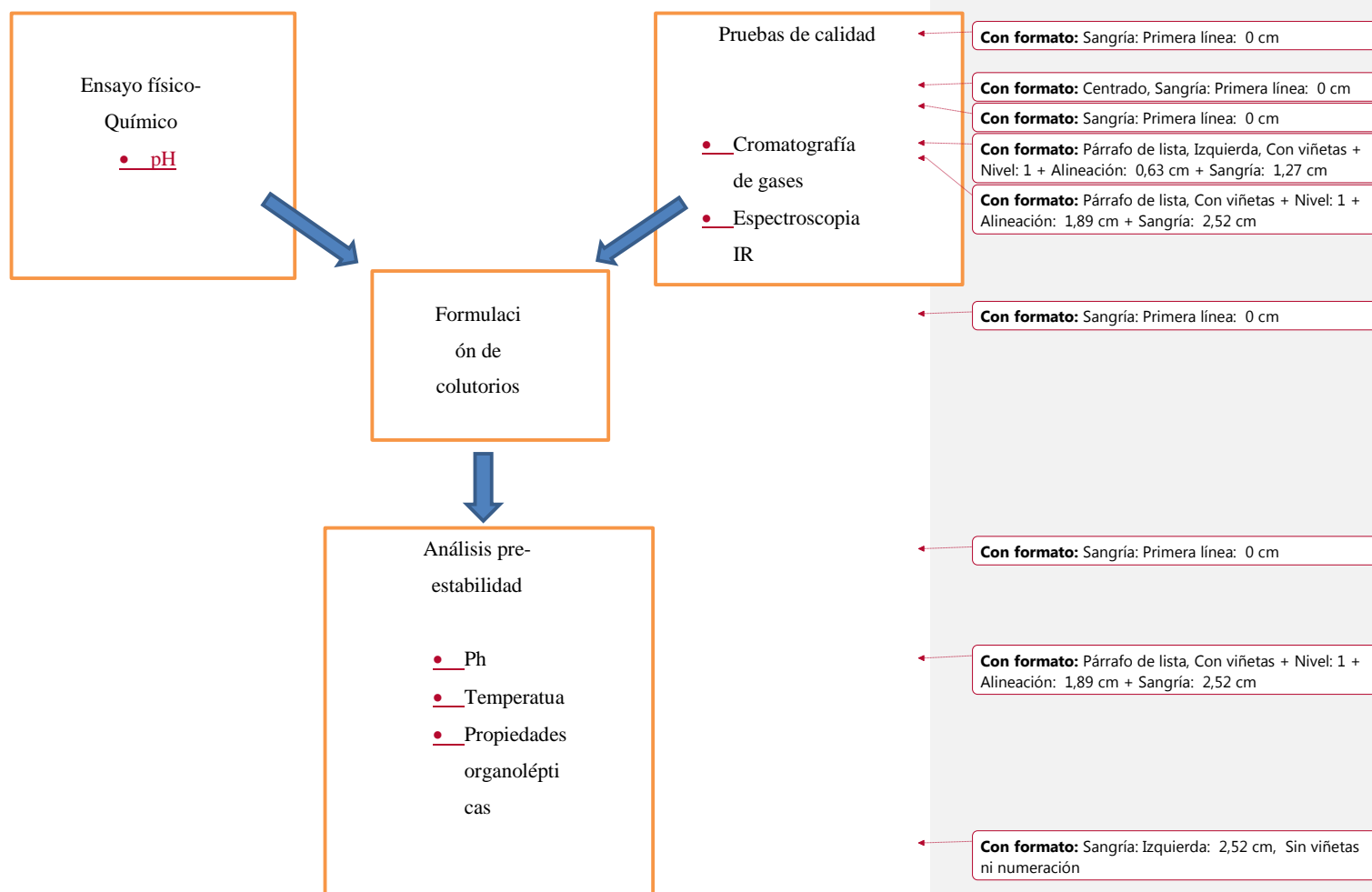
1. Estas pruebas se ejecutan cuando apliquen de acuerdo a las monografías oficiales, o en su defecto a las aportadas por el fabricante.
2. Las especificaciones de las pruebas físicas y químicas mencionadas en la tabla serán tomadas de los libros oficiales o de la literatura técnica reconocida, o en su defecto las que establezca el fabricante.
3. Las pruebas identificadas con asterisco (\*), serán realizadas a los productos naturales por vigilancia sanitaria o denuncia recibida.

### Diagrama de flujo para el diseño de las formulaciones



**Con formato:** Sangría: Primera línea: 0 cm

**Con formato:** Centrado, Sangría: Primera línea: 0 cm



**Tabla 30. Atributos que se requieren en los colutorios a base de *Tymus Vulgaris***  
**Colutorio con Aceite de *Tymus Vulgaris*.**

<b>Forma Fármaco:</b> <u>Enjuague bucal</u>		<b>Empaque primario:</b> <u>Frasco de 100 ml transparente</u>	<b>Categoría:</b> <u>producto natural</u>	
<b>Vía de Administración:</b> <u>Oral no consumible.</u>		<b>Forma de dosificación:</b> <u>Copa dosificadora</u>		
<b>Perfil de producto</b>				
<b>Características</b>	<b>Atributo</b>	<b>Estándares</b>	<b>Datos esperados</b>	
<b>Desempeño- Apariencia</b>	<b>Sabor</b>	<u>No irritante.</u> <u>No picante.</u> <u>Sensación agradable de uso.</u>	<u>Tolerable</u>	
	<b>Aroma</b>	<u>Característico</u>	<u>Característico de tomillo</u>	
	<b>Transparencia</b>	<u>Transparente</u>	<u>Traslucido</u>	
	<b>Color</b>	<u>A gusto</u>	<u>A gusto</u>	
	<b>Partículas extrañas precipitaciones</b>	<u>Ausencia de partículas extrañas</u> <u>-----</u>	<u>Ausencia de partículas extrañas</u> <u>Ausencia</u>	<u>-</u>
	<b>Físicos- Químicas</b>	<b>pH</b>	<u>6 - 7.0</u>	<u>6 - 7.0</u>
	<b>Densidad</b>	<u>A realizar</u>	<u>A realizar</u>	
<b>Pruebas microbiológicas</b>	<b>Aerobios</b>	<u>0 UFC</u>	<u>0 UFC</u>	

(Elaboración propia, 2021)

**Tabla 34. Análisis de riesgos de colutorios formulados (A, B, C)**

<u>Elementos del O TPP</u>		<u>Objetivo</u>	<u>¿Es un COA?</u>	<u>Justificación</u>
<u>Atributos físicos</u>	<u>Apariencia</u>	<u>Incoloros en las 3 formulaciones, presenta consistenciay forma agradable.</u>	<u>NO</u>	<u>No se relacionan directamente con la seguridad y eficacia del producto. Por lo tanto, no representan atributos críticos de calidad.</u>
	<u>Olor</u>	<u>Presentan un fuerte olor a tomillo</u>	<u>No</u>	<u>El olor no se relaciona directamente con la seguridad y eficacia, pero este puede afectar la aceptabilidad en el paciente. En cuanto a la formulación, los excipientes utilizados no presentan mal olor, pero el extracto de <i>Tymus vulgaris</i> si, no obstante, este se encuentra lo suficiente diluido entre los diferentes excipientes utilizados.</u>
	<u>Envasado</u>	<u>Envase plástico</u>	<u>Si</u>	<u>Las muestras piloto al poseer aceite esencial de tomillo y mantenerse en envase plástico el cual no protege al PA de sufrir desnaturalización por la luz solar, puede afectar la eficacia y seguridad del paciente, por lo cual se considera un CQA</u>
<u>Identificación</u>		<u>Cromatografía gases:</u>	<u>Si</u>	<u>Al representar evidencia de <u>timol</u> en los</u>

	<p><u>Colutorio A: se evidencia la existencia de timol en la muestra.</u></p> <p><u>Colutorio B: se evidencia la existencia de timol en la muestra.</u></p> <p><u>Colutorio C: se evidencia la existencia de timol en la muestra</u></p>		<p><u>colutorios de <i>tymus vulgaris</i>, lo califica como un CQA debido a que representaría seguridad y eficacia terapéutica en el paciente.</u></p>
	<p><u>IR: Espectro de absorción del extracto coincide con el espectro estándar de <i>Thymus Vulgaris</i> de las muestras.</u></p>	<p><u>SI</u></p>	<p><u>Al coincidir el espectro de absorción (Extracto) con el estándar de tomillo, lo califica como un CQA debido a que podría representar seguridad y eficacia terapéutica en el paciente al contar con contenido de <i>Tymus Vulgaris</i></u></p>
<p><u>Ensayos específicos:</u></p>	<p><u>pH</u></p> <p><u>Colutorio A:</u></p> <p><u>Colutorio B:</u></p> <p><u>Colutorio C:</u></p>	<p><u>Sí</u></p>	<p><u>Presencia de pH elevado puede representar atributos críticos sobre el paciente al exponerse al producto.</u></p>

	<u>% de alcohol</u>	<u>Si</u>	<u>Porcentaje elevado de alcohol puede representar atributos críticos en la seguridad y eficacia sobre el paciente al exponerse al producto.</u>
	<u>Límites microbianos</u>	<u>Si</u>	<u>Si, ya que las formulaciones al presentar microorganismos presentes estos pueden afectar la seguridad del paciente y la eficacia de los productos.</u>
<u>Concentración del extracto utilizado: 0,1% 0,2 % 0,5 %</u>			

(Elaboración propia, 2020)

**Plan de mitigación de riesgos en las formulaciones**

<u>Elementos del QTPP</u>	<u>Objetivo</u>	<u>Es un CQA</u>	<u>Solución</u>
<u>Envasado</u>	<u>Envase plástico</u>	<u>Si</u>	<u>Utilizar envases ambar para proteger el PA de la luz solar ya que puede sufrir desnaturalización y así afectar la seguridad y eficacia del producto</u>
<u>Identificación</u>	<u>Cromatografía de gases</u>	<u>Si</u>	<u>Verificar que los productos contengan el PA para de esta forma garantizar seguridad y eficacia del producto</u>
<u>Ensayos específicos</u>	<u>pH</u>	<u>Si</u>	<u>Asegurarse que el pH de las formulaciones no sea muy ácido ya que este puede causar daño en la mucosa oral y también el microorganismo de estudio vive mayormente en ambientes ácidos, proporcionarles a las formulaciones excipientes que ayuden a alcalinizar las soluciones.</u>

	<u>% de alcohol colutorio A</u>	<u>si</u>	<u>Asegurarse que la composición alcohólica de las formulaciones no sea muy alto, ya que puede causar irritación de la mucosa oral, también asegurarse que el porcentaje de alcohol sea menor de 60 % ya que según el handbook de excipientes a esta concentración el etanol tiene efecto antibacteriano y de esta forma no puede garantizarle al paciente que el efecto antibacteriano lo posee el PA y no el alcohol, para esto se pretende utilizar un concentración de alcohol al 46 % para garantizarle al paciente seguridad y eficacia</u>
	<u>Limites microbianos</u>	<u>Si</u>	<u>Realizar a las formulaciones un recuento de microorganismos aerobios y anaerobios para demostrar la seguridad del producto.</u>

## Formulaciones

### Elección de la forma farmacéutica y fórmula idónea

Se escogió el colutorio, ya que lo componen líquidos limpios transparentes, que alcanzan un efecto refrescante y desodorante de forma no agresiva para la mucosa de la boca y los dientes, con el fin de ejercer una acción local antiséptica, astringente o calmante; también porque esta forma farmacéutica resulta fácil a la hora de la preparación ~~u, n, y es relativamente rentable a la hora de la producción.~~

~~El criterio de selección de la fórmula ideal fue sobre la base del cumplimiento de las características organolépticas del colutorio; se realizaron dos preformulaciones, con el fin de discutir cuál sería una mejor opción terapéutica. La información recopilada es bibliográfica y experimental; la parte bibliográfica tiene interés, para así tener un acercamiento a la fórmula final a desarrollar, donde los datos investigados son las propiedades fisicoquímicas de los excipientes y activos a utilizar.~~

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

Estas formulaciones presentan las concentraciones de 0.1%, 0.2% ~~y 0.05%~~, y 0.5 % respectivamente, de aceite esencial de Thymus Vulgaris. La cual según la OMS Además, estas concentraciones de uso cumplen con el criterio crítico de sabor tolerable para su uso, sin dejar sensación desagradable en la cavidad oral. Otro aspecto importante que cumple ambas formulaciones es que son traslúcidas, lo cual es un indicativo de que los componentes de la fórmula se han incorporado a la solución. Se logró darles a las formulaciones un color que familiarizara al usuario con el origen del colutorio, un aroma característico a tomillo, que orienta al usuario para saber que el producto es de origen natural.

#### **Elección y discusión sobre los excipientes utilizados**

Se utilizó el Handbook of pharmaceutical excipients, en su sexta edición (2009), como referencia primordial para conocer los excipientes y las proporciones adecuadas de estos, para formular el colutorio y obtener un producto homogéneo. En este manual se indican los usos y las concentraciones de excipientes que se utilizan para dicho uso, además de incompatibilidades con otras sustancias, estabilidad del excipiente y sus especificaciones de acuerdo con las diferentes farmacopeas.

Un aspecto clave, que fue el punto de partida a la hora de pensar en desarrollar una preformulación, fue el tema de la solubilidad, ya que esta es importante para lograr una solución traslúcida, criterio crítico a cumplir para que un colutorio sea adecuado para su uso; para esto se consultaron las tablas de solubilidad de los excipientes en agua, ya que este es el vehículo para utilizar mayormente. Un aspecto crítico para lograr una solución traslúcida es la incorporación del aceite en agua; para esto se utilizó un solubilizante o surfactante, que tuviera un HLB alto, ya que esto significa proporcionar a la solución un Balance Hidrofílico y Lipofílico estable. Todo esto fue posible desarrollarlo mediante la consulta bibliográfica de los excipientes del colutorio a desarrollar.

#### **formulación 1**

Se utilizo ~~oaron mentol~~ y salicilato de metilo y aceite de coco, como aromatizantes o potenciador ~~es~~ del olor; también porque ofrecen ~~una~~ sensación refrescante y el aceite de coco funciona como un sustituyente de un HBL natural ya que impide la separación entre el agua y el aceite de tomillo; se incorporó el ácido bórico como conservante antimicrobiano; también porque posee buena capacidad amortiguadora para controlar el ~~pH.Ph~~. El etanol se utilizó como vehículo disolvente de los principios activos, para que el etanol posea efecto antibacterial debe estar en un

rango de 60 a 90 % según el handbook de excipientes, lo cual en esta formulación se encuentra en un 46 %, Sin embargo, se sabe que, al igual que otros productos, no está exento de ciertos efectos secundarios.

El alcohol a elevadas concentraciones puede tener efectos lesivos en la mucosa, por lo que no se recomienda en pacientes con alguna patología bucal; por esta razón se realizó una segunda y una tercera formulación libre de alcohol; en cuanto a la adición del aceite esencial, se observó una solución translúcida, lo cual significa que hubo buena solubilidad del principio activo con los excipientes; tampoco se observaron precipitados.

**Tabla 31. Excipientes para formulación del colutorio A**

<u>Excipientes</u>	<u>Función</u>
Salicilato de metilo y eucalipto	Frescura
Ácido bórico	Conservante antimicrobiano. (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, p. 68).
Alcohol etílico	Disolvente o como conservante antimicrobiano. Usos de alcohol. Concentración de uso (% v/v) Desinfectante 60–90% (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, p.18).
Aceite de coco	Emulsificante HLB natural, evita la separación del aceite y el agua (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, p. 184)
Aceite esencial de tomillo	Agente antibacteriano
Agua	Diluyente

(Elaboración propia, 2020)

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Derecha: 0 cm, Espacio Antes: 0 pto, Interlineado: Exacto 13,75 pto, Punto de tabulación: No en 7,65 cm

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Español (Costa Rica)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Con formato: Español (Costa Rica)

Con formato: Español (Costa Rica)

Con formato: Español (Costa Rica), Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Español (Costa Rica)

Con formato: Español (Costa Rica), Sin Expandido / Comprimido

Tabla con formato

Con formato: Español (Costa Rica)

Con formato: Español (Costa Rica)

Con formato: Español (Costa Rica)

Tabla con formato



**Figura 48. Preformulación 1**



Fuente: Elaboración propia.

### Formulación 2

La glicerina se incorporó como excipiente, por su propiedad de ser codisolvente y levemente edulcorante, ~~aproximadamente 0,6 veces más dulce que la sacarosa~~. Los preservantes utilizados fueron el propilparabeno y metilparabeno, los cuales se encargaron de evitar la proliferación de microorganismo en la solución, manteniendo conservado el producto, evitando así ~~el crecimiento microbiano su descomposición~~; la razón de usar estos conservantes juntos es porque, según el Handbook de excipientes (p. 441), menciona que la actividad antimicrobiana del metilparabeno y otros parabenos es considerablemente reducida en presencia de tensioactivos no iónicos, como resultado de la micelización por esta razón se decidió usar un agente tensioactivo aniónico como el lauril sulfato de sodio. Se podrá incorporar propilenglicol, por su propiedad de ser codisolvente, el cual ayudará a potencializar la acción antimicrobiana de los parabenos. Se adicionó sacarina sódica como coadyuvante de la dulzura, ya que se desea garantizar un buen sabor, para que su administración sea más agradable.

Como solubilizante, se utilizó ~~lauril sulfato de sodio polisorbato 80~~ para obtener una solución ~~líquida~~ transparente, y por ser un solubilizante de HLB alto, el cual es esencial para obtener una solución límpida, ya que ayuda a que el aceite y el agua permanezcan unidos, pero el SLS puede ser irritante en caso de existir dos condiciones: Se presenta en altas concentraciones y se deja en la piel durante un periodo prolongado. Por esta razón, solo se utilizó SLS en los niveles necesarios (0,5%) concentración mínima según el Handbook de excipientes para que cumpla con su propósito previsto. El citrato de sodio se incorporó por ser necesario para modificar el pH, ya que actúa como agente alcalinizante. ~~Estas formulaciones se encuentran en la categoría de producto natural, ya que presenta funciones farmacológicas la de.~~

**Tabla 32. Excipientes para formulación de colutorio B**

<u>Excipientes</u>	<u>Función</u>
<u>Lauril sulfato de sodio</u>	<u>Agente tensioactivo anionico, como agente emulsionante forma bases autoemulsionates la concentración de uso en soluciones orales es de 0.5 – 2.5 % (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, p. 651).</u>
<u>Sacarina sódica</u>	<u>Agente edulcorante su potencia edulcorante es aproximadamente 300- 600 veces la de la sacarosa. La concentración de uso en soluciones orales se utiliza en un rango de 0.075- 0.6%. (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, p.608 ).</u>

Con formato: Sangría: Primera línea: 0 cm

Con formato: Color de fuente: Texto 1

Con formato: Español (Costa Rica)

Con formato: Derecha: 0 cm, Espacio Antes: 0 pto, Interlineado: Exacto 13,75 pto, Punto de tabulación: No en 7,65 cm, Posición: Horizontal: 0,96 cm, Con relación a: Columna, Vertical: 0 cm, Con relación a: Párrafo, Horizontal: 0,25 cm, Ajuste automático

Con formato: Color de fuente: Rojo

Con formato: Español (Costa Rica)

Con formato: Español (Costa Rica)

Tabla con formato

Con formato: Derecha: 0,17 cm, Interlineado: 1,5 líneas, Posición: Horizontal: 0,96 cm, Con relación a: Columna, Vertical: 0 cm, Con relación a: Párrafo, Horizontal: 0,25 cm, Ajuste automático

<u>Propilenglicol</u>	<u>Disolvente o conservante. Es un disolvente mejor que la glicerina ya que disuelve con facilidad fenoles la concentración de uso en soluciones orales va de 10- 25 %. (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, p. 592).</u>
<u>Glicerina</u>	<u>En soluciones orales, la glicerina se utiliza como disolvente, edulcorante agente, conservante antimicrobiano y agente que aumenta la viscosidad como conservante microbiano a una concentración de &lt; 20 (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, p. 283).</u>
<u>Metilparabeno</u>	<u>Agentes antimicrobianos en formulaciones farmacéuticas debido a su eficacia en un amplio rango de pH el uso de parabenos, representa eficacia contra levaduras y mohos en soluciones orales y suspensiones para el propilparabeno a concentraciones de 0.02%, en el caso también del metilparabeno, se establece su uso a nivel oral en concentraciones de 0.015.-0.2%, (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, p. 442 &amp; 596).</u>
<u>Propilparabeno</u>	
<u>Citrato de sodio</u>	<u>Agente alcalinizante, se utiliza para ajustar el pH de soluciones, su uso como agente de almacenamiento de bufer se usa a una concentración de 0.3- 2.0% (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, p. 640).</u>
Agente esencial de tomillo	Agente antibacteriano.
Agua	Diluyente

(Elaboración propia, 2020)

### Formulación 3

**Tabla 33. Excipientes para formulación de Colutorio C**

<u>Excipientes</u>	<u>Función</u>
<u>Glicerina</u>	<u>En soluciones orales, la glicerina se utiliza como disolvente, edulcorante agente, conservante antimicrobiano y agente que aumenta la viscosidad como conservante microbiano a una concentración de &lt; 20 (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, p. 283).</u>
Eucalipto y salicilato de metilo	Frescura

**Con formato:** Derecha: 0,16 cm, Interlineado: 1,5 líneas, Posición: Horizontal: 0,96 cm, Con relación a: Columna, Vertical: 0 cm, Con relación a: Párrafo, Horizontal: 0,25 cm, Ajuste automático

**Con formato:** Fuente: Color de fuente: Automático

**Con formato:** Fuente: Color de fuente: Automático

**Con formato:** Sangría: Izquierda: 0 cm, Posición: Horizontal: 0,96 cm, Con relación a: Columna, Vertical: 0 cm, Con relación a: Párrafo, Horizontal: 0,25 cm, Ajuste automático

**Con formato:** Fuente: Color de fuente: Automático

**Con formato:** Color de fuente: Automático

**Con formato:** Color de fuente: Texto 1

**Con formato:** Justificado, Derecha: 0,17 cm, Espacio Antes: 0,05 pto, Interlineado: 1,5 líneas, Punto de tabulación: No en 7,65 cm

Sacarina sódica	Agente edulcorante su potencia edulcorante es aproximadamente 300- 600 veces la de la sacarosa. La concentración de uso en soluciones orales se utiliza en un rango de 0.075-0.6% (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, p.608).
Borato de sodio	Agente alcalinizador; conservante antimicrobiano; agente de almacenamiento en búfer, desinfectante; agente emulsionante; agente estabilizador. Uso en enjuagues bucales (0,3% w/v) (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, p. 633).
Bicarbonato de potasio	Agente alcalinizador; agente terapéutico. (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2009, p. 570).
Aceite esencial de tomillo	Agente antibacterial
Aceite rojo de turquia	Emulsificante, impide la separación del agua y el aceite.
Agua	Diluyente

(Elaboración propia, 2020)

Se utilizo ~~el aron-mentol y~~ salicilato de metilo y eucalipto, como aromatizantes o potenciadores ~~es~~ del olor; también porque ofrecen una sensación refrescante, se incorporó el borato de sodio como conservante antimicrobiano, se utilizó el bicarbonato de potasio porque posee buena capacidad amortiguadora para controlar el ~~pH.PH~~ La glicerina se incorporó como excipiente, por su propiedad de ser codisolvente y levemente edulcorante, se utilizó como emulsificante el aceite rojo de Turquía ya que es un HLB natural al ser un sustituto natural del Tween 20, básicamente lo que hace es mejorar la solubilidad del agua y el aceite esencial de tomillo, cabe destacar que el color de la solución en parte fue por este aceite rojo de Turquía que desprende un color rojizo.

### Medicamentos para mucosas prueba de calidad del producto

Por otra parte, para los propósitos de distinción taxonómica de formas farmacéuticas por vía de administración, la vía mucosa de administración de medicamentos se subdivide en siete superficies de membrana, las cuales se caracterizan como óticas, oftálmicas, nasales, orofaríngeas, uretrales, vaginales y rectales. Cuando se pretende generar una acción local, por lo regular no se desea la absorción sistémica la cual además es innecesaria para el efecto terapéutico. No obstante, en algunos casos, se usa la administración de un medicamento por vía mucosa para absorción

#### Tabla con formato

Con formato: Derecha: 0,17 cm, Espacio Antes: 0,05 pto, Interlineado: 1,5 líneas

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

Con formato: Sin Expandido / Comprimido

sistémica debido a que evita el metabolismo de primer paso, ya que provee una administración sistémica más rápida, o representa una alternativa cuando la administración oral no es posible debido a una enfermedad.

Para esto se utilizó el reglamento general de pruebas de calidad de medicamentos para mucosas de la USP capítulos generales, mediante el desarrollo de los colutorios se pretendió utilizarlos para tratar la vía orofaríngea en la cual la USP indica que en la actualidad no existen pruebas específicas para realizarle a esta vía. Las cuales se representan en la siguiente tabla.

**Tabla 36. Medicamentos administrados por la vía orofaríngea pruebas específicas**

<p><u>Soluciones (enjuagues)</u></p>	<p><u>En la actualidad no existen pruebas específicas a realizar (pueden aplicar requisitos adicionales específicos de las monografías)</u></p>
--------------------------------------	---

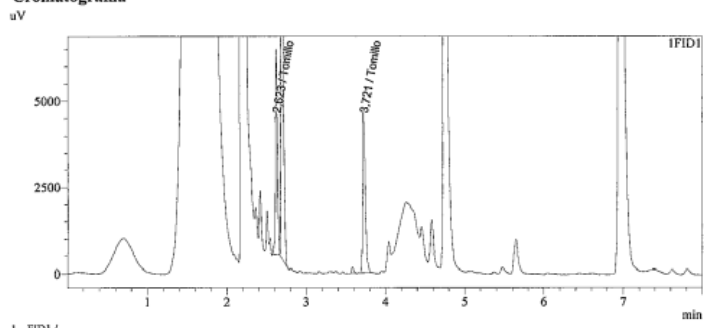
(Elaboración propia, tomado de USP capítulos generales cuadro # 3)

### Análisis de calidad de formulaciones

#### Identificación de PA en los colutorios A, B y C

Mediante el equipo Head Space a las condiciones especificadas en la tabla 24, se logró identificar el PA (Timol) en las formulaciones A, B y C

**Figura 31. Identificación de Timol en el colutorio A**

**Cromatograma****Tabla de Datos**

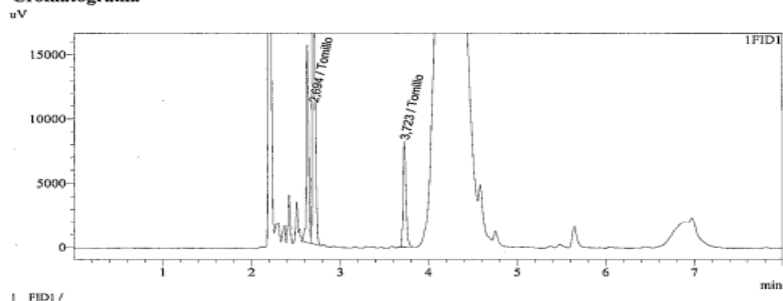
C:\Data\_LABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Tomillo\Colutorio\Colutorio A.ged

FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	2,623	9753	5973	0,000	Tomillo
2	2,693	34210	20728	0,000	
3	3,583	296	160	0,000	
4	3,721	10518	4694	0,000	Tomillo
Total		54778	31555	0,000	

Fuente: (Elaboración propia, 2021)

**Figura 32. Identificación de Timol en el colutorio B**

**Cromatograma****Tabla de Datos**

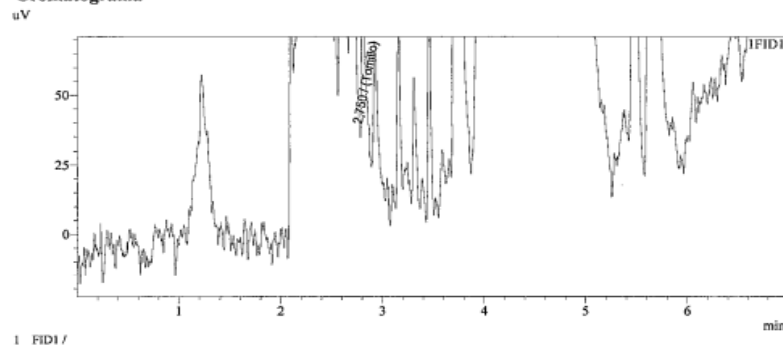
C:\Data\_ABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Tomillo\Colutorio\Colutorio B.gcd

FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	2,625	26339	15388	0,000	
2	2,694	79399	47064	0,000	Tomillo
3	3,723	18469	8259	0,000	Tomillo
Total		124207	70710	0,000	

Fuente: (elaboración propia, 2021)

Figura 33. Identificación de Timol en el colutorio C

**Cromatograma****Tabla de Datos**

C:\Data\_ABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Tomillo\Colutorio\Colutorio C.gcd

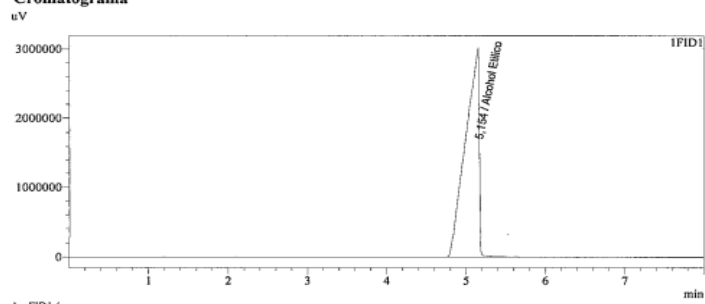
FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	2,750	0	0	0,000	Tomillo
2	7,250	0	0	0,000	Tomillo
Total		0	0	0,000	

Fuente: (Elaboración propia, 2021)

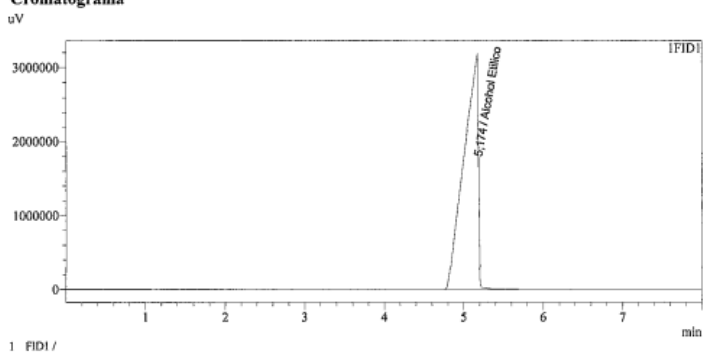
**Determinación del porcentaje de alcohol en el colutorio A**

Figura 34. Muestra estándar 1 de etanol al 40 % vs muestra 1 del colutorio A

**Cromatograma****Tabla de Datos**

C:\Data\_LABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Etanol\Colutorio\Etanol Estandar 40%-1.gcd  
FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	5,154	36054983	3023051	0,000	Alcohol Etílico
Total		36054983	3023051	0,000	

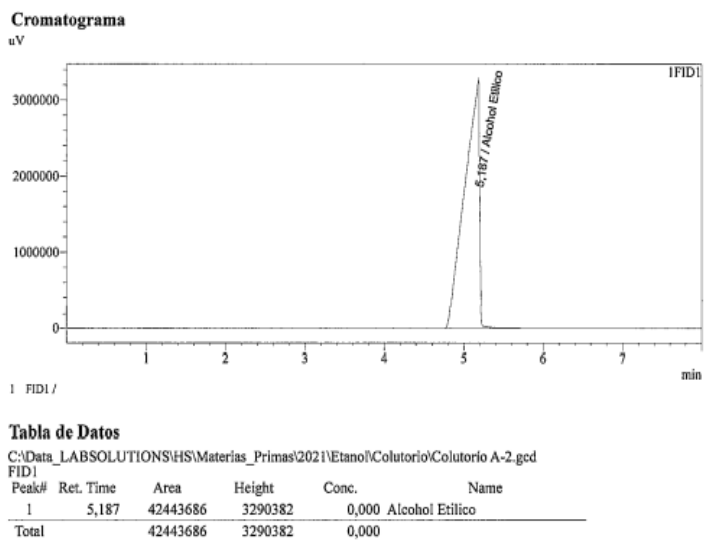
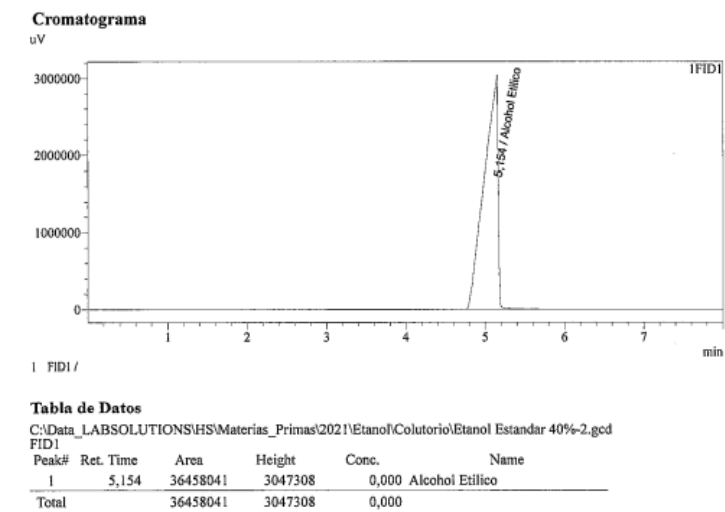
**Cromatograma****Tabla de Datos**

C:\Data\_LABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Etanol\Colutorio\Colutorio A-1.gcd  
FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	5,174	40104468	3182027	0,000	Alcohol Etílico
Total		40104468	3182027	0,000	

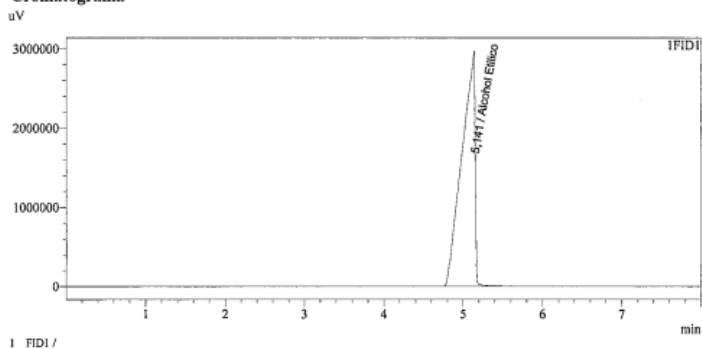
Fuente: (Elaboración propia, 2021)

**Figura 35. Muestra estándar 2 de etanol al 40 % vs muestra 2 del colutorio A**



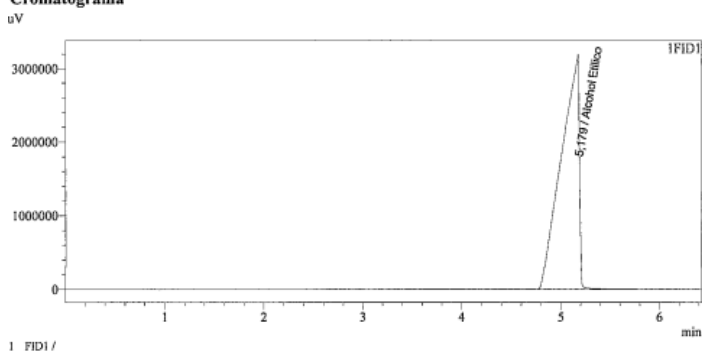
Fuente: (Elaboración propia, 2021)

Figura 36. Muestra estándar 3 de etanol al 40 % vs muestra 3 del colutorio A

**Cromatograma****Tabla de Datos**

C:\Data\_LABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Etanol\Colutorio\Etanol Estandar 40%-3.gcd  
FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	5,141	34448081	2973264	0,000	Alcohol Etílico
Total		34448081	2973264	0,000	

**Cromatograma****Tabla de Datos**

C:\Data\_LABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Etanol\Colutorio\Colutorio A-3.gcd  
FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	5,179	40496609	3195387	0,000	Alcohol Etílico
Total		40496609	3195387	0,000	

Fuente: (Elaboración propia, 2021)

**Tabla 37. Cálculos para determinar el % de alcohol del colutorio A**

## Estándar alcohol

Área 1	36054983
Área 2	36458041
Área 3	34448081

PROMEDIO	35653701,67
DESV	1063369,565
RSD	2,982494146

Muestras	Área	Porcentaje
Muestra colutorio A 1	40104468	45,0
Muestra colutorio A 2	42443686	47,6
Muestra colutorio A 3	40496609	45,4
Colutorio A	Promedio % de alcohol	46,0

Mediante el equipo Head Space a las condiciones especificadas en la tabla 25 se comparó un estándar de etanol al 40 % y las muestra del colutorio A, donde se logra visualizar los distintos tiempos de retención obtenidos para las distintas muestras y mediante el cálculo de las áreas tanto del estándar de etanol y las muestras (colutorios) se obtuvo un promedio de 35653701,67, un porcentaje de desviación estándar de 1063369,565 y una desviación estándar relativa de

2,982494146, se obtuvo un promedio de 46 % en la composición alcohólica del colutorio A.

Figura 37. Recuento de microorganismos anaerobios en los colutorios A, B y C

REPORTE DE LABORATORIO				
MUESTRA (s)	ANALISIS-DESCRIPCION	RESULTADOS	UNIDAD	OTROS
I. Colutorio A	Recuento total Aerobico	< 10	UFC/mL	BAM FDA

REPORTE DE LABORATORIO				
MUESTRA (s)	ANALISIS-DESCRIPCION	RESULTADOS	UNIDAD	OTROS
I. Colutorio B	Recuento total Aerobico	< 10	UFC/mL	BAM FDA

REPORTE DE LABORATORIO				
MUESTRA (s)	ANALISIS-DESCRIPCION	RESULTADOS	UNIDAD	OTROS
I. Colutorio C	Recuento total Aerobico	< 10	UFC/mL	BAM FDA

Fuente: (Elaboración propia, 2021)

#### Determinación de pruebas fisicoquímicas de los colutorios A, B y C

pH: Para la determinación de este, se pretendía obtener soluciones con Ph mayor a 5 para de esta forma garantizar que los colutorios no fueran medios ácidos ideales para el crecimiento microbiano donde el pH normal de la saliva es de 7,4 por lo tanto, la saliva sana puede ser ligeramente ácida o ligeramente alcalina, por lo que se ubica entre 5.6 y 7.9, si desciende por debajo de 5.6 genera un entorno en donde existe la falta de oxígeno lo que implica un riesgo porque el *Streptococcus Pyogenes* prospera en este tipo de ambiente.

#### Valores de pH



**Tabla 38. Características de los colutorios elaborados**

	<u>Colutorio A</u>	<u>Colutorio B</u>	<u>Colutorio C</u>
<b>Organolépticas</b>			
<u>Color</u>	<u>verde oscuro</u>	<u>verde claro</u>	<u>Rojo</u>
<u>Olor</u>	<u>tomillo alcohólico</u>	<u>tomillo</u>	<u>tomillo</u>
<u>Sabor</u>	<u>Picante</u>	<u>Picante</u>	<u>Picante</u>
<u>Apariencia</u>	<u>Líquido transparente</u>	<u>Líquido transparente</u>	<u>Líquido transparente</u>
<b>Físico-Químicas</b>			
<u>Densidad</u>	A realizar	A realizar	A realizar
<u>PH</u>	6	6	7
<b>Microbiológicas</b>			
<u>Aerobios totales</u>	<u>&lt;10 UFC</u>	<u>&lt;10 UFC</u>	<u>&lt;10 UFC</u>

Fuente: (Elaboración propia,2021)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, Negrita, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, Negrita, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Sin Negrita, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Sin Negrita, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Color de fuente: Automático

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Con formato:** Fuente: Times New Roman, 12 pto, Color de fuente: Automático, Español (España)

**Figura 39. Colutorios preparados**

Fuente: (Elaboración propia, 2021)

#### **Figura 49. Preformulación 2**

Fuente: Elaboración propia.

#### **Figura 50. Presentación final de las formulaciones**

#### **Fuente: Elaboración propia. Análisis de Pre-estabilidad de formulaciones**

Para efecto de esta investigación experimental, se analizaron parámetros de calidad en los 3 productos elaborados, dado que la calidad de ellos cambia con el tiempo, dependiendo por ejemplo de factores ambientales que pueden causar afectación como lo es el caso de la temperatura, humedad y la luz quienes logran en muchos aspectos incidir en las formulaciones de manera negativa afectando su calidad.

Con el objetivo de analizar posibles cambios en las muestras de los productos, se analizó la

Con formato: Nivel 1, Espacio Antes: 4 pto

exposición de estos a la luz solar durante un lapso de 72 horas, esto con el fin de realizar inspección visual de los posibles cambios organolépticos a los que se exponen los medicamentos.

**Tabla 39 Resultado de análisis de Pre-estabilidad a la luz solar**

<u>Exposición de muestras a luz solar durante 72 horas</u>	<u>Cambios Organolépticos</u>	<u>Partículas en suspensión</u>	<u>Precipitaciones imprevistas al cabo de 72 horas</u>
<u>Colutorio A</u>	<u>No se presentaron cambios en su apariencia, consistencia ni coloración.</u>	<u>Ausentes</u>	<u>Ausentes</u>
<u>Colutorio B</u>	<u>No se presentaron cambios en su apariencia, consistencia ni coloración</u>	<u>Ausentes</u>	<u>Ausentes</u>
<u>Colutorio C</u>	<u>No se presentaron cambios en su apariencia, consistencia ni coloración</u>	<u>Ausentes</u>	<u>Ausentes</u>

(Elaboración propia, 2020)

Aunque no se logró observar cambios específicos en las formulaciones cabe resaltar la importancia de mantener estos productos lejos de la luz solar y del calor, ya que cuentan con extracto de Thymus vulgaris y este es sensible a la luz solar y al calor por eso lo ideal sería mantener estos productos en un envase ámbar para así proteger el PA de la luz solar.

Tabla con formato

Con formato: Sangría: Izquierda: 0 cm

Con formato: Centrado, Sangría: Izquierda: 0 cm

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

Con formato: Centrado

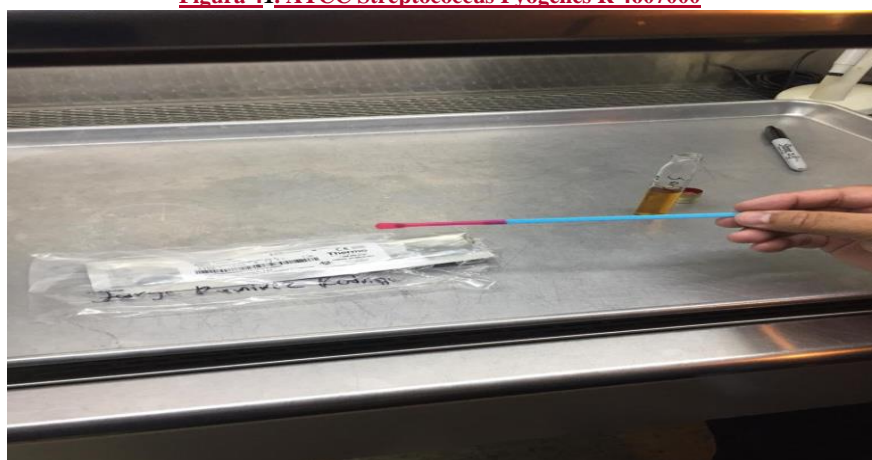
Prueba de sensibilidad antibacteriana de los aceites esenciales de tomillo frente al Streptococcus Pyogenes

Figura 40. Ceba S. Pyogenes



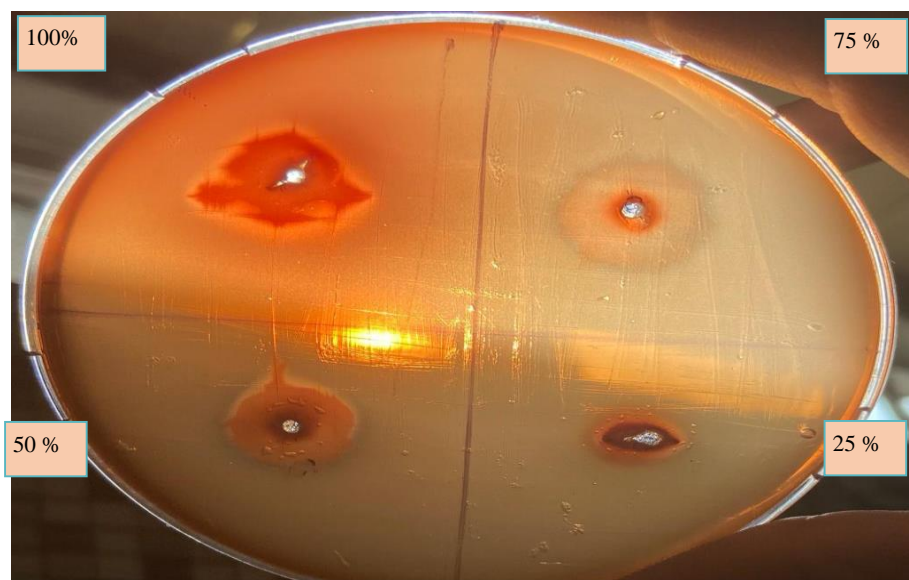
Fuente: (Elaboración propia, 2021)

Figura 41. ATCC Streptococcus Pyogenes R 4607000



Fuente: (Elaboración propia,2021)

**Figura 42. Halos de Inhibición obtenidos con diluciones al 100%,75%,50% y 25% del aceite esencial de Tomillo**



Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 40. Medidas de los halos formados por diluciones del aceite esencial de Tomillo sobre la cepa del S. Pvo genes**

<u>Porcentaje del aceite esencial de tomillo</u>	<u>Halos de inhibición debido a la dilución del aceite de tomillo/ mm</u>
<u>100%</u>	<u>20mm</u>
<u>75%</u>	<u>15mm</u>
<u>50%</u>	<u>13mm</u>
<u>25%</u>	<u>7mm</u>

Fuente: (Elaboración propia, 2021)

A partir de la figura 42, se logró demostrar la potente actividad antibacteriana del aceite esencial de tomillo frente al Streptococcus Pyogenes, el cual produce el cuadro de faringitis y amigdalitis en la cavidad oral; se puede observar y medir la formación de los halos de inhibición presentes en la placa de agar sangre. Inicialmente, se realizó el análisis en una placa de agar de Mueller Hinton, pero el Streptococcus no creció en dicho medio, por lo cual se utilizó una placa de agar sangre, ya que este microorganismo requiere de condiciones especiales para crecer, y la sangre es una condición especial.

Los resultados obtenidos en la tabla 18 revelan que el Streptococcus Pyogenes es sensible a la esencia del tomillo. El potencial antibacteriano va de acuerdo con las diluciones realizadas de los aceites, donde los halos de inhibición con diámetros menores a 8mm, según la escala de Duraffourd, mencionado por el autor Quintanilla (2016), se interpreta como una cepa de levadura resistente; por esta razón se puede determinar que el valor aproximado de la concentración mínima inhibitoria del tomillo es del 25%, ya que presentó un halo de inhibición igual a los 8mm.

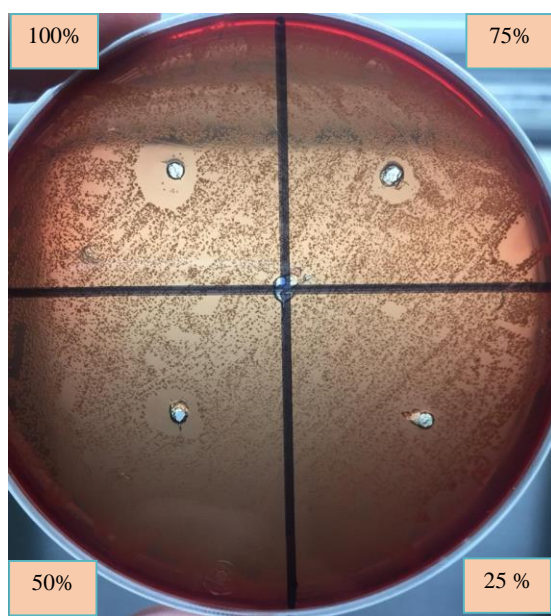
Se procedió a medir la actividad antibacteriana en las formulaciones desarrolladas donde para el colutorio que contiene alcohol (A) se le realizó un blanco de etanol al 40 % donde en una micropipeta se ajustaron los siguientes valores:

#### **Halos de inhibición formados por los colutorios A, B y C**

##### **Colutorio A (Alcohólico)**

Posterior a las 48 horas de incubación, a una temperatura de 35°C, se observó el desarrollo de los halos de inhibición microbiana en el medio de cultivo, cabe destacar que se utilizó un blanco de etanol al 40 % para comprobar que el etanol no es el que produce el efecto antibacterial, se colocó una microgota del blanco en el centro de la placa donde se pudo observar que no hubo halo de inhibición de esta forma se puede garantizar que el alcohol a un 40 % no posee efecto antibacterial.

**Figura 43. Halos de Inhibición obtenidos con diluciones al 100%,75%,50% y 25% del colutorio A**



Fuente: (Elaboración propia, 2021)

**Tabla 41. Medidas de los halos formados por diluciones del colutorio A sobre la cepa del S. Pvoogenes**

<u>Porcentaje del colutorio A</u>	<u>Halos de inhibición debido a la dilución del colutorio A</u>
<u>100%</u>	<u>10mm</u>
<u>75%</u>	<u>9mm</u>
<u>50%</u>	<u>7mm</u>

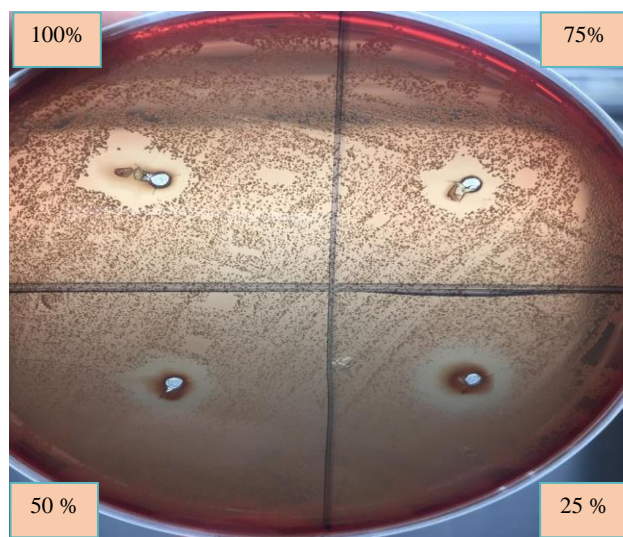
Con formato: Centrado

<u>25%</u>	<u>No se formó halo de inhibición</u>
------------	---------------------------------------

Se logró observar halos de inhibición a distintas concentraciones, al 100 % del colutorio A se obtuvo un halo de 10mm, al 75% se observó un halo de 9 mm, al 50% se observó un halo de 7mm y al 25 % no se logró observar halo de inhibición cabe destacar que el porcentaje de aceite esencial que se utilizó para esta formulación fue al 0.1 %.

**Figura 44. Halos de Inhibición obtenidos con diluciones al 100%,75%,50% y 25% del colutorio B**

**Colutorio B**



Fuente: (Elaboración propia, 2021)

**Tabla 42. Medidas de los halos formados por diluciones del colutorio B sobre la cepa del S. Pyogenes**

<u>Porcentaje del colutorio B</u>	<u>Halos de inhibición debido a la dilución del colutorio B</u>
<u>100%</u>	<u>13mm</u>

Con formato: Centrado

<u>75%</u>	<u>11mm</u>
<u>50%</u>	<u>9mm</u>
<u>25%</u>	<u>7mm</u>

Fuente: (Elaboración propia, 2021)

Se logro observar halos de inhibición a distintas concentraciones, al 100 % del colutorio A se obtuvo un halo de 10mm, al 75% se observó un halo de 9 mm, al 50% se observó un halo de 7mm y al 25% se observó un halo de 7mm cabe destacar que el porcentaje de aceite esencial que se utilizó para esta formulación fue al 0.2 %.

### **Colutorio C**

Para el colutorio C, no se logró medir la actividad antibacteriana debido a que hubo una inhibición muy grande o total del Streptococcus Pyogenes en la placa de agar sangre. Cabe destacar que la concentración del aceite esencial que se utilizó para este colutorio fue al 1 %

**Figura 45. Halos de Inhibición obtenidos con diluciones al 100%,75%,50% y 25% del Colutorio C**



Fuente: (Elaboración propia, 2021).

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

- ~~Se No se considera rentable la extracción de los aceites esenciales, ya que se obti~~ Se ~~obtuvo un~~ en ~~en~~ en porcentajes de rendimiento muy bajo, ~~de~~ según los datos científicos reportados de la parte aérea de la planta que es la hoja fresca se debe obtener un % de rendimiento mínimo de 0,5 esto para cumplir con las normas de calidad de la planta, pero para obtener este porcentaje se debió utilizar más materia prima, para este trabajo de investigación solo se utilizaron 5 kg de la droga vegetal obteniendo 10 g de aceite esencial obteniendo así un 0,2 % de rendimiento lo cual fue suficiente para utilizarlo en las formulaciones y en las pruebas microbiológicas, ya que se trabajó en su mayoría en microgramos ya que el aceite esencial de tomillo es muy concentrado.
- Mediante la técnica de cromatografía de capa fina se obtuvo un RF de 0,5 tanto para el aceite esencial de tomillo como para el patrón de tomillo, observándose en ambos unas manchas moradas donde artículos científicos mencionan que se trata de las moléculas de timol y carvacrol que son características de *Thymus Vulgaris*.
- El análisis de infrarrojo demostró la presencia de grupos funcionales como anillos aromáticos, grupos hidroxilos (O-H) y alquenos, lo que concuerda con las moléculas de interés, que son carvacrol y timol.
- Mediante el uso de la cromatografía de gases (Head Space) donde mediante los tiempos de retención, se logró determinar cualitativamente el pico característico de la molécula timol, la cual según artículos científicos se encuentra en mayor proporción del aceite esencial de tomillo, también gracias a esta técnica empleada se logró determinar la presencia de timol en las formulaciones A, B y C, y el porcentaje de alcohol del colutorio A donde este fue de un 46 %.

- Con respecto a las formulaciones desarrolladas cabe destacar el uso de dos sustitutos naturales al Tween 20 que son el aceite de coco este para la formulación A y el aceite rojo de Turquía para la formulación C donde se pueden catalogar como HLB naturales ya que estos impiden la separación del aceite y el agua. Obteniendo así, una mayor homogeneidad en la mezcla de PA y los excipientes.
- Se pudo observar que las tres formulaciones desarrolladas se mantuvieron traslucidas y no se observaron partículas suspendidas a pesar de que se expusieron a la luz solar durante 72 horas.
- En cuanto al pH de las formulaciones se logró mantenerlas en el rango esperado (5.5 a 7) esto para mantener el pH normal de la boca y también para que el microorganismo de estudio al ser anaerobio no aumente su proliferación en un ambiente ácido.
- Se logró comprobar que el etanol al 46 % no posee efecto antibacteriano, esto se comprobó mediante el uso de un blanco de etanol al 46 % donde se le inyectó una gota a la placa de agar sangre que contenía el microorganismo de estudio, donde este no formó halo de inhibición alrededor del sitio de aplicación, comprobando así que el aceite esencial de tomillo es el agente antibacteriano, otro dato relevante que respalda este hecho se logra observar en la página 18 del handbook de excipientes donde se menciona que para que el etanol posea efecto desinfectante este debe estar en un rango de 60 a 90 %.
- Se determinó que, para la estabilidad del PA, es importante que su almacenamiento sea por medio de la utilización de envasado que proteja la muestra de la luz, ya que, al ser un aceite esencial, suelen ser inestables en presencia de la luz solar en tiempos prolongados y temperaturas elevadas.
- Las tres formulaciones desarrolladas cumplieron con los estándares de calidad esperados, también cumplieron con las propiedades organolépticas esperadas y se manifestaron libres de microorganismos aerobios que son los que normalmente se encuentran en mayor proporción en las formulaciones farmacéuticas en general.
- Las disoluciones del aceite esencial de tomillo a distintas concentraciones presentaron la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano sobre el *Streptococcus Pyogenes*, con un nivel de inhibición mayor a las 48 horas de exposición, con un halo de inhibición que van desde los 13 mm hasta los 8mm.

- En cuanto al análisis antibacteriano en los colutorios A, B y C se logró observar que todos presentaron eficacia contra el *Streptococcus Pyogenes*, formando diferentes medidas en los halos de inhibición donde también se pudo observar que entre mayor uso en el porcentaje del PA (aceite esencial de tomillo) mayor es el poder antibacterial.

## RECOMENDACIONES

### Al Futuro investigador

- Analizar el aceite esencial de tomillo mediante el uso de cromatografía de gases acoplado a masas para de esta forma tener una mejor visualización de las moléculas que se encuentran en la droga vegetal *Thymus Vulgaris*.
- Adquirir la droga vegetal en un establecimiento donde certifiquen el origen y la pureza de la misma.
- **Utilizar** estas formulaciones como objetivo de estudio en otras cepas de microorganismos que afectan la mucosa oral para de esta forma verificar que tan eficaz es el poder antibacteriano de estas.
- Realizar un estudio de estabilidad a las formulaciones

### Universidad Internacional de las Américas

- Se recomienda a los docentes encargados de asignaturas como Farmacognosia, botánica y química orgánica reforzar los programas de estudio, que permitan la realización de nuevos experimentos que ayuden a incentivar la búsqueda de posibles alternativas farmacológicas naturales que permitan la minimización de los efectos secundarios causados por los medicamentos sintéticos.
- Es necesario, que la universidad, valore contar con laboratorios de química más amplios y con equipos de alta calidad especializados para el desarrollo de investigaciones

experimentables más precisas, para las cuales se necesitan rotavapores, un equipo de cromatografía de gases y un equipo de Uv visible más moderno que realice un barrido de forma automática.

~~Utilizar esta investigación in vitro como base para estudios posteriores, en los que se emplee el thymus vulgaris frente a bacterias orales causantes de diferentes patologías orales~~

## BIBLIOGRAFÍA

- Aceituno, L. (2010). Estudio Etnobotánico y Agroecológico de la Sierra Norte de Madrid. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid. Recuperado de: <https://bibdigital.rjb.csic.es/records/item/1526028-estudio-etnobotanico-y-agroecologico-de-la-sierra-norte-de-madrid?offset=1>
- Alarcón, P., González, M., Castro, É. y Cruz, S. (2006). Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase. *Pharmacology*. pp. 8- 32 Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16763380/>
- [Alpaslan, D., Arslan, M. y Rusu L. \(2013\). Effects of harvesting hour on essential oil content and composition of Thymus vulgaris. Farmacia 61 \(6\): 1194-1203. Recuperado de:](#)
- Álvarez, Arellano, Robles, Lopez y Salcedo. (2006). Efecto del aceite esencial, extractos acuoso y etanólico de Thymus vulgaris L, sobre el crecimiento in vitro de Streptococcus pyogenes β-hemolítico del grupo A. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza México.
- Añanca, E. (2009). Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de Caesalpinia spinosa en cepas de Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes. Tesis Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Facultad de Ciencias Médicas, formato pdf. Recuperado de: <http://www.unjbg.edu.pe/tesis/pdf/tesis11.pdf>, p. 25.
- Arango, O., Hurtado, A., Castillo, P. y Santacruz, M. (2009). Estudio de las condiciones de extracción por arrastre con vapor del aceite esencial de tomillo. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. pp. 40-48. Recuperado de: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S1692-35612009000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1692-35612009000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=es)

Con formato: Color de fuente: Automático

- Arcilla, C., Loarca, G., Lecona, S. y González, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Revista ALAN*, 54. Recuperado de: [http://soregano.com/wp-content/uploads/2017/02/El-organo\\_-propiedade.pdf](http://soregano.com/wp-content/uploads/2017/02/El-organo_-propiedade.pdf).
- Arenas, R. (2015). *Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento*. (6ta.ed.). México: McGraw-Hill.
- Avello, M. y Cisternas, I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev. Méd. Chile* v.138 n.10 Santiago oct. 2010.
- Bailey Byron, J., Jonson Jonas, T. y Newlands Shawn, D. (2006). "Infectious Laryngitis" Lippincott. (4ta. ed.) Williams & Wilkins, *Head & Neck Surgery-Otolaryngology*, pp. 830-833. Recuperado de: <https://dokumen.tips/documents/laringitis-agudas-del-adulto.html>
- Barcelona: Masson S.A. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/282154691\\_Fitoterapia\\_Vademecum\\_de\\_Prescripcion](https://www.researchgate.net/publication/282154691_Fitoterapia_Vademecum_de_Prescripcion)
- Bascones, A., & Morantes, S. (2006). Antisépticos Orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. *Av Periodon Implantol*, 31-59. Recuperado: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S169965852006000100004&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S169965852006000100004&script=sci_abstract&tlng=es)
- Begrowl, F., Engelbertz, J., Feistel, B. et al. (2010). Impact of thymol in thyme extracts on their antispasmodic action and ciliary clearance. *Planta Med.* 76(4): 311-8. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19809973/>
- Bermudex, Oliveira y Velásquez (2005). Investigación etnobotánica de plantas medicinales. pp. 42-57. Bogotá, Colombia: Editorial Convenio Andrés Bello. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/pdf/339/33910703.pdf>
- Boe, K., Batstone, D.J. y Angelidaki, I. (2007). An innovative online VFA monitoring system for the anaerobic process, based on *Headspace* gas chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* 96(4): 712-721. Recuperado de:
- Bonifaz, A. (2015). *Micología médica básica*. (5ta. ed.). México: McGraw-Hill.
- Bottino, M. A. (2008). *Periodoncia, Nuevas Tendencias*. Sao Paulo: Artes Mèdicas. Recuperado de: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S169965852006000100004&script=sci\\_abstract&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S169965852006000100004&script=sci_abstract&tlng=es)
- Braga, P.C., Dal Sasso, M. y Engelbertz . (2008). Thyme extract, but not thymol, inhibits endothelin-induced contractions of isolated rat trachea. *Planta Med.* pp.1436-40. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/23195688\\_Thyme\\_Extract\\_but\\_not\\_Thymol\\_Inhibits\\_Endothelin-Induced\\_Contractions\\_of\\_Isolated\\_Rat\\_Trachea](https://www.researchgate.net/publication/23195688_Thyme_Extract_but_not_Thymol_Inhibits_Endothelin-Induced_Contractions_of_Isolated_Rat_Trachea)
- Brandan, N. y Aguirre, M.V. (2008). Cátedra de bioquímica hemoglobina. 1-10.

- Brum, M., Meinerz, A., Xavier, M., Schuch, L., Araújo, M., Alves, M. y Braga, J. (2010). In vitro activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species (Actividad in vitro de *Origanum vulgare* aceite esencial contra especies *Candida*). *Revista Brasileira de Microbiología*. Brasil. Recuperado de: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/3479/tellez-monzon-lena-asuncion.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Buechi, S., Roger, V. (2005). Open trial to assess aspects of safety and efficacy of a combined herbal cough syrup with ivy and thyme. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*. pp. 1-37. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16391481/>
- Cañigual Vanaclocha, M. (2000) Usos terapéuticos del tomillo. pp. 42-44. Recuperado de: [https://www.fitoterapia.net/php/descargar\\_documento.php?id=4816&doc\\_r=sn&num\\_volumen=1&secc\\_volumen=5951](https://www.fitoterapia.net/php/descargar_documento.php?id=4816&doc_r=sn&num_volumen=1&secc_volumen=5951)
- Castañeda, M., Muñoz, A., Martínez, J., y Stranshenko, E. (2007). Estudio de la composición química y la actividad biológica de los aceites esenciales de diez plantas aromáticas colombianas. *Scientia et Technica*. pp. 165-166. Recuperada de : <https://www.redalyc.org/pdf/849/84903338.pdf>
- Centro Nacional de Información de Medicamentos. (2002). Instituto de Investigaciones Farmacológicas Facultad de Farmacia. Universidad de Costa Rica. Serie de actualización profesional. (2002).
- Chang, R. (2013). Principios esenciales de química general. (4ta. ed.). Madrid. McGraw-Hill,
- Chiluiza, J. y Ulloa, P. (2005). Proyecto de extracción de aceite esencial de jengibre como alternativa de exportación, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil-Ecuador. p. 28. Recuperado de: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/726/1/UDLA-EC-TIAG-2012-16.pdf>
- Correia Pinto, M. (2013). Cumarinas: versatilidad estructural y aplicaciones en química farmacéutica. Recuperado de: [file:///C:/Users/Yonly%20Torrentes/Downloads/rep\\_575.pdf](file:///C:/Users/Yonly%20Torrentes/Downloads/rep_575.pdf)
- CUMBREÑO, Soledad y PÉREZ, (2004) Procedimientos Normalizados De Trabajo, Offarm, Vol 23, Nº 9, pp 156-158. Recuperado de:
- Direkvand-Moghadam, A., Khosravi, A. y Reyes. (2012). The impact of a novel herbal Shirazi *Thymus Vulgaris* on primary dysmenorrhea in comparison to the classical chemical Ibuprofen. Recuperado de : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3685784/>
- Edris, A. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Revista Wiley InterScience*. Estados Unidos. Recuperado de: <https://erbeofficinali.org/dati/nacci/studi/gli%20olii%20essenziali%20.pdf>
- Emperatriz, I. Diferenciación morfológica. (2018). Rrecuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15161/1/T-UCE-0004-A80-2 018.pdf>

**Con formato:** Sin subrayado, Color de fuente: Automático, Español (Costa Rica)

- Engelbertz, J. (2012). Bioassay-guided fractionation of a thymol-deprived hydrophilic thyme extract and its antispasmodic effect. *J. Ethnopharmacol.* pp. 848-53. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22465593/>
- Estrada, C. y Guagua, M. (2005). Open trial to assess aspects of safety and efficacy of a combined herbal cough syrup with ivy and thyme. pp. 130-6. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16391481/>
- Estrada, S. (2011). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*), (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador. Recuperado de: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/699>
- European Medicines Agency (EMA). (2013). Community herbal monograph on *Thymus vulgaris* L. and *Thymus zygis* L., herba. Recuperado de: <http://www.ema.europa.eu/docs>
- faringoamigdalitis aguda bacteriana y niños sanos, Guatemala, Tesis Universidad Francisco Marroquín, Facultad de Medicina, formato recuperado de: <http://www.tesis.ufm.edu.gt/pdf/3538.pdf>, p. 8
- faringoamigdalitis aguda bacteriana y niños sanos, Tesis Universidad Francisco Marroquín, Facultad de Medicina, formato pdf, Recuperado de: <http://www.tesis.ufm.edu.gt/pdf/3538.pdf>, p. 8.
- Fuentes, León y Matiz. (2015). Microencapsulación de aceite esencial de tomillo (*thymus vulgaris*) en matrices poliméricas de almidón de ñame (*dioscorea rotundata*) modificado. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-farmacéuticas.* Recuperado de: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0034-74182015000200005&script=sci\\_abstract&tIng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0034-74182015000200005&script=sci_abstract&tIng=es)
- Granados, C., Yáñez, Y. y Santafé, G. (2012). Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas.* pp. 12-23.
- Guadrón, J. (2007). Efecto sobre la placa bacteriana de los antisépticos bucales. *El*
- Guala, M., Pérez, G., Barducco, L., Marsó, A. y Elder, H. (2012). Obtención de fracciones enriquecidas durante la extracción de aceites esenciales crudos. *Avances en Ciencia y Tecnología.* pp: 151-157. Recuperado de : <https://www.redalyc.org/pdf/3236/323627685014.pdf>
- Gutiérrez Peláez, E., Cifuentes Beltrán, M., Álvarez Estrada, J., Ríos Escobar, J., Ángel Serna, L., y Morales Ríos, D. (2010). Estudio farmacognósico para el cuidado de la salud a partir de aceites esenciales obtenidos por destilación de arrastre de vapor. *Investigaciones Andina.* pp. 8-18.
- Hernández, A. (2013). *Farmacología general una guía de estudio.* McGraw-Hill.

**Con formato:** Color de fuente: Automático, Español (Costa Rica)

- Hernández, A. (2014). Farmacología general. Una guía de estudio. México. Recuperado de:  
<https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?sectionid=96949390&bookid=1489&jumpsectionID=96949398&Resultclick=2#1115735913>  
<http://www.med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/hemoglobina.pdf>  
[http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2310](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310).
- <https://biblat.unam.mx/hevila/Agroproductividad/2015/vol8/no4/1>.  
<https://www.omicsonline.org/searchresult.php?keyword=thymus+vulgaris&search=>
- Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. y Cavrini V. (2012). GC-MS evaluation of thyme (*Thymus Vulgaris* L.) oil composition and variations during vegetative cycle. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.
- Inlago, M. (2014). Determinación de la actividad antimicótica in vitro del extracto de tomillo en comparación con la nistatina y el gluconato de clorhexidina al 0.2% sobre cepas de *Candida albicans*. Recuperado de: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/2801>
- Labib y Aldawsari. (2015). Innovation of natural essential oil-loaded Orabase for local treatment of oral candidiasis. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26170621/>
- Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M. y Maestri, D. (2008). Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica. (Editorial Brujas). Recuperado: <https://books.google.co.cr/books?isbn=9871432097>.
- Lindhe, J. (2009). Periodontología Clínica e Implantología Odontológica. Buenos Aires: Médica Panamericana. Recuperado de: <https://dokumen.pub/periodontologia-clinica-e-implantologia-odontologica-tomo-1-6nbsped-978-950-06-9525-1.htm>
- Manou, Bouillard, L., Devleeschouwer, M.J. y Barrel, A.O. (1998). Evaluation of the preservative properties of thymus vulgaris essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology* 271-278. Recuperado: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9721641/>
- Martinello, M. y Pamparo, M. (2005). Poder antioxidante de extractos de romero concentrados por destilación molecular. *Información Tecnológica*. pp: 17-20. Recuperado de : [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0718-07642005000500004&lng=es&nrm=is](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-07642005000500004&lng=es&nrm=is)
- Montequi, S. y Santos, J.C. (2006). "Infecciones bacterianas de vías altas: otitis, amigdalitis". *Boletín de la Sociedad de Pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León*, Vol. 46, Suplemento 2, España. pp. 294-303. Recuperado de: [http://www.sccalp.org/bulletin\\_articles/search?query=&commit=Buscar&category=40&field=author](http://www.sccalp.org/bulletin_articles/search?query=&commit=Buscar&category=40&field=author)

Con formato: Color de fuente: Automático

Con formato: Español (Costa Rica)

Con formato: Español (Costa Rica)

Código de campo cambiado

- Moreno et al. (2011). Plantas medicinales con actividad fungicida. pp. 32-36. Recuperado de : <http://www.oas.org/es/sedi/femcidi/pubs/Libro%20de%20Plantas%20Medicinales%20de%20Panama.pdf>
- Muñoz, M.J. (2011). Higiene bucodental. Pastas dentrificas y enjuagues bucales. Dermofarmacia, formato Recuperado de: [http://www.elsevier.es/watermark/ctl\\_servlet? f=10&pident\\_articulo=15465&pident\\_usuario=0&pident\\_revista=4&fichero=04v19n03a03008pdf001.pdf&ty=75&accion=L&origen=doymafarma&web=w ww.doymafarma.com&lan=es, p. 5](http://www.elsevier.es/watermark/ctl_servlet? f=10&pident_articulo=15465&pident_usuario=0&pident_revista=4&fichero=04v19n03a03008pdf001.pdf&ty=75&accion=L&origen=doymafarma&web=w ww.doymafarma.com&lan=es, p. 5)
- Murray, P.R., Rosenthal, K.S. y Pfaller, M.A. (2009). Microbiología Médica (6ta. edición). España: Elsevier-Mosby. pp. 351-356. Recuperado de: ISBN 978-84-8086-465-7. OCLC 733761359.
- Nakabayashi, R. y Saito, K. (2015). “Integrated Metabolomics for Abiotic Stress Responses in Plants”. *Current Opinion in Plant Biology*. pp. 10-16. Recuperado de: <https://www.cyd.conacyt.gob.mx/?p=articulo&id=227>
- Newary, S.A., Shaffie, N.M. y Omer E.A. (2017). The protection of *Thymus vulgaris* leaves alcoholic extract against hepatotoxicity of alcohol in rats. pp. 361-71. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764517303498>
- Peredo, H., Palou, E. y García, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos en Ingeniería de Alimentos 3 (1)*, 24-32 Recuperado de: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)
- Pérez Porto, J. y Merino, M. (2014). Definicion.de: Definición de plantas medicinales. Recuperado de: (<https://definicion.de/plantas-medicinales/>)
- Pino, N., Meléndez, E. y Stashenko, E. (2010). Composición química del aceite esencial de hojas de orégano cultivado en Quibdó, Colombia. *Academic Journal*. pp. 171-176. Recuperado de: [search.ebscohost.com](http://search.ebscohost.com)
- Prasanth, Ravi, Varsha y Satyam. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Medicinal y Aromatic Plants*. 3, 164-166. Recuperado de: <https://www.longdom.org/open-access/review-on-thymus-vulgaris-traditional-uses-and-pharmacological-properties-2167-0412.1000164.pdf>
- Ratacj, P. (2018). Hydrolats: demystifying the mystical waters. Recuperado de: <https://phytovolatilome.com/hydrolats-demystifying-mystical-waters/>
- Recuperado de: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2304-37682014000100003&lng=es](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014000100003&lng=es)

**Con formato:** Color de fuente: Automático, Inglés (Estados Unidos)

Recuperado de: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S003498872010001100014&script=sci\\_abstract&tlng=es](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S003498872010001100014&script=sci_abstract&tlng=es)

Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12093498/>

Rojas, Romero y Zeledón. (2016). Sustancias alternativas con acción antimicrobiana para la elaboración de desinfectantes de la cavidad oral a partir de tomillo. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Costa Rica. Recuperado de: <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3512/1/40397.pdf>

Romero, M., (2004). Plantas aromáticas, tratado de aromaterapia científica, Editorial Kier S.A. pp. 61-73. Recuperado de: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/726/1/UDLA-EC-TIAG-2012-16.pdf>

Ruiz Márquez, M.J., Ortiz García, C. y Sánchez Luque, J.J. (2014). Trastornos del equilibrio ácido base.

Ruiz, C. (2010). Prevalencia de Streptococcus beta hemolítico del grupo A, en niños con

RUIZ, Carmen, (2003). Prevalencia de Streptococcus beta hemolítico del grupo A, en niños con

Salazar, R. (2005). Análisis y Control de Medicamentos. Romargraf, Barcelona, España. Recuperado de: <http://www.ub.edu/sdm/libros/AnalisisyMedicamentos.pdf>

Salvador, Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer, Facultad de Cirugía Dental. Recuperado de: <http://www.usam.edu.sv/SiteUmasferrer/InvetigacionInstitucional/Enjuagues%20bucuales.pdf> p. 4.

Sánchez, D. (2012). Estudio del potencial antioxidante de la mora (*Rubus glaucus benth*) y sus cambios en función del proceso de maduración y bajo diferentes temperaturas de almacenamiento. (Tesis de Maestría inédita). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. Recuperado de: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/20146>

Santa Cruz. C. (2005). Extracción a nivel de laboratorio de aceite esencial crudo de pericón y utilización del desecho sólido para la extracción del colorante natural, para su uso en el teñido de fibras naturales, Guatemala. pp. 7-8. Recuperado de: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/726/1/UDLA-EC-TIAG-2012-16.pdf>

Santamaria Hernández, T. (2011). Impact of thymol in thyme extracts on their antispasmodic action and ciliary clearance. pp. 47-54. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19809973>

Savio, E. et al. (2005). Guías de tratamiento infecciones respiratorias. [En línea], Montevideo, formato pdf, Recuperado de: [http://www.clinfec.fmed.edu.uy/pautas/pdfs/GuiaTToIR205\\_1.pdf](http://www.clinfec.fmed.edu.uy/pautas/pdfs/GuiaTToIR205_1.pdf), ISSN 1510-9380, pp. 1-19.

**Con formato:** Color de fuente: Automático, Neerlandés (Países Bajos)

**Con formato:** Sin subrayado, Color de fuente: Automático, Español (Costa Rica)

**Con formato:** Color de fuente: Automático, Español (Costa Rica)

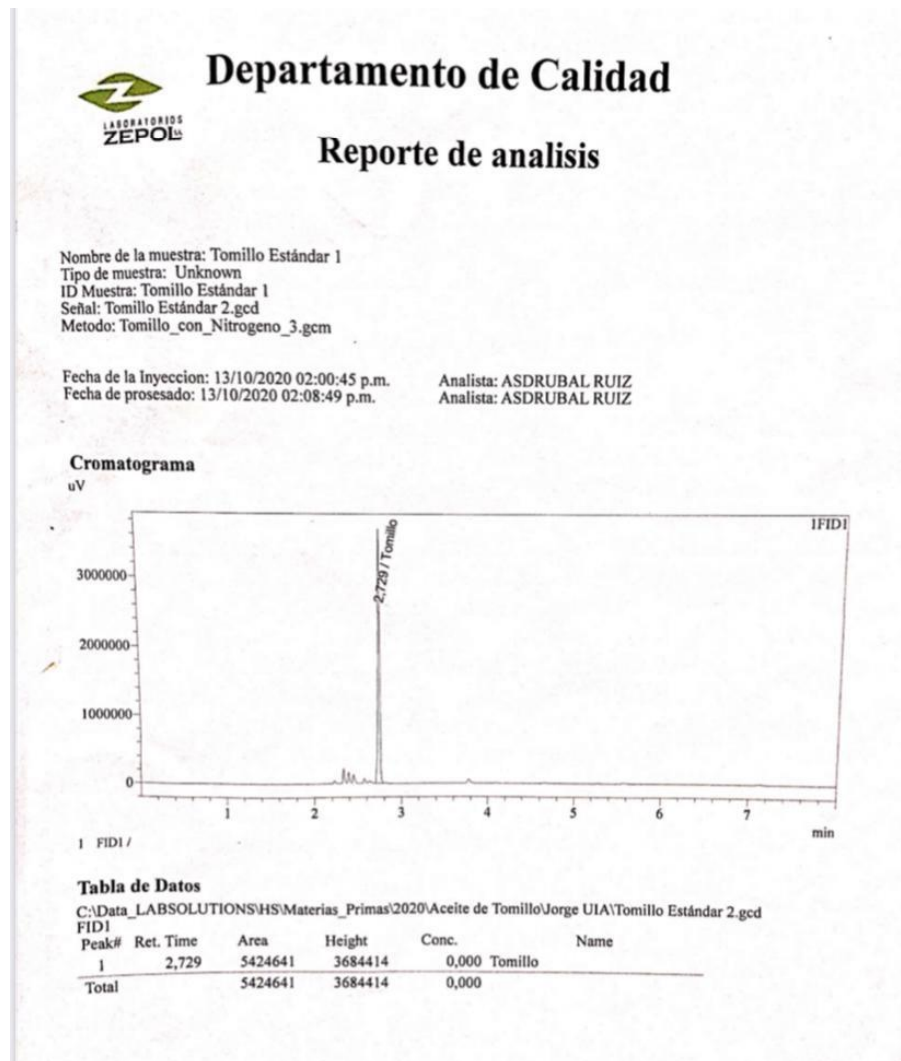


G RODRIGUEZ ( 2008) géneros streptococcus y enterococcus

Recuperado de:

<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/StreptococcusyEnterococcus.pdf>

### ANEXOS





## Departamento de Calidad

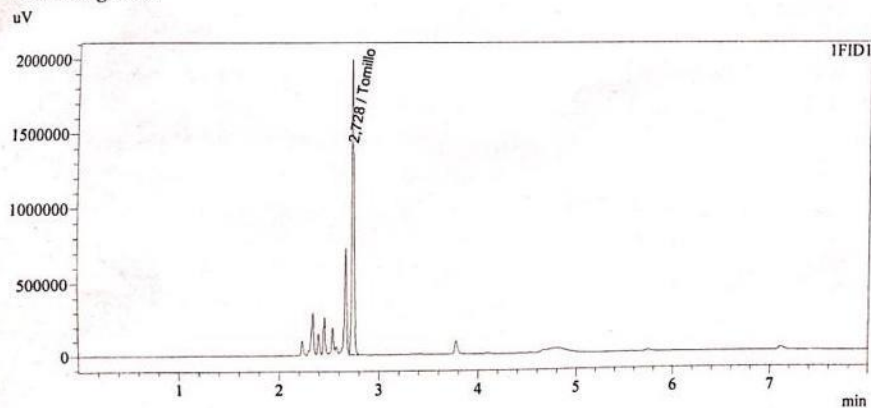
### Reporte de analisis

Nombre de la muestra: Tomillo Puro  
 Tipo de muestra: Unknown  
 ID Muestra: Tomillo Puro  
 Señal: Tomillo Puro.gcd  
 Metodo: Tomillo\_con\_Nitrogeno\_3.gcm

Fecha de la inyeccion: 13/10/2020 02:22:07 p.m.  
 Fecha de procesamiento: 13/10/2020 02:30:12 p.m.

Analista: ASDRUBAL RUIZ  
 Analista: ASDRUBAL RUIZ

#### Cromatograma



1 FID1 /

#### Tabla de Datos

C:\Data\_LABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2020\Aceite de Tomillo\Jorge UIA\Tomillo Puro.gcd

FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	2.728	2940358	1997094	0,000	Tomillo
Total		2940358	1997094	0,000	

Frecuencia aproximada de grupos funcionales

<u>Grupo Funcional</u>	<u>Absorción</u>	<u>Intensidad</u>
<u>Alcano (C-H)</u>	<u>2850-</u> <u>2960</u>	<u>Media</u>
<u>Alqueno (C=H)</u> <u>C=C</u>	<u>3020-</u> <u>3100</u> <u>1640-</u> <u>1680</u>	<u>Media</u>
<u>Alquino (=C-H)</u> <u>C≡C</u>	<u>3300</u> <u>2100-</u> <u>2260</u>	<u>Fuerte</u> <u>Media</u>
<u>Haluro de Alquilo (C-Cl)</u>	<u>600-800</u>	<u>Fuerte</u>
<u>Alcohol (O-H)</u> <u>C-O</u>	<u>3400-</u> <u>3650</u> <u>1050-</u> <u>1150</u>	<u>Fuerte</u> <u>Fuerte</u>
<u>Amina (N-H)</u> <u>C-N</u>	<u>3300-</u> <u>3500</u> <u>1030-</u> <u>1230</u>	<u>Media</u> <u>Media</u>
<u>Anillo aromático</u>	<u>1660-</u> <u>2000</u> <u>1450-</u> <u>1600</u>	<u>Débil</u> <u>Media</u>
<u>Ácido Carboxílico</u>	<u>2500-</u> <u>3100</u>	<u>Fuerte</u> <u>Amplia</u>
<u>Compuesto Carboxilo</u>	<u>1670-</u> <u>1780</u>	<u>Fuerte</u>

<u>Nitrilo</u> <u>(C=N)</u>	<u>2210-</u> <u>2260</u>	<u>Media</u>
<u>Nitro</u> <u>NO2</u>	<u>1540</u>	<u>Fuerte</u>

Identificación de Timol en los colutorios A, B y C



**Departamento de Calidad**

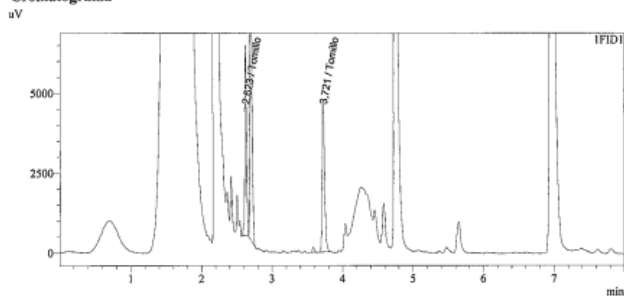
**Reporte de analisis**

Nombre de la muestra: Colutorio A  
 Tipo de muestra: Unknown  
 ID Muestra: Colutorio A  
 Señal: Colutorio A.gcd  
 Metodo: Tomillo\_con\_Nitrogeno\_3.gcm

Fecha de la Inyección: 10/03/2021 02:57:05 p.m.  
 Fecha de procesamiento: 10/03/2021 03:05:09 p.m.

Analista: ASDRUBAL RUIZ  
 Analista: ASDRUBAL RUIZ

**Cromatograma**



1 FID1 /

**Tabla de Datos**

C:\Data\_ABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Tomillo\Colutorio\Colutorio A.gcd

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	2,623	9753	5973	0,000	Tomillo
2	2,693	34210	20728	0,000	
3	3,583	296	160	0,000	
4	3,721	10518	4694	0,000	Tomillo
Total		54778	31555	0,000	



## Departamento de Calidad

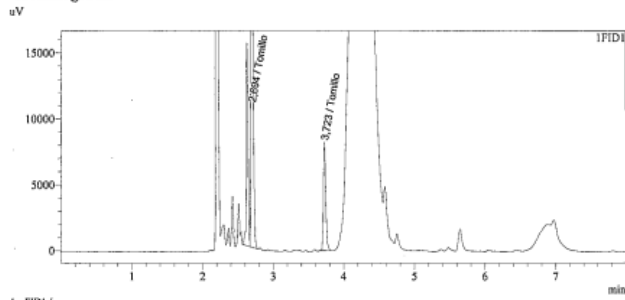
### Reporte de analisis

Nombre de la muestra: Colutorio B  
 Tipo de muestra: Unknown  
 ID Muestra: Colutorio B  
 Señal: Colutorio B.gcd  
 Método: Tomillo\_con\_Nitrogeno\_3.gcm

Fecha de la Inyeccion: 10/03/2021 03:07:47 p.m.  
 Fecha de procesado: 10/03/2021 03:15:51 p.m.

Analista: ASDRUBAL RUIZ  
 Analista: ASDRUBAL RUIZ

#### Cromatograma



#### Tabla de Datos

C:\Data\_LABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Tomillo\Colutorio\Colutorio B.gcd

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	2,625	26339	15388	0,000	
2	2,694	79399	47064	0,000	Tomillo
3	3,723	18469	8259	0,000	Tomillo
Total		124207	70710	0,000	



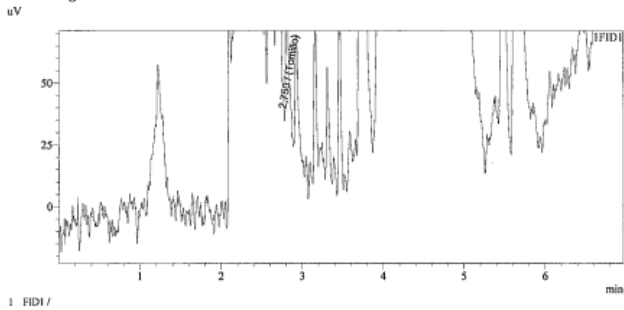
## Departamento de Calidad

### Reporte de analisis

Nombre de la muestra: Colutorio C  
 Tipo de muestra: Unknown  
 ID Muestra: Colutorio C  
 Señal: Colutorio C.gcd  
 Método: Tomillo\_cón\_Nitrogeno\_3.gcm

Fecha de la Inyección: 10/03/2021 03:18:27 p.m.      Analista: ASDRUBAL RUIZ  
 Fecha de procesamiento: 10/03/2021 03:25:31 p.m.      Analista: ASDRUBAL RUIZ

#### Cromatograma



#### Tabla de Datos

C:\Data\_LABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Tomillo\Colutorio\Colutorio C.gcd

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	2,750	0	0	0,000	Tomillo
2	7,250	0	0	0,000	Tomillo
Total		0	0	0,000	

Identificación de % de alcohol en el colutorio A



## Departamento de Calidad

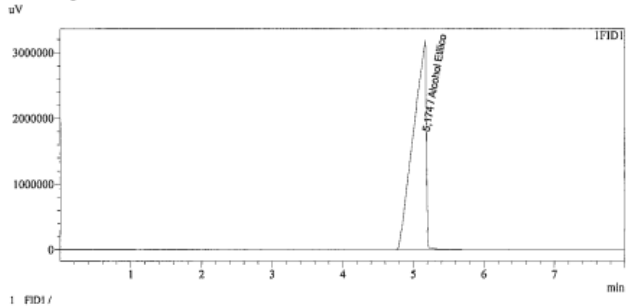
### Reporte de analisis

Nombre de la muestra: Colutorio A  
 Tipo de muestra: Unknown  
 ID Muestra: Colutorio A  
 Señal: Colutorio A-1.gcd  
 Metodo: Etanol\_con\_nitrogeno\_2.gcm

Fecha de la Inyección: 10/03/2021 01:59:00 p.m.  
 Fecha de procesado: 10/03/2021 02:07:05 p.m.

Analista: ASDRUBAL RUIZ  
 Analista: ASDRUBAL RUIZ

#### Cromatograma



#### Tabla de Datos

C:\Data\_LABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Etanol\Colutorio\Colutorio A-1.gcd

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	5,174	40104468	3182027	0,000	Alcohol Etilico
Total		40104468	3182027	0,000	



## Departamento de Calidad

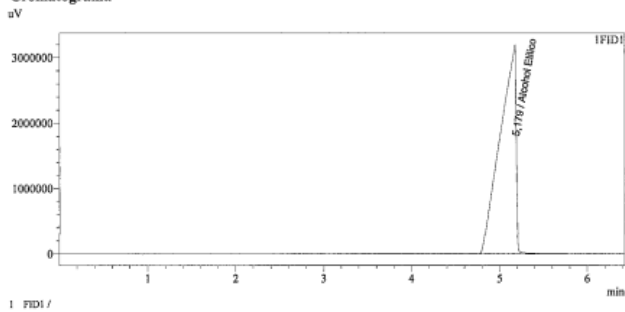
### Reporte de analisis

Nombre de la muestra: Colutorio A  
 Tipo de muestra: Unknown  
 ID Muestra: Colutorio A  
 Señal: Colutorio A-3.gcd  
 Metodo: Etanol\_con\_nitrogeno\_2.gcm

Fecha de la Inyección: 10/03/2021 02:20:14 p.m.  
 Fecha de procesado: 10/03/2021 02:26:44 p.m.

Analista: ASDRUBAL RUIZ  
 Analista: ASDRUBAL RUIZ

#### Cromatograma



#### Tabla de Datos

C:\Data\_LABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Etanol\Colutorio\Colutorio A-3.gcd

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	5,179	40496609	3195387	0,000	Alcohol Etilico
Total		40496609	3195387	0,000	



## Departamento de Calidad

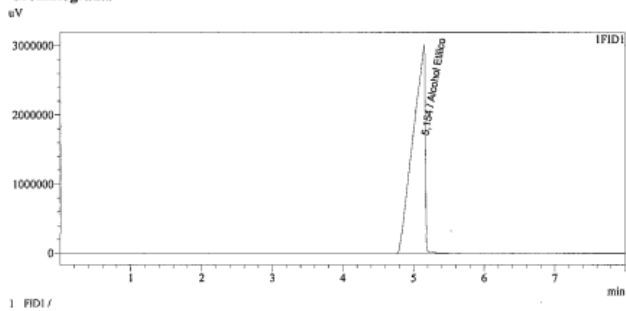
### Reporte de analisis

Nombre de la muestra: Etanol Estandar 40%  
 Tipo de muestra: Unknown  
 ID Muestra: Etanol Estandar 40%  
 Señal: Etanol Estandar 40%-1.gcd  
 Metodo: Etanol\_con\_nitrogeno\_2.gcm

Fecha de la Inyeccion: 10/03/2021 01:27:10 p.m.  
 Fecha de procesado: 10/03/2021 01:35:15 p.m.

Analista: ASDRUBAL RUIZ  
 Analista: ASDRUBAL RUIZ

#### Cromatograma



#### Tabla de Datos

C:\Data\_LABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Etanol\Colutorio\Etanol Estandar 40%-1.gcd

FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	5,154	36054983	3023051	0,000	Alcohol Etílico
Total		36054983	3023051	0,000	



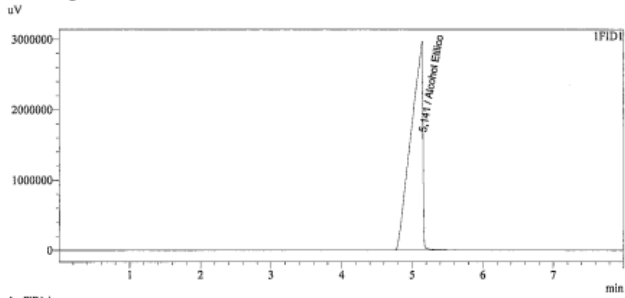
## Departamento de Calidad

### Reporte de analisis

Nombre de la muestra: Etanol Estandar 40%  
 Tipo de muestra: Unknown  
 ID Muestra: Etanol Estandar 40%  
 Señal: Etanol Estandar 40%-3.gcd  
 Metodo: Etanol\_con\_nitrogeno\_2.gcm

Fecha de la Inyección: 10/03/2021 01:48:24 p.m.      Analista: ASDRUBAL RUIZ  
 Fecha de procesamiento: 10/03/2021 01:56:28 p.m.      Analista: ASDRUBAL RUIZ

#### Cromatograma



1 FID1 /

#### Tabla de Datos

C:\Data\_ABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Etanol\Colutorio\Etanol Estandar 40%-3.gcd  
 FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	5,141	34448081	2973264	0,000	Alcohol Etilico
Total		34448081	2973264	0,000	



## Departamento de Calidad

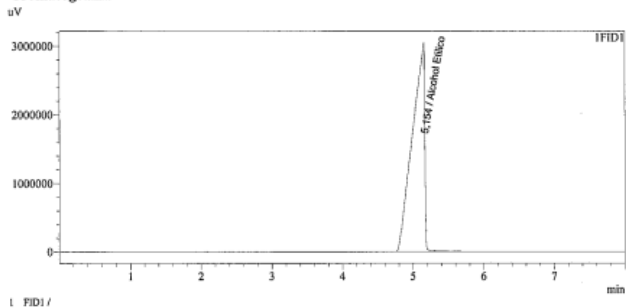
### Reporte de analisis

Nombre de la muestra: Etanol Estandar 40%  
 Tipo de muestra: Unknown  
 ID Muestra: Etanol Estandar 40%  
 Señal: Etanol Estandar 40%-2.gcd  
 Metodo: Etanol\_con\_nitrogeno\_2.gcm

Fecha de la Inyección: 10/03/2021 01:37:47 p.m.  
 Fecha de procesamiento: 10/03/2021 01:45:52 p.m.

Analista: ASDRUBAL RUIZ  
 Analista: ASDRUBAL RUIZ

#### Cromatograma



#### Tabla de Datos

C:\Data\_LABSOLUTIONS\HS\Materias\_Primas\2021\Etanol\Colutorio\Etanol Estandar 40%-2.gcd

FID1

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Name
1	5,154	36458041	3047308	0,000	Alcohol Etílico
Total		36458041	3047308	0,000	

Recuento microbiano (anaerobios)



Empresa solicitante: Jergo Ramirez Rodriguez  
Responsable:   
Muestreado por: SOLICITANTE

Código de reporte: **84066**  
Fecha de recepción: 07/08/21  
Fecha de montaje: 06/09/2021  
Fecha de reporte: 07/08/21

**REPORTE DE LABORATORIO**

MUESTRA (s)	ANALISIS-DESCRIPCION	RESULTADOS	UNIDAD	OTROS
L. Colzaeje A	Ricasso total Amélico	< 10	UFChé.	BAM FDA

METODOS:

Rev-05-20

www.microlabsr.com  
Correo: laboratorio@microlabsr.com  
Facebook.com/microlabsr

Tel: 2234-88-37, 2234-58-62 Fax: 2224-65-41  
Guadalupe, del correo 75 metros al norte  
San Jose, Costa Rica, Zip Code: 10801

De Laboratorio cuenta con Programas de Calidad Interno y Externo, Permiso Sanitario y Certificado de Validez Internacional.  
- AOAC PT ENROLLMENT ID#19485. 2- MINISTERIO SALUD- # 61648  
- MAG- SENASA (CVO); FDRM1951-2019 4- MQC- SEREC SAM13.



*[Handwritten signature]*  
Eduardo R. C.



Empresa solicitante: Jorge Ramirez Rodriguez  
Responsable:

Código de reporte: **84067**  
Fecha de recepción: 05/2021  
Fecha de montaje: 04/03/2021  
Fecha de reporte: 07/2021

Muestreado por: SOLICITANTE

**REPORTE DE LABORATORIO**

MUESTRA (s)	ANALISIS-DESCRIPCION	RESULTADOS	UNIDAD	OTROS
1. Colmaria B	Racasto total Ambiental	< 10	UFC/ml	NAM/IDA

**METODOS:**

Rev-05-20

www.microlabser.com  
Correo: laboratorio@microlabser.com  
Facebook.com/microlabser

Tel: 2234-88-37, 2234-58-62 Fax: 2224-65-41  
Guadalupe, del correo 75 metros al norte  
San José, Costa Rica, Zip Code: 10001

Este Laboratorio cuenta con Programas de Calidad Interna y Externa, Permisos Sanitarios y Certificados de Validez Internacional.  
1- AOAC PT ENROLLMENT ID#119455. 2- MINISTERIO SALUD: # 01048  
3- MAG - SENASA (CVO): #DRM1951-2010 4- MQC- SEEC: SM133.



*[Handwritten signature]*



Empresa solicitante: **Jorge Ramirez Rodriguez**  
 Responsable:

Código de reporte: **84068**  
 Fecha de recepción: 04/03/2021  
 Fecha de montaje: 04/03/2021  
 Fecha de reporte: 07/03/2021

Muestreado por: SOLICITANTE

**REPORTE DE LABORATORIO**

MUESTRA (s)	ANALISIS-DESCRIPCION	RESULTADOS	UNIDAD	OTROS
I. Coléctario C	Recuento total Aeróbico	< 10	UFC/mL	NAM FDA

**METODOS:**

Rev-05-20

www.microlabscr.com  
 Correo: laboratorio@microlabscr.com  
 Facebook.com/microlabscr

Tel: 2234-88-37, 2234-58-62 Fax: 2234-65-41  
 Guadalupe, del correo 75 metros al norte  
 San José, Costa Rica, Zip Code: 10801

Este Laboratorio cuenta con Programas de Calidad Interiores y Externos, Permisos Sanitarios y Certificados de Validez Internacional.  
 1- AOAC PT ENROLLMENT ID#119485. 2- MINISTERIO SALUD: # 01048  
 3- MAG - SENASA (CVO): #DRM1994-2010 4- MQC- SEEC SM126.



*[Handwritten signature]*  
 J. Ramírez