

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS

CARRERA DE FARMACIA

DESARROLLO DE DIVERSAS FORMULACIONES FITOFARMACÉUTICAS TÓPICAS  
PARA DIABÉTICOS, A PARTIR DE LAS PARTES AÉREAS DE DOS DROGAS  
VEGETALES. A SABER *THYMUS VULGARIS L* Y *ORIGANUM VULGARE L*.

**Tesis para optar por el grado de licenciatura**

Mónica Jiménez Sánchez

**Tutor:**

Adam Amey Williams

**Lector:**

Jorge Aguilar López

**San José, Costa Rica**

**2017**

## CONTENIDO

Resumen.....	7
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>8</b>
Planteamiento del problema .....	8
Hipótesis .....	8
Objetivos .....	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos.....	9
Justificación .....	9
Antecedentes .....	11
Internacionales .....	11
Nacionales.....	12
Proyecciones .....	14
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
Fitoterapia .....	15
Droga vegetal .....	15
Metabolito secundario .....	16
Aceite esencial.....	16
Fitofármacos o Fitomedicamentos.....	17
Vías de administración .....	17
Formas de administración sobre la piel. ....	18
Formas farmacéuticas.....	18
Pomadas. ....	18
Orégano.....	19
Droga vegetal .....	20
Propiedades del orégano.....	20
Actividad antimicrobiana. ....	20
Efecto antiinflamatorio.....	20
Actividad antioxidante.....	20
Componentes del aceite esencial de orégano.....	21
Efectos secundarios y toxicidad .....	21
Tomillo.....	22

Droga vegetal .....	22
Propiedades del tomillo .....	22
Actividad antimicrobiana y antifúngica. ....	22
Componentes del aceite esencial del tomillo .....	23
Efectos secundarios y toxicidad .....	23
Bacterias.....	24
Mecanismos de resistencia antimicrobiana.....	24
Inactivación enzimática. ....	24
Alteración en barreras de permeabilidad. ....	25
Alteración del sitio blanco del antibiótico. ....	25
Staphylococcus aureus .....	25
Staphylococcus aureus resistente a metilcilinas.....	26
Infecciones cutáneas producidas por <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	26
Pacientes susceptibles a infección. ....	26
Métodos de extracción de aceites esenciales .....	30
Arrastre por vapor .....	30
Dean Stark.....	30
Identificación de compuestos .....	31
Cromatografía .....	31
Cromatografía de gases. ....	32
Espectroscopia Infrarrojo .....	32
Espectrometría de masas con cromatografía de gases.....	33
Microbiología.....	35
Pruebas de sensibilidad a antibióticos .....	35
Método del antibiograma disco-placa.....	35
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO .....	37
Enfoque .....	37
Diseño .....	37
Objeto de Estudio.....	37
Criterios de Inclusión .....	38
Criterios de Exclusión .....	38
Variables .....	38

Instrumentos y técnicas de recolección de datos .....	40
Fase I: Obtención de la materia vegetal .....	41
Fase II: Destilación por arrastre por vapor .....	41
Fase III: Destilación de arrastre con vapor acoplado a trampa Dean- Stark.....	43
Fase IV: Caracterización e identificación de los componentes .....	44
Fase V: Análisis microbiológico .....	44
Fase VI: Elaboración de las preparaciones fitofarmacéuticas .....	45
Fase VII: Análisis microbiológico de las preparaciones fito-farmacéuticas .....	46
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	47
Comparación de la Destilación Convencional por Arrastre con Vapor Frente a la Utilización de la Trampa Dean- Stark .....	47
Análisis Cualitativo de las Muestras de los Aceites Esenciales de Tomillo y Orégano por Espectroscopía Infrarrojo .....	49
Análisis Cuantitativo de los Componentes Presentes en los Aceites Esenciales de Tomillo y Orégano por Cromatografía de Gases Acoplado a Masas. ....	53
Análisis Microbiológico de los Aceites Esenciales de Tomillo y Orégano Frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	54
Análisis Microbiológico de las Formulaciones Fitofarmacéuticas .....	56
Determinación de la Concentración Mínima Efectiva en Distintas Diluciones Frente al <i>Staphylococcus aureus</i> .....	58
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	62
Conclusiones .....	62
Recomendaciones.....	63
Referencias.....	64

## FIGURAS

Figura 1 Principales Componentes del Aceite Esencial de Orégano.....	21
Figura 2 Principales Componentes del Aceite Esencial de Tomillo .....	23
Figura 3. Úlcera por Presión Grado 1 .....	28
Figura 4. Úlcera por Presión Grado 2 .....	28
Figura 5. Escala de Wagner.....	29
Figura 6. Espectro de Absorción Infrarrojo .....	32
Figura 7. Absorciones IR Características de Algunos Grupos Funcionales .....	33
Figura 8. Cromatografía de Gases de Cocaína en una Muestra de Orina por Corriente Iónica Total.....	34
Figura 9 Espectro de Masas Tomado del Máximo a 11,5 min.....	34
Figure 10. Espectro de Masas Tomado del Máximo de Cromatografía de Gases de un Estándar de Cocaína en el Mismo Tiempo de Elución.....	35
Figura 11. Apariencia de la Materia Prima Empleada para la Extracción.....	41
Figura 12. Equipo Empleada para la Hidrodestilación Convencional .....	42
Figura 13. Equipo de Destilación Empleada para la Hidrodestilación con el Aparato de Dean-Stark.....	43
Figura 14. Micropipeta para Diluciones de los Aceites Esenciales.....	45
Figura 15. Apariencia de los Aceites de Tomillo Obtenidos de Acuerdo al Método de Extracción .....	48
Figura 16. Estructura del Timol y Carvacrol .....	49
Figura 17. Espectro Infrarrojo Obtenido del Aceite de Tomillo con el Método de Hidrodestilación con Dean- Stark .....	50
Figura 18. Espectro Infrarrojo Obtenido de la Muestra del Aceite Esencial de Tomillo con el Método de Hidrodestilación Convencional .....	50
Figura 19. Formación del Halo de Inhibición con el Control Positivo (Gentamicina) .....	55
Figura 20. Formación del Halo de Inhibición en la Placa con el Aceite Esencial de Tomillo al 100% .....	55
Figura 21. Formación del Halo de Inhibición en la Placa con el Aceite Esencial de Orégano al 100% .....	56
Figura 22. Halo de Inhibición de la Crema de Tomillo al 3% Frente al <i>Staphylococcus aureus</i> .....	57
Figura 23. Halos de Inhibición Presentados por las Distintas Diluciones del Aceite Esencial de Orégano	59
Figura 24. Halos de Inhibición Presentados por las Distintas Diluciones del Aceite Esencial de Tomillo	59
Figura 25. Inocuidad del Aceite de Oliva Frente al <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60

## TABLAS

Tabla 1. Interpretación del Método Kirby Bauer .....	36
Tabla 2. Definición de las variables de la investigación .....	38
Tabla 3. Promedio de la Masa del Aceite de Tomillo Obtenida de Acuerdo al Método de Extracción .....	47
Tabla 4. Porcentajes de Rendimiento Promedio de Hidrodestilación Convencional e Hidrodestilación con Dean- Stark .....	48
Tabla 5. Señales Obtenidas en el Espectro Infrarrojo para la Muestra de Tomillo por Hidrodestilación Convencional (HD) e Hidrodestilación por Dean- Stark (DS).....	51
Tabla 6. Composición de las Muestras de Tomillo por Hidrodestilación Convencional (HD) y de Tomillo y Orégano por Dean- Stark (DS) .....	53
Tabla 7. Halos de Inhibición de las Diluciones del Aceite Esencial de Orégano y Tomillo .....	60

**Resumen.**

La presente investigación se fundamenta en la acción antimicrobiana reportada para el aceite esencial de tomillo y orégano contra el *Staphylococcus aureus*, se realizó la extracción de los aceites esenciales mediante dos métodos, la hidrodestilación convencional y Dean-Stark, obteniendo para el segundo método un porcentaje de rendimiento de 0,59%, en comparación con un 0,31% para el primero, estas muestras fueron analizadas por espectroscopía infrarrojo y cromatografía de gases, en donde se reflejan los componentes mayoritarios de los aceites esenciales entre los cuales se destacan el timol, carvacrol y p-cimeno. Las pruebas microbiológicas, realizadas en agar, dieron resultados positivos, encontrándose halos de inhibición mayores a los del control positivo (gentamicina).

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### Planteamiento del problema

En el presente trabajo se abordará el tema de la resistencia a antibióticos, resulta de interés estudiar las posibles alternativas para uso antibacteriano de distintas fuentes como lo son los aceites esenciales provenientes de plantas de uso cotidiano, tratando de compensar así la problemática ya existente acerca de la resistencia a antibióticos, causada por su uso irracional.

Los antecedentes estudiados según lo mencionado por Shawar, Scangarella-Oman, Dalessandro, Breton, Twynholm, y Garges, (2009, p.47), arrojan valores preocupantes sobre la resistencia a antibióticos, de microorganismos que forman parte de nuestra flora bacteriana autóctona, que en condiciones normales no causarían ningún daño, pero cuando existe una ruptura de esta barrera fisiológica y especialmente en pacientes inmunocomprometidos, causan infecciones graves como es el caso del *Staphylococcus aureus*.

A sabiendas de que este es un problema de alcance mundial, según lo fundamentado por Cué, (2007, pp. 1-7) que en unos años afectará a la población en general, lo cual es una realidad social de interés de salud pública, se llega a las siguientes interrogantes: ¿Existen alternativas antibióticas distintas?, ¿Las alternativas que provienen de fuentes naturales son capaces de eliminar el microorganismo?, siendo la pregunta central ¿Es posible desarrollar formulaciones fitofarmacéuticas tópicas para pacientes diabéticos, a partir de las partes aéreas de dos drogas vegetales, a saber *Thymus vulgaris L* y *Origanum vulgare L*, capaces de inhibir el crecimiento del *Staphylococcus aureus*?

### Hipótesis

Es posible desarrollar formulaciones fitofarmacéuticas a partir de los extractos del aceite esencial de las partes aéreas de las drogas vegetales, *Thymus Vulgaris L* y *Origanum vulgare L*, demostrando acción antibacteriana.

## Objetivos

### Objetivo general

Evaluar la actividad farmacológica de formulaciones fito-farmacéuticas tópicas para pacientes diabéticos, desarrolladas a partir de las partes aéreas de dos drogas vegetales. A saber *Thymus vulgaris L* y *Origanum vulgare L*.

### Objetivos específicos.

Determinar el mejor método de extracción para los aceites esenciales de las drogas vegetales *Thymus vulgaris L* y *Origanum vulgare L*.

Evaluar la actividad antibiótica de los aceites puros de las drogas vegetales *Thymus vulgaris L* y *Origanum vulgare L*, frente al *Staphylococcus aureus*.

Identificar las concentraciones mínimas efectivas en las formulaciones fito-farmacéuticas de los extractos obtenidos a partir de las drogas vegetales *Thymus vulgaris L* y *Origanum vulgare L*, frente a la acción biológica del *Staphylococcus aureus*.

## Justificación

Según Berga (2009) el *Staphylococcus aureus* es un microorganismo normalmente presente en piel y mucosa como flora bacteriana indígena, bajo condiciones normales no produce ninguna alteración, sin embargo, cuando hay pérdida de la barrera cutánea o inmunosupresión, se comporta como patógeno, siendo causante de foliculitis, abscesos, impétigo, infecciones en tejidos blandos, neumonía necrosante progresiva, entre otros, por lo tanto la investigación se ve inclinada hacia los pacientes inmunosupresos, en donde la pérdida de la barrera es mucho más evidente, aunque en pacientes donde su inmunidad no está comprometida, es necesario evitar el aumento en la resistencia frente a los antimicrobianos existentes actualmente. (p.24)

Este patógeno en particular, es posiblemente el más versátil, ocasionando enfermedades por producción de toxinas o superantígenos. Invade fácilmente tejidos y órganos conduciendo a supuraciones, necrosis, trombosis vascular, se propaga a nivel hematológica rápidamente, además es causante de bacteriemias persistentes ya que posee la capacidad de permanecer inactivo y reactivarse meses o años después. Gómez, Núñez, Perozo, Bermúdez, y Marín (2016, pp. 3-4). Por lo tanto, es un patógeno sumamente agresivo. Siendo un problema de salud pública, se buscan alternativas para el tratamiento antimicrobiano existente, evitando así su progresiva resistencia a estos.

Aunque existe gran variedad de fármacos implementados para el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus aureus*, en la década de los años 60, según Bellido (2016, pp. 313-314) las infecciones causadas por *Staphylococcus aureus* que eran tratadas con  $\beta$ -lactámicos no respondían con normalidad, dándose cuenta que estaban frente a un caso de resistencia al tratamiento comúnmente utilizado, a los cuales llamaron *Staphylococcus aureus* resistente a las meticilinas (SARM), estos muestran una resistencia además a los  $\beta$ -lactámicos, a los aminoglucósidos, rifampicina, clindamicina, entre otros.

Según lo descrito por Nodarse (2009, pp. 34-37), existen cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilinas, mayoritariamente en pacientes hospitalizados, en donde se observa una resistencia de la bacteria frente los antibióticos, de hasta un 44,6%, además que las cepas resistentes se encuentran en lesiones primordiales en piel, como lo son las quemaduras, lesiones por pie diabético y úlceras por presión. Subsistiendo evidencia clara de resistencia de esta bacteria hacia los antibacterianos comúnmente utilizados en la terapéutica.

Por esta razón, a pesar de que existen fármacos eficaces frente a gram positivos, es necesaria la expansión de antimicrobianos, distintos a los existentes para evitar la resistencia cruzada de los gram positivos multirresistentes y gram positivos sensibles a meticilinas, lo cual fundamenta la implicación práctica de la presente investigación, en donde se elaborarán distintas formulaciones fito-farmacéuticas, a partir de drogas vegetales, como alternativas para el tratamiento de afecciones a nivel cutáneo, causadas por el *Staphylococcus aureus*.

El valor teórico de la investigación se ve plasmada en el enriquecimiento, tanto de información teórica como de resultados experimentales, en donde se probará la eficacia de las

drogas vegetales *Thymus vulgaris L* y *Origanum vulgare L*, en contra de uno de los microorganismos que más resistencia ha presentado según Echeverría, e Iglesias (2003, pp. 197-199), que además proporcionará una posible alternativa para el uso a nivel tópico en el tratamiento de afecciones en piel.

La utilidad metodológica en este caso es la demostración de forma experimental de los métodos utilizados, arrastre por vapor convencional y utilización de una trampa Dean –Stark, en cuanto a la efectividad para la extracción de los aceites esenciales de las plantas por utilizar, con el objetivo de que en posteriores investigaciones los autores conozcan cuál es el método con un mayor porcentaje de rendimiento, optando por la utilización del mismo, ahorrando tiempo y maximizando las horas de trabajo determinadas para para el proceso experimental.

Por ello, basándose en la medicina tradicional costarricense, se pretende analizar los conocimientos empíricos, y otros ya reconocidos por un ente internacional . (Organización Mundial de la Salud), de plantas utilizadas para el tratamiento de infecciones en las cuales el *Staphylococcus aureus* es un patógeno comúnmente asociado, y probar la sensibilidad de ese microorganismo frente a diluciones de distintas concentraciones de estas drogas, presentes en las formulaciones fito-farmacéuticas.

## **Antecedentes**

### **Internacionales**

Gómez, Núñez, Perozo, Bermúdez, y Marín (2016), exponen la presencia de *Staphylococcus aureus* en muestras procedentes de pacientes que llegaron al centro de salud de Maracaibo, en donde, de las 94 cepas aisladas positivas para *Staphylococcus aureus*, 56 fueron consideradas como resistentes a meticilinas, y la mayor proporción de estas fueron procedentes de abscesos, posteriormente heridas quirúrgicas y pie diabético. Lo anterior consolida la idea de la utilización de un fito-fármaco a nivel cutáneo, ya que se demuestra mayor incidencia en afecciones en piel.

Tamariz et al (2010), expone que en Perú se observaron cepas aisladas positivas a *Staphylococcus aureus*, alrededor del 58% eran resistentes a las meticilinas, teniendo que optar así por el uso de antibacterianos más fuertes (glucopéptidos), conduciendo a cepas con resistencia intermedia y absoluta a la vancomicina. Según González et al (2005), en Cuba, las cepas pertenecientes a la categoría de resistentes a meticilinas, presentaban resistencia a la penicilina y oxacilina en un 100%, y a la eritromicina, gentamicina, cotrimoxazol y tetraciclinas en más de un 50%, por lo que los datos de resistencia antibiótica son alarmantes.

Por lo descrito anteriormente, sobresale la necesidad de expandir, formular e investigar sobre nuevas alternativas antimicrobianas para evitar llegar a extremos, ya que la aparición de cepas multiresistentes es notoria, no solo a los  $\beta$ -lactámicos sino a otros grupo de antibióticos, provocando que con el pasar del tiempo las cepas sean resistentes a los antibióticos más fuertes como lo es la vancomicina, conllevando a la existencia de una falla terapéutica, y finalmente, sin ninguna duda comprometiendo la vida del paciente.

Asensio (2013), en su trabajo logra demostrar mediante métodos experimentales que el aceite esencial de orégano, inhibe cepas de *Staphylococcus aureus*, mediante la utilización de halos de inhibición, además Miladinović, et al (2012), describen que el aceite esencial de tomillo es el que tiene mayor actividad antibacteriana, sobre el aceite de lavanda y *C. nepeta*, comparando el aceite de tomillo con la eficacia de la tetraciclina. Ambos antecedentes son de suma importancia para la investigación, ya que logran demostrar de manera efectiva que los componentes por utilizar poseen actividad antimicrobiana.

## **Nacionales**

Según Gamboa, en el estudio realizado en el 2003 “Bacterias de importancia clínica en respiradores y aires acondicionados de hospitales de San José, Costa Rica”, nuestro país no escapa a este fenómeno, este microorganismo es comúnmente encontrado en hospitales, principalmente en respiradores y aires acondicionados, demuestra que una considerable cantidad de pacientes con enfermedades respiratorias tendrán que utilizar ventilación artificial, y un porcentaje de pacientes desarrolla neumonía, la cual es causada por *Staphylococcus aureus*. Este

antecedente es de importancia para la investigación, ya que se demuestra que pacientes que son inmunoconprometidos, se infectan fácilmente.

Chang, menciona en su tesis realizada en el 2010, “Evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano del orégano (*Origanum vulgare*) en polvo y en oleoresina y de la mostaza china (*Brassica rapa var. Pekinensis*) en polvo, como alternativa natural en productos cárnicos”, que el orégano al 2% es efectivo como antimicrobiano y que es una muy buena alternativa para la sustitución de preservantes sintéticos utilizados actualmente en el comercio, para la preservación de productos cárnicos.

Valverde, en su tesis “Enjuagues bucodentales a partir de Sustancias Naturales Costarricenses con propiedades antibacterianas aplicadas al control del Biofilme en el año 2012”, demuestra experimentalmente, mediante pruebas microbiológicas, que extractos hidroalcohólicos crudos de orégano, logran inhibir al *Streptococcus Mutans*. Este antecedente es de utilidad, ya que demuestra que extractos hidroalcohólicos del orégano, logran tener una acción antimicrobiana, contemplando una gran posibilidad en la investigación presente, que con la utilización de aceites esenciales se obtenga una concentración mucho mayor y por ende una mejor respuesta en los halos de inhibición.

Lizano, en el trabajo de grado realizado en el 2013, “Efecto de la aplicación de los aceites esenciales extraídos a partir de las hojas de la pimienta de jamaica (*Pimenta dioica*), hojas de canela (*Cinamomum zeylanicum*) y orégano (*Oreganum vulgare*) en la preservación de la carne de res.”, señala que la utilización de orégano, como preservante, tuvo un mejor rendimiento en cuanto a la capacidad de preservar carne de res que las hojas de jamaica y las de canela. Este antecedente logra demostrar que el orégano y el tomillo tienen acción antimicrobiana, lo cual es relevante para la investigación, puesto que ya existen apoyos a nivel experimental que las plantas por investigar poseen la actividad predicha y esperada.

Nuñez, en el 2014, en su tesis expone que no solo debe limitarse al pensar que este microorganismo se encuentra a nivel hospitalario en el tratamiento de humanos, sino que se encuentra también en el ámbito hospitalario en medicina veterinaria, siendo este un factor importante a tomar en cuenta, en cuanto a posible transmisión al ser humano y viceversa. (p.18). Lo mencionado, prueba tener un gran valor para la investigación, ya que demuestra la existencia

del *Staphylococcus aureus* resistente a metilcilinas, tanto a nivel humano como veterinario, recalcando la necesidad de desarrollar nuevos antibióticos, evitando nuevas cepas resistentes.

Además, se logró determinar como alternativa de acción antibacteriana al tomillo, en donde se reconoce su posible utilización como desinfectante de cavidades, en un trabajo de grado realizado por Días y Montero (2015) “Sustancias alternativas con acción antimicrobiana para la elaboración de desinfectantes de cavidades a partir de macadamia (*Macadamia Intergrifolia*) y tomillo (*Thymus vulgaris L.*)”.

### **Proyecciones**

Este estudio beneficiará a la población en general con el logro de formulaciones tópicas para combatir las infecciones provocadas por *Staphylococcus aureus*, en la piel de pacientes diabéticos, que según estudios, en la actualidad la resistencia de dicha bacteria va en aumento, y para el año 2050 se prevé que los antibióticos actuales no tendrán ningún efecto sobre ella.

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

En este capítulo se abarcan los temas y conceptos necesarios para el entendimiento de la investigación, como concepción general de lo que a fitoterapia y drogas vegetales concierne, tanto en el extranjero como en el país.

### **Fitoterapia**

Se puede plantear como el simple hecho de utilizar una planta “medicinal” para conseguir un efecto deseado cuando hay algún estado de enfermedad, ya que la Sociedad Española de Fitoterapia en el 2003 [SEFIT], la define como el uso de productos vegetales con un propósito terapéutico, ya sea prevenir, aliviar o curar alguna patología presentada, teniendo como objetivo primordial mantener el estado de salud. La base primordial de los medicamentos fitofarmacéuticos son las drogas vegetales, por lo tanto es necesario conocer a qué se refiere este término.

### **Droga vegetal**

Según Vanaclocha y Cañigüeral (2003), cuando se habla del mundo vegetal, se sabe que es muy frecuente que solo una parte de la planta (tronco, raíz, hojas, flores, fruto, pseudofruto), tenga actividad farmacológica, y a esta se le llama droga vegetal, la cual es parte de la planta medicinal. Los principios activos encontrados en las drogas vegetales, son responsables de la actividad farmacológica que estos presentan y son procedentes del metabolismo secundario. (p.29),

Cañigüeral, (2002), indica que las drogas vegetales son muy complejas, ya que no solo poseen los componentes que realizan la acción farmacológica, sino que tienen otros componentes que modifican su acción, existen algunos que logran potenciar acciones (coadyudantes), o aquellos que aunque estén presentes son carentes de actividad (inertes). Conociendo que los

principios activos son los responsables de producir la acción terapéutica y por lo tanto, tener una acción sobre el organismo provocando una respuesta a ello, cuando se hace referencia a drogas vegetales los principios activos son los metabolitos secundarios. (pp. 105-106),

### **Metabolito secundario.**

El metabolismo es una serie de reacciones químicas que realizan todas las células de los organismos vivos para sintetizar o degradar sustancias complejas y generar sustancias más simples, los organismos que son autótrofos, poseen tanto metabolismo secundario como primario. Las plantas acumulan fuentes de carbono y nitrógeno para la formación de moléculas (aminoácidos, nucleótidos y azúcares) que serán utilizadas para el funcionamiento normal como organismo, a eso se le llama metabolismo primario, pero una cantidad de carbono y energía es utilizada para la formación de moléculas orgánicas que no están relacionadas directamente al funcionamiento como organismo, a eso se le llaman metabolitos secundarios. (Ávalos y Pérez, 2011, pp. 119-121)

Debido al papel fundamental que poseen los metabolitos secundarios, es necesario conocer los métodos empleados para obtener los aceites esenciales a partir de los cuales pueden extraerse las sustancias activas.

### **Aceite esencial.**

Los aceites esenciales son mezclas de más de 100 componentes, por lo cual se denominan como mezclas complejas, poseen componentes entre los cuales destacan los monoterpenos, alcanos, alcoholes, aldehídos, sesquiterpenos y fenilpropanos. Los aceites esenciales son volátiles, fácilmente destilables por técnicas como el arrastre con vapor de agua y se les atribuye el aroma característico de algunas plantas, son importantes en la industria cosmética en la fabricación de perfumes, en la alimentaria por su utilización como condimentos y a nivel farmacéutico, para la elaboración de fito-fármacos cuando estos poseen una acción terapéutica. Martínez, A. (1996, p.1)

Una vez que se dispone de los componentes responsables de la actividad farmacológica, correspondiente a los metabolitos secundarios extraídos de los aceites esenciales, pueden desarrollarse formulaciones a base de ellos y que son denominados fitofármacos.

### **Fitofármacos o Fitomedicamentos**

Cañigueral, (2002, p.108), detalla que se conoce como fitofármacos o fitomedicamentos, a todas aquellas preparaciones que posean como principios activos exclusivamente productos de origen vegetal. Además deben poseer una forma farmacéutica adecuada para la administración y los preparados sean convenientes para el paciente, y se emplean para su elaboración: drogas vegetales trituradas, extractos o principios activos que previamente han sido purificados.

Para que un fármaco o fitofármaco produzca la acción para el cual fue destinado, es necesario conocer varios aspectos entre los que destacan la vía de administración idónea tanto para la forma farmacéutica como para el paciente en particular, por lo tanto es necesario la descripción de vías de administración.

### **Vías de administración**

Según Sánchez (2007), se le conoce como vía de administración de fármacos, a aquellas rutas de entrada del mismo al organismo, son fundamentales para que los medicamentos lleguen a su lugar de acción, es decir es el camino elegido para que un fármaco llegue al lugar en donde tendrá que realizar su acción farmacológica (célula diana). Algunos fármacos dependiendo de la vía pueden presentar variaciones cuantitativas, ya existe influencia en latencia, intensidad y duración del efecto. (p.47).

## **Formas de administración sobre la piel.**

La vía dérmica, es aquella en donde la aplicación del medicamento se hace sobre la piel para tener un efecto local o sostenido si se utiliza un parche transdérmico, por lo tanto, Alonso (2001), ilustra que sobre la piel se aplicarán varios tipos de formulaciones con diversa naturaleza fisicoquímica, con fines ya sea terapéutico o cosmético. Entre ellos los más destacados están las formas farmacéuticas líquidas (soluciones, suspensiones y emulsiones), las sólidas (polvos suavizantes, lubricantes), y las semisólidas.

## **Formas farmacéuticas**

Se refiere a forma farmacéutica, la combinación que existe entre el o los principios activos y los excipientes que permiten la facilidad de dosificación, administración y liberación del medicamento en el paciente. Farmacopea de Estados Unidos (2013, p. 947). En otras palabras es la disposición individualizada, de la sustancia que produce el efecto (principio activo) y las sustancias que son farmacológicamente inactivas (excipientes), que juntas constituyen lo que se conoce como medicamento.

## **Pomadas.**

Son un grupo heterogéneo de preparados farmacéuticos, los cuales se caracterizan por su consistencia semisólida, destinadas para la aplicación en la piel, con el fin de tener una acción a nivel local o lograr la penetración de los principios activos. Todos los preparados de consistencia semisólida están englobados aquí, pero existen otras categorías como por ejemplo: las pomadas, cremas, geles y las pastas. Alonso (2001, pp. 306, 314).

### ***Pomadas.***

Propiamente las pomadas constan de un excipiente de una sola fase en la cual pueden estar dispersos sólidos o líquidos. De esta categoría son de gran importancia las absorbentes de agua, las cuales pueden absorber grandes cantidades del líquido, en estas se usan emulgentes tipo agua en aceite W/O.

### ***Crema.***

Estas están constituidas por dos fases, la lipófila y la acuosa. Las cremas refrescantes son emulsiones que seden con facilidad el agua que contienen cuando son aplicadas sobre la piel, ya que al aumentar la temperatura la emulsión se rompe; las clásicas formulaciones son a base de ceratos con agua.

## **Orégano**

A continuación se realiza la descripción de las propiedades de las plantas utilizadas en esta investigación, tomando en cuenta los criterios de dos principales fuentes: Vanaclocha y Cañigüeral (2003, p. 391 y 476-478) y Cepae, (1999, pp. 285-293 y pp.383-389).

El *Origanum vulgare* es una planta herbácea aromática, puede medir hasta 60 cm de altura, cubierto en su totalidad por pelos glandulares, su tallo es erecto y color rojizo, hojas opuestas y enteras, las flores presentan colores rosa o moradas, que sobresalen como ramos finales. Fonnegra, y Jiménez (2007, p.193)

## **Droga vegetal**

Para la extracción del aceite esencial en la planta por utilizar en la investigación en este caso el orégano, las partes a utilizar son la hierba florecida, y las partes aéreas de las plantas.

## **Propiedades del orégano**

A nivel externo el aceite esencial de orégano, se caracteriza por la funcionalidad en los aspectos: analgésico, cicatrizante, antiséptico y antifúngico, por lo tanto en formulaciones a nivel cutáneo presenta características muy favorables.

### **Actividad antimicrobiana.**

En estudios se ha determinado que en extractos al 80%, en concentraciones de 250 µg/mL del orégano en etanol, se logra demostrar que existe actividad contra varios microorganismos de importancia clínica, entre los cuales podemos nombrar a el *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoneae*, *Proteus mirabilis*.

### **Efecto antiinflamatorio.**

Se han realizados estudios en los que se determinó que en orejas de ratones en los cuales hubo aplicación externa de 20µL del extractos etanólico, en concentraciones de 2mg por mL de las hojas del orégano, demostraron actividad antiinflamatoria.

### **Actividad antioxidante.**

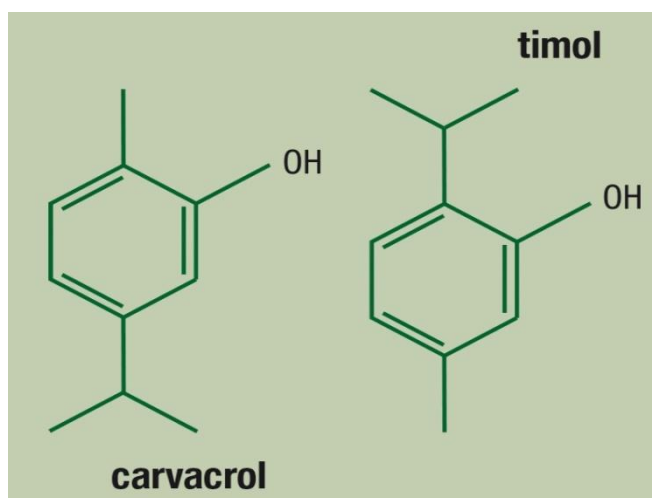
Las fracciones de Taninos y los extractos acuosos de etanol, de las sumidades floridas y de las hojas, han demostrado un fuerte poder antioxidante a nivel de experimentación in vitro. Por

medio de ensayos de calorimetría, se determinó que para ser efectiva como antioxidante, los extractos acuosos de etanol deben tener concentraciones de 16mg/mL.

### Componentes del aceite esencial de orégano

Los principales componentes del aceite volátil son el timol (0,1-1%) y el carvacrol (40-70%), Contiene alrededor de 0,15-1,2% de aceite volátil, en la droga anhidra presenta no menos de un 2,5% de aceite volátil y mínimo 1,5% tanto de Timol como carvacrol. (Vanaclocha y Cañigueral, 2003, p. 391).

**Figura 1 Principales Componentes del Aceite Esencial de Orégano**



Fuente: Google imágenes

### Efectos secundarios y toxicidad

Según Cepae (1999, p.292) hasta el momento no se han encontrado reacciones adversas, en cuanto a toxicidad, en ratones se determinó que la dosis letal administrándose de forma intraperitoneal es de 1g/kg. ( p.292)

## **Tomillo**

A continuación se realiza la descripción de las propiedades de las plantas utilizadas en esta investigación, tomando en cuenta los criterios de dos principales fuentes Vanaclocha y Cañigueral (2003, p. 391 y 476-478) y Cepae, A. (1999, pp. 285-293 y pp.383-389).

El tomillo un arbusto de tipo aromático con intenso olor, puede medir hasta un metro, tallo leñoso, muy poblado de hojas lineares, opuestas, las flores son color púrpura o blancas, muy pequeñas, agrupadas en el extremo final de la planta, dando la ilusión de un pequeño ramillete. (Centro Nacional de Información de Medicamentos, 2002, p.97).

### **Droga vegetal**

Para la extracción del aceite esencial en la planta por utilizar en la investigación, en este caso el tomillo, las partes de interés son la hierba florecida, y las partes aéreas de las plantas.

### **Propiedades del tomillo**

Se le atribuyen a las especies del género *Thymus* propiedades fuertes con acciones antibacterianas, antifúngicas, antivirales y antioxidantes, lo cual será relevante para el uso en el tratamiento de afecciones a nivel cutáneo. (Imelouane et al, 2009, p.205).

#### **Actividad antimicrobiana y antifúngica.**

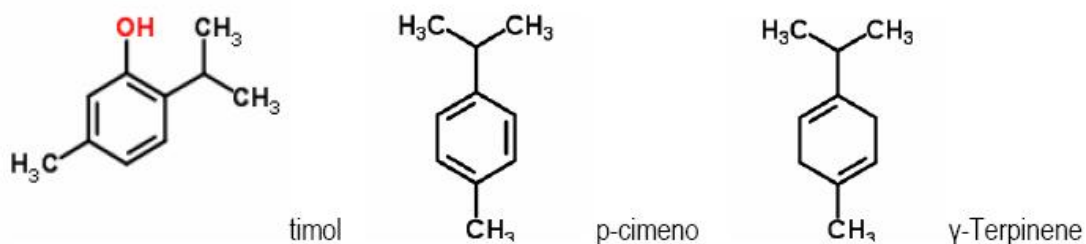
En estudios in vitro, se refleja que el aceite esencial de tomillo contiene componentes como el timol, el cual tiene acción antifúngica sobre los hongos *Cryptococcus neo-formans*, *Aspergillus*, *Saprolenia*, además de la acción antibacteriana sobre la *Salmonella thyphimurium*,

*Staphylococcus aureus* y *Escherlichia coli*, asimismo demostró tener un mejor efecto antibiótico que el fenol, y presentando la gran ventaja de ser menos tóxico, ampliando así la posibilidad de ser utilizado a nivel humano. (Cepae, 1999, p.388)

### Componentes del aceite esencial del tomillo

Los componentes principales del aceite esencial son el timol y el carvacrol los cuales representan un 64% del aceite, cuando se realiza la extracción del aceite esencial volátil se logra destilar alrededor de un 1%, en otras palabras, por cada 100 mg de material vegetal que se destile, se obtendrá alrededor de 1mL de aceite esencial (Cepae, 1999, p.386). Asimismo otros autores se refieren a la composición del aceite en donde el compuesto predominante es el timol, el cual representa hasta el 51.34%, mientras que el agrupado de los demás componentes son menos del 19%. (Prasanth et al, 2014, p.2).

**Figura 2 Principales Componentes del Aceite Esencial de Tomillo**



Fuente: Google imágenes

### Efectos secundarios y toxicidad

Según Barrientos, Cano, Chávez y Godínez, (2001), el aceite esencial de tomillo puede causar hiperemia, inflamación severa y convulsiones cuando exista una dosis elevada por vía oral. Tanto la planta como el aceite son estimulantes uterinos, por lo tanto debe ser evitado en mujeres embarazadas, el aceite en concentraciones muy elevadas puede causar dermatitis, quelitis

y glositis, cuando se usa como dentífrico. La dosis letal media del timol por vía oral es en ratas 980mg/kg y la del carvacrol en conejos es de 100mg/kg.

Una vez descritas las características de las plantas de interés, se abordará la importancia de la eliminación de la bacteria en cuestión y todo lo concerniente a ello, por lo tanto, los conceptos básicos se abordarán de la siguiente manera:

## **Bacterias**

### **Mecanismos de resistencia antimicrobiana**

Las bacterias pueden presentar resistencia, ya sea de tipo natural o intrínseca, la cual puede estar relacionada con la exposición al uso de los agentes antibacterianos de manera indiscriminada. Por otro lado la resistencia también se puede dar por mutaciones que presenten las bacterias, ya sean pequeñas o grandes, en donde hay un intercambio de material genético de forma extra-cromosómica, ya sea inter o intra-especie, por lo tanto la bacteria será capaz de adquirir la resistencia sin necesidad de exponerse múltiples veces a la sustancia antimicrobiana. Algunos mecanismos de resistencias son los siguientes: (Echeverría, J. e Iglesias, D, 2003, p.196)

#### **Inactivación enzimática.**

La bacteria produce una serie de enzimas capaces de degradar la estructura química del antimicrobiano, causando con ello la pérdida de su función y por lo tanto, causará la falla terapéutica. Un ejemplo característico es la producción de  $\beta$ -lactamasas, que degradan el anillo  $\beta$ -lactámico de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

### **Alteración en barreras de permeabilidad.**

Se denotan dos mecanismos, en el primero logran alterar los poros por los cuales penetran normalmente los antibióticos la membrana externa de la bacteria, y el segundo cambian el flujo activo normal de membrana, disminuyendo el ingreso del antibiótico y promoviendo la expulsión del mismo.

### **Alteración del sitio blanco del antibiótico.**

El sitio blanco del antibiótico, es el lugar en donde el antimicrobiano se une a la bacteria para ejercer su efecto, normalmente son estructuras de naturaleza proteica, las cuales son indispensables para la función y supervivencia de las bacteria, por lo tanto la alternación del sitio consiste en qué bacteria muta, para cambiar el aspecto del sitio blanco o del todo modifica la estructura para así crear resistencia al antibiótico y este ya no los mate.

### ***Staphylococcus aureus***

Es un Micrococaceo gram positivo, se dispone en racimos irregulares, de ahí proviene el nombre de cocos, aunque también crecen aislados o en parejas, anteriormente se clasificaron en un grupo de micrococos responsables de inflamación y supuración. Estos microorganismos crecen en diversas condiciones ambientales, entre los 30-37°C, son resistentes a la desecación y desinfectantes, para diferenciarlos de otros géneros de gram positivos, se puede realizar la prueba de catalasa. (Fernández, García, Pérez y Blázquez, 2016, pp.1-4)

### ***Staphylococcus aureus* resistente a metilcilinas.**

Se le conoce así a los *Staphylococcus aureus* resistentes a todos los  $\beta$ -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenems) la razón por la cual existe una baja afinidad es que presentan el gen mec A, este codifica para la producción de una nueva proteína fijadora de penicilina (PBP 2a), además como resultado de la transposición y la integración de sitios específicos en el cromosoma, estos de igual manera presentan resistencia a otros grupos de antibióticos, como lo son los macrólidos, aminoglucósidos, sulfas, quinolonas, resultando como única opción el tratamiento con vancomicina. (González, Morffi, Nadal, Vallin, Contreras, y Roura, 2005, párr 2)

### **Infecciones cutáneas producidas por *Staphylococcus aureus*.**

Es común que los pacientes comiencen con lesiones supuradas de piel, pústulas, en pacientes jóvenes inician con lesiones de piel y partes blandas, que rápidamente evolucionan en abscesos o ántrax; en casos severos los pacientes pueden evolucionar y presentar cuadros respiratorios necrosantes graves. (Notario et al, 2007, p.81).

### **Pacientes susceptibles a infección.**

Según Arias et al (2016), se ha logrado identificar como factor de riesgo aquellos pacientes los cuales hayan utilizado antibióticos de amplio espectro con anterioridad, entre los cuales destacan los carbapenems, vancomicina, quinolonas y beta-lactamas, en ese orden de importancia, también en pacientes seriamente inmunocomprometidos (en este caso los de la unidad de cuidados intensivos y pacientes diabéticos), en donde la utilización de catéteres vasculares, coronarios y gástricos es común, siendo la contaminación de este tipo de equipos la posible causa de una contaminación cruzada, por lo tanto la comorbilidad y la inmunosupresión se han visto como los factores más importantes en las bacteriemias causadas. (p.695)

### ***Pie diabético.***

Se conoce así al síndrome clínico, el cual es una complicación crónica grave de la diabetes mellitus, de etiología multifactorial, ataca principalmente a las extremidades inferiores, es ocasionada y exacerbada por una neuropatía de tipo sensitivo-motora, angiopatías, edema y problemas a nivel de sistema inmune, en donde primeramente existe una ulceración que se condiciona a infección conllevando a la gangrena de la extremidad y cuyo desenlace es la hospitalización del paciente o cirugía mutilante que incapacita a la persona de manera parcial o definitiva. (Castro et al, 2009, p.484).

### ***Tipos.***

Relacionado con la patología diabética se encuentran dos tipos de lesiones muy relacionados entre sí, los cuales son: las úlceras por presión, aquellas caracterizadas por el daño causado a nivel de piel y tejidos subyacentes, por fricción o presión. Por otra parte se encuentra la úlcera por neuropatía diabética en donde existe una lesión provocada por la disminución o ausencia de la sensación dolorosa, inducida por la desmielinización de las fibras a nivel de neuronas sensitivas. Las úlceras por presión que son de interés para esta investigación, de acuerdo con el Servicio Madrileño de Salud se subdividen según su grado de la siguiente manera (2010, pp. 20-21).

Las úlceras por presión de grado 1, se identifican por un eritema cutáneo que no decolora en piel intacta, puede haber o no aumento de la temperatura, en personas afroamericanas este signo se presenta como una mácula hiperpigmentada, y en las de grado 2, hay una pérdida parcial del grosor de la piel que afecta a la epidermis, a la dermis o a ambas. La úlcera es superficial y se presenta clínicamente como una abrasión o una ampolla. Servicio Madrileño de Salud (2010, pp. 20-21).

**Figura 3. Úlcera por Presión Grado 1**



Fuente: Servicio Madrileño de Salud, 2010.

**Figura 4. Úlcera por Presión Grado 2**



Fuente: Servicio Madrileño de Salud, 2010.

Aunque existen varios tipos de úlceras diabéticas, la clasificación más usada es la Escala de Wagner, la cual según Castillo, Fernández, y Del Castillo (2014, p.6).

**Figura 5. Escala de Wagner**

Grado	Lesión	Características
0	Ninguna, pie de riesgo.	Callos gruesos, cabezas metatarsianas prominentes, dedos en garra, deformidades óseas.
1	Úlceras superficiales.	Dstrucción total del espesor de la piel.
2	Úlceras profundas.	Penetra en la piel, grasa ligamentos pero sin afectar al hueso, infectada.
3	Úlceras profundas más absceso.	Extensa, profunda, secreción y mal olor.
4	Gangrena limitada	Necrosis de parte del pie.
5	Gangrena extensa	Todo el pie afectado, efectos sistémicos.

Fuente: Guía de práctica clínica en el pie diabético, 2014.

### *Tratamiento.*

Señala el Servicio Madrileño de Salud (2010), que la técnica de cura húmeda se realiza manteniendo el lecho de la herida aislada del exterior, lo cual facilita el desbridamiento autolítico conllevando a la facilitación del proceso de cicatrización. Se usan en heridas abiertas, los apósitos que facilitan esto son los hidrocoloides, espumas y alginatos, los cuales absorben agua y los que hidratan como lo son los hidrogeles. (p.37)

### *Hidrocoloides.*

Son apósitos que en su mayoría están compuestos por carboximetilcelulosa sódica, tiene la característica de absorber fluidos, funcionan de manera que en contacto con la herida, absorben

el exudado formando un gel evitando así la adherencia al lecho de la úlcera. Están recomendados para el tratamiento de las úlceras de grado 2, con un exudado de leve a moderado. (Pastas y gránulos). Servicio Madrileño de Salud (2010, p.35).

### **Métodos de extracción de aceites esenciales**

La extracción corresponde a un proceso en el cual se separa selectivamente, el o los componentes de una mezcla. Para este efecto se pueden utilizar distintas técnicas las cuales se describen a continuación

#### **Arrastre por vapor**

Este proceso se basa en la capacidad de las moléculas de vapor de agua para asociarse con las moléculas de los aceites esenciales, en donde un líquido que es insoluble en agua, y tiene una presión de vapor apreciable a la temperatura a la cual la otra sustancia ebulle, esta podrá destilarse, arrastrando el líquido insoluble por medio del vapor de agua. En este método se reducen los daños que se puedan causar a los aceites esenciales, ya que permite la máxima difusión del vapor a través del material vegetal; además, una característica importante es que los aceites esenciales son sustancias volátiles e insolubles en agua por lo tanto, es factible el arrastre de estas por el vapor de agua. (Lamarque et al, 2008, pp.49-50)

#### **Dean Stark**

Es un aparato utilizado a nivel del laboratorio, el cual consta de una pieza cilíndrica de vidrio, con graduación volumétrica en toda su longitud, similar a una bureta, la parte superior del cilindro se conecta con el condensador. De la parte superior se despliega un brazo que se inclina

de forma vertical y conecta para adaptarse al matraz en donde está ocurriendo la reacción. Durante el proceso los vapores que se forman por el disolvente de la reacción, el componente a eliminar y el compuesto de interés suben del matraz hacia el conducto que los lleva al refrigerante, el cual lo condensa y cae al colector Dean- Stark, al ser líquidos inmiscibles se van a separar en capas por diferencia de densidades. (Angurell, et al, 2014, párr.2).

Para la comparación de los métodos y determinación de cuál es el sobresaliente, se utilizará la fórmula para determinar el porcentaje de rendimiento de extracción de los aceites de acuerdo con León, Fortich, del Rosario y Martínez (2015. Parr.13).

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{W_{AE}}{W_{MV}} \times 100$$

Donde,  $W_{AE}$  es el peso (g) obtenido del aceite esencial y  $W_{MV}$  corresponde al peso en gramos (g) del material vegetal.

### **Identificación de compuestos**

Para la comprensión de cómo se podrá llevar a cabo la identificación de los compuestos, después de la obtención de los aceites esenciales, se hará una revisión de los conceptos fundamentales que serán utilizados en la metodología de la investigación. Utilizando como referencia principal a la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. (2007, pp.1-4)

### **Cromatografía**

Es esencialmente la separación de una mezcla de dos o más compuestos que se distribuyen en dos fases, una se denomina estacionaria y la otra como fase móvil. Existen varios tipos de cromatografía las cuales se ven determinadas por las fases involucradas en el proceso, pueden ser sólido-líquido (capa fina, papel o columna) líquido-líquido y líquido-gas

(cromatografía por fase de vapor), todas las técnicas se fundamentan en la afinidad de los compuestos por alguna de las dos fases.

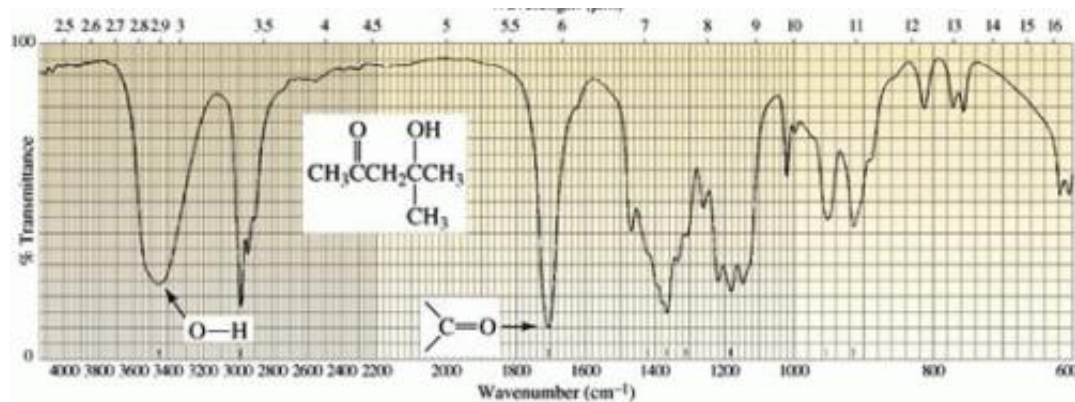
### Cromatografía de gases.

Es una técnica de separación, en la cual la fase gaseosa atraviesa una columna llena de sólido, el principio en el cual se basa el procedimiento es el coeficiente de reparto de cada compuesto, ya que después de la inyección de los compuestos, estos serán arrastrados por el gas, el cual tiene la característica de ser inerte para no reaccionar con los distintos compuestos, y dependiendo del coeficiente de reparto se van quedando más o menos tiempo en la fase estacionaria, provocando la separación de los componentes y con el acople de algún sistema (espectroscopia de gases) estos pueden ser detectados a la salida. (Dozal, 2010, pp. 19-21)

### Espectroscopia Infrarrojo

El espectro de absorción infrarrojo de una sustancia, está constituido por una gran cantidad de bandas de absorción, aunque no pueden indicar con exactitud de qué molécula se trata, brinda una vasta cantidad de información acerca de los grupos funcionales y los rasgos más característicos de la molécula. (Pickering, 1980, p.299)

**Figura 6. Espectro de Absorción Infrarrojo**



Fuente: google imágenes

**Figura 7. Absorciones IR Características de Algunos Grupos Funcionales**

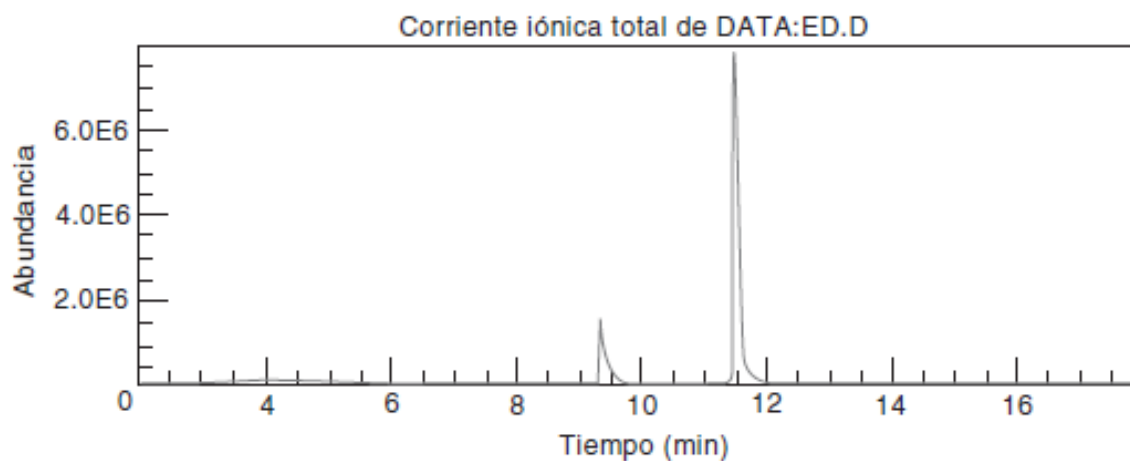
Grupo funcional	Absorción (cm <sup>-1</sup> )	Intensidad	Grupo funcional	Absorción (cm <sup>-1</sup> )	Intensidad
Alcano			Amina		
C-H	2850-2960	Media	N-H	3300-3500	Media
Alqueno			C-N	1030-1230	Media
=C-H	3020-3100	Media	Compuesto carbonílico		
C=C	1640-1680	Media	C=O	1670-1780	Fuerte
Alquino			Ácido carboxílico		
≡C-H	3300	Fuerte	O-H	2500-3100	Fuerte, amplia
C≡C	2100-2260	Media	Nitrilo		
Haluro de alquilo			C=N	2210-2260	Media
C-Cl	600-800	Fuerte	Nitro		
C-Br	500-600	Fuerte	NO <sub>2</sub>	1540	Fuerte
Alcohol					
O-H	3400-3650	Fuerte, amplia			
C-O	1050-1150	Fuerte			
Areno					
C-H	3030	Débil			
Anillo aromático	1660-2000	Débil			
	1450-1600	Media			

Fuente: McMurry, 2008

### Espectrometría de masas con cromatografía de gases

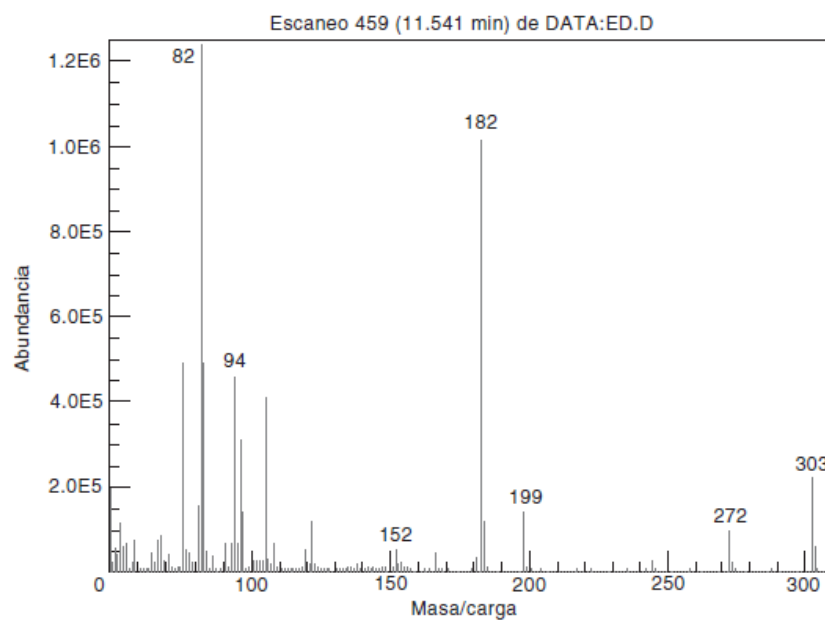
Se refiere a la espectrometría de masas a la técnica instrumental sofisticada que produce, separa y detecta iones en fase gaseosa. Para la detección de los iones el espectrómetro puede funcionar de distintas maneras, entre las cuales se puede mencionar al modo corriente iónica total, el cual detecta la suma de las corrientes de todos los fragmentos iónicos en un máximo, el otro es el modo selectivo de ión en donde se monitorea la relación de la masa con la carga, por lo cual solo se detectarán las moléculas que produzcan un fragmento molecular con esa relación. El espectro de masas es característico de cada compuesto por lo cual ninguno podrá ser igual, creando un tipo de “huella digital”, así que una sustancia desconocida puede ser identificada por medio de un patrón. (Gary, 2009, pp. 593-594, 599-601).

**Figura 8. Cromatografía de Gases de Cocaína en una Muestra de Orina por Corriente Iónica Total**



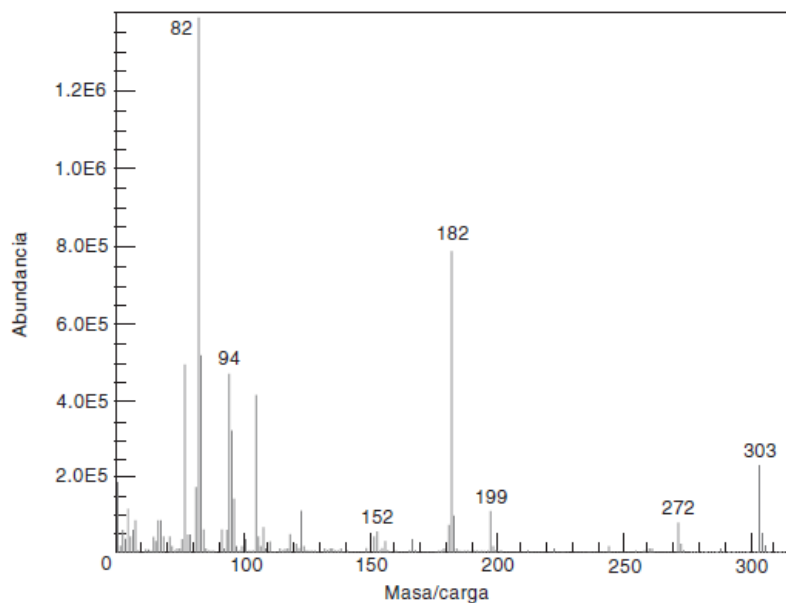
Fuente: Gary, C, 2009.

**Figura 9 Espectro de Masas Tomado del Máximo a 11,5 min**



Fuente: Gary, C, 2009.

**Figure 10. Espectro de Masas Tomado del Máximo de Cromatografía de Gases de un Estándar de Cocaína en el Mismo Tiempo de Elución**



Fuente: Gary, C, 2009.

## Microbiología

Para la comprobación de la acción antibacteriana de los aceites esenciales provenientes de las plantas anteriormente descritas, se debe conocer y abarcar un poco de lo que concierne a las pruebas microbiológicas y en sí a microbiología, por lo tanto se divisarán de la siguiente manera:

### Pruebas de sensibilidad a antibióticos

#### Método del antibiograma disco-placa.

El antibiograma, basado en el trabajo de Bauer, Kirby, consiste en depositar la bacteria en una placa de agar (rayar la placa), posteriormente se colocan los discos de papel secante, los cuales están impregnados con el antibiótico. Inmediatamente que el disco impregnado esté en contacto con la superficie húmeda de la placa, el filtro absorbe agua y el antibiótico se difundirá

por el agar, formando radios de gradiente de concentración. Después de 18-24 horas de incubación, se formarán alrededor de los discos zonas en donde no creció la bacteria, esto se conoce como halos de inhibición (García, et al, 2000, p.4)

### ***Concentración mínima efectiva.***

Corresponde la concentración de la sustancia antibiótica más pequeña que será capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria en un periodo de incubación de 18-24h. Además, dependiendo a la respuesta que estos tengan ante el agente antimicrobiano, se clasifican de la siguiente manera:

Resistente (R): Aquellos que no son susceptibles en pruebas *in vitro*, es decir no son inhibidas por las concentraciones del antibiótico a nivel sanguíneo que normalmente son alcanzadas con las dosis habituales del mismo.

Sensible (S): Estas sí poseen susceptibilidad *in vitro*, ya que con dosis adecuadas y habituales del antibiótico muestran ser sensibles e inhiben la bacteria en cuestión. (Ministerio de Salud del Perú, 2002, p.12)

**Tabla 1. Interpretación del Método Kirby Bauer**

Agente Antimicrobiano Aminoglucósidos	Diámetro de la zona de inhibición en mm		
	Resistente < o =	Intermedio	Sensible > o =
Amikacina	14	15-16	17
Gentamicina	12	13-14	15
Kanamicina	13	14-17	18
Netilmicina	12	13-14	15

Fuente: Bernal y Guzmán (1984)

### CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

En el presente capítulo se describen los procesos metodológicos llevados a cabo para la obtención de los resultados.

#### Enfoque

El estudio a continuación presenta un enfoque de tipo cuantitativo, ya que mediante la obtención de resultados de forma experimental, se busca demostrar una hipótesis planteada al inicio de la investigación, por medio de la manipulación de las variables para llegar a resolver el planteamiento del problema. (Hernández, Fernández y Baptista 2014, p.5)

#### Diseño

Se presenta en esta investigación un diseño de tipo experimental, ya que las condiciones en las que se realiza son controladas, se basa en hipótesis establecidas previamente, y el investigador posee un mayor control en cuanto a la manipulación de las variables. (Hernández et al, 2014, p.150)

#### Objeto de Estudio

En el presente estudio será objeto de investigación el siguiente microorganismo:

- ✓ *Staphylococcus aureus*

Evaluando la acción antimicrobiana de las siguientes drogas vegetales, sobre el microorganismo descrito:

- ✓ *Thymus vulgaris*
- ✓ *Origanum vulgare*

### Criterios de Inclusión

- ✓ Para la presente investigación se utilizará como fuente de material vegetal, a las plantas *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*, en ambos casos serán las partes aéreas de la planta (hojas).

### Criterios de Exclusión

- ✓ En el mismo caso para las plantas tanto *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*, se excluirán de la investigación las partes compuestas por el tallo, la raíz y flores, pertenecientes a las plantas anteriormente descritas

### Variables

**Tabla 2. Definición de las variables de la investigación**

Objetivo	variable	Definición conceptual	Definición operacional	Instrumentalización
Determinar el mejor método de extracción para los aceites esenciales las drogas vegetales <i>Thymus vulgaris</i> L y <i>Origanum vulgare</i> L.	Arrastre por vapor,	Obtención del aceite esencial volátil insoluble por medio de su arrastre con el vapor de agua. (Lamarque, et al, 2008, pp.49-50)	Extraer metabolitos activos de las plantas a estudiar mediante la utilización de un equipo de destilación por arrastre con vapor.	Se medirá el porcentaje de aceite extraído mediante el pesaje de las muestras de los aceites extraídos experimentalmente en balanza analítica.
	Aparato de	Utilización de un	Extraer	Se medirá el

	Dean- Stark	aparato de Dean-Stark, el cual separa líquidos inmiscibles que se separan en capas por diferencia de densidades. Angurell, et al (2014, párr.2).	metabolitos activos de las plantas a estudiar mediante la utilización de un aparato de Dean-Stark	porcentaje de aceite extraído mediante el pesaje de las muestras en balanza analítica.
Evaluar la actividad antibiótica de los aceites puros de las drogas vegetales <i>Thymus vulgaris</i> L y <i>Origanum vulgare</i> L, frente al <i>Staphylococcus aureus</i> .	Prueba de sensibilidad antibiótica.	El antibiograma se basa en halos de inhibición que producen ciertas sustancias sobre una bacteria la cual es sensible (García, et al, 2000, p.4)	Realizar prueba de sensibilidad a antibióticos, midiendo los halos de inhibición que producen el aceite esencial de tomillo y orégano	Medición de los halos de inhibición
	Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales.	La concentración mínima inhibitoria se refiere a la mínima concentración necesaria para que la sustancia inhiba el	Realizar prueba de sensibilidad a antibióticos, midiendo los halos de inhibición que producen el aceite esencial de tomillo y orégano	Medición de los halos de inhibición

		crecimiento de la bacteria (García, et al, 2000, p.4)		
Identificar las concentraciones mínimas efectivas en las formulaciones fitofarmacéuticas de los extractos obtenidos a partir de las drogas vegetales <i>Thymus vulgaris</i> L y <i>Origanum vulgare</i> L, frente a la acción biológica del <i>Staphylococcus aureus</i> .	Búsqueda de las concentraciones mínimas efectivas de los fitofármacos.	La concentración mínima inhibitoria se refiere a la mínima concentración necesaria para que la sustancia inhiba el crecimiento de la bacteria (García, et al, 2000, p.4).2).	Realizar prueba de sensibilidad a antibióticos, midiendo los halos de inhibición que producen las formulaciones fitofarmacéuticas.	Placas de Petri, agar, regla, formulaciones fitofarmacéuticas

Fuente: Autor

### **Instrumentos y técnicas de recolección de datos**

En este apartado se describirá el proceso seguidos en el desarrollo del proyecto, haciendo una separación en fases.

## Fase I: Obtención de la materia vegetal

Para la investigación se consiguió el material vegetal de un lugar llamado La Casa de los Condimentos, en donde aseguran tener en la muestra brindada, sólo la droga vegetal (parte de la planta que se necesita “hojas”).

**Figura 11. Apariencia de la Materia Prima Empleada para la Extracción**



Fuente: Autor

## Fase II: Destilación por arrastre por vapor

En esta fase se empleó el material vegetal alrededor de 100g, además será utilizado el equipo proporcionado por la Universidad Internacional de las Américas, el cual comprende: sus instalaciones, balanza granataria y agua purificada, equipo de arrastre por vapor (balón de fondo plano, unión de Claisen, condensador, pastilla de agitación, beaker, hielo, sal y plantilla para calentar y agitar)

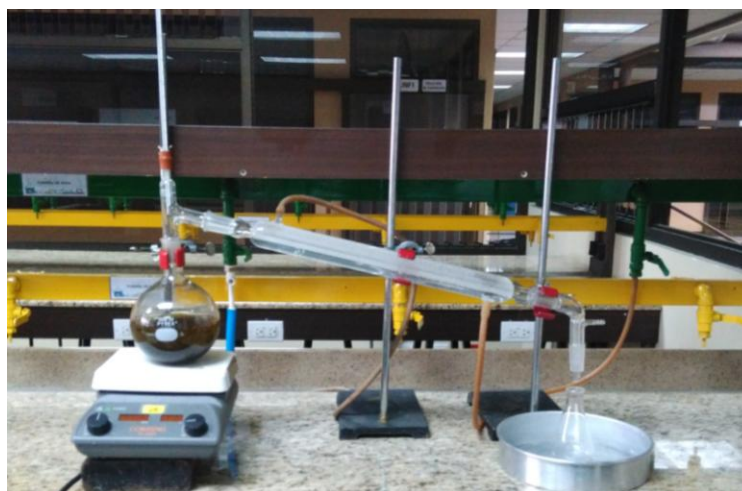
## Procedimiento

En un balón de fondo plano de 1L, se colocaron 100g de tomillo, los cuales fueron pesados previamente en una balanza granataria en un beaker de 500mL y trasvasados al balón. En una probeta de 1L, se midió 600mL de agua destilada, los cuales posteriormente fueron adicionados al balón de fondo plano, y se introdujo la pastilla de agitación. Se montó el equipo de hidrodestilación como se muestra en la figura 12; se colocó el calentador en 270°C y la agitación en 650 rpm.

Después de 3 horas de destilación, se recogió el destilado y procedió al trasvase de la muestra a un embudo separador de 500mL en donde se le adicionó 30 mL de cloroformo, para separar fases (la acuosa arriba y la oleosa abajo), se abrió la llave y dejó salir toda la fase acuosa, y la oleosa se pasó a un beaker de 100mL.

A la fase oleosa se le adicionó tres gramos del desecante para eliminar las trazas de agua que pudieron haber quedado, esto se trasvasó a otro beaker de 100mL separando el desecante de la muestra por decantación, la muestra ya sola se pasó a un tubo de ensayo el cual estaba adaptado a un equipo de filtración al vacío. Se colocó un beaker de 100mL con agua en un calentador a 50°C e introdujo el tubo de ensayo y evaporó el disolvente (cloroformo), quedando así solo la muestra del aceite, la cual se guardó en un vial y conservó.

**Figura 12. Equipo Empleado para la Hidrodestilación Convencional**



Fuente: Autor

### **Fase III: Destilación de arrastre con vapor acoplado a trampa Dean- Stark**

#### **Procedimiento**

En un balón de fondo plano de 1L, se colocaron 100g de tomillo, los cuales fueron pesados previamente en un beaker de 500mL en una balanza granataria y trasvasados al balón. En una probeta de 1L, se midieron 600mL de agua destilada, los cuales posteriormente se adicionaron al balón de fondo plano, y se introdujo la pastilla de agitación. Se montó el equipo de hidrodestilación con el aparato de Dean- Stark como se muestra en la figura 13; se colocó el calentador en 270°C y la agitación en 650 rpm.

Durante la destilación se sacó el agua recolectada en el aparato, para que se fuese acumulando el aceite, y después de 3 horas de destilación, se apagó el calentador, se sacó el aceite recolectado en el aparato en un vial de 5mL y procedió a guardarse. Este mismo procedimiento se realizó con el orégano.

**Figura 13. Equipo de Destilación Empleado para la Hidrodestilación con el Aparato de Dean-Stark**



Fuente: Autor

## **Fase IV: Caracterización e identificación de los componentes**

### **Procedimiento**

#### **Cromatografía de gases acoplado a masas**

En un cromatógrafo de gases acoplado a masas, se inyectaron las muestras para las cuales se obtuvieron los cromatogramas, además se efectuó la comparación de cromatogramas de las muestras obtenidas, mediante una extrapolación con patrones de los aceites, procedentes de los aceites comerciales.

#### **Espectroscopía infrarrojo**

Adicionalmente se realizó un análisis de espectroscopia infrarrojo, en donde se observó los distintos grupos funcionales de las muestras obtenidas a nivel experimental.

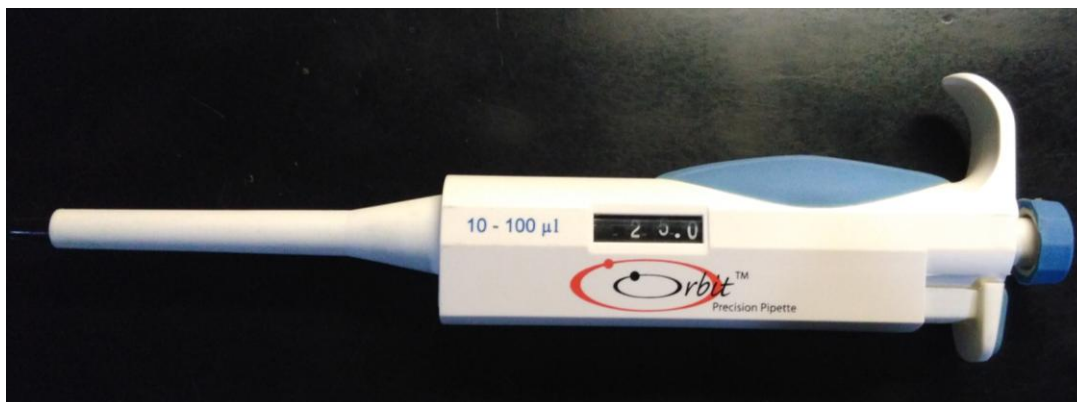
## **Fase V: Análisis microbiológico**

En un laboratorio microbiológico (Microlabs) se llevaron las muestras de los aceites esencial, para determinar si existe acción antimicrobiana frente al microorganismo en cuestión (*Staphylococcus aureus*), para la posterior formulación.

### **Procedimiento**

Se replicó la bacteria 24 horas antes de su utilización para que estuviera en fase exponencial de crecimiento. En una cámara de flujo laminar, se impregnaron las placas con el medio de cultivo y se dejó secar por 20 minutos. Con la punta de una micropipeta se hicieron pozos en la placa y rotularon. Posteriormente, se rayó la placa con una torunda previamente introducida en la solución de la bacteria en cuatro direcciones opuestas. Con una micropipeta de 5µL, se cargó el aceite e introdujo en los pozos previamente realizados, se sacó de la cámara de flujo laminar y se dejó en la incubadora por 24h a 33°C.

**Figura 14. Micropipeta para Diluciones de los Aceites Esenciales**



Fuente: Autor

### **Fase VI: Elaboración de las preparaciones fitofarmacéuticas**

Se realizaron distintas formulaciones (crema y pomada) para la aplicación en úlceras causadas por *Staphylococcus aureus*, en las lesiones de pie diabético y úlceras por presión, de grado 1 y 2.

#### **Elaboración de la crema**

En esta fase se utilizó el equipo proporcionado por la Universidad Internacional de las Américas, el cual comprende: sus instalaciones, balanza granataria, agua tridestilada, beakers, pastillas de agitación, espátulas de metal, probeta, lanolina, parafina líquida, parafina sólida, vaselina y termómetro

#### **Procedimiento**

En beakers de 100mL, se pesó 30g de parafina líquida, 12 g de parafina sólida, 23 g de vaselina, 10 g de lanolina y con una probeta se midió 25 mL de agua tridestilada. En una plantilla los beaker se pusieron en un baño de calentamiento, disolviendo así componentes desde el que tiene mayor punto de fusión a el que tiene menor en un mismo beaker de 250mL (parafina sólida, lanolina, vaselina, parafina líquida). Todos se mantuvieron una misma temperatura, y se agitaron durante 35 minutos. Se adicionó el agua (a la misma temperatura) poco a poco a la fase oleosa, y agitó durante 35 minutos (después de 10 minutos de agitar, se quitó del baño de calentamiento y

se colocó en una plantilla que solo agitó. Finalmente, se añadió en hilo el aceite esencial (3mL) de tomillo y agitó durante 30 minutos.

### **Elaboración de la pasta:**

#### **Procedimiento**

En un beaker de 100mL se pesó 40 g de óxido de zinc, 5g de aceite de oliva, y 50g de la base de la crema descrita en el apartado anterior. A los 50 g de la base de la crema se le agregó el óxido de zinc previamente pasado por un tamiz, se adicionó el aceite de oliva poco a poco y agitó manualmente, posteriormente se agregó en hilo el aceite esencial (3mL) y agitó durante 10 minutos.

### **Fase VII: Análisis microbiológico de las preparaciones fito-farmacéuticas**

Se realizaron pruebas microbiológicas a la crema de tomillo para conocer a qué concentración es inhibido el microorganismo, para establecer la concentración mínima efectiva de la formulación.

#### **Procedimiento**

Se replicó la bacteria 24 horas antes de su utilización para que estuviera en fase exponencial de crecimiento. En una cámara de flujo laminar, se chorreó la placa con el medio de cultivo y dejó secar por 20 minutos. Con la punta de una micropipeta se penetró la placa formando un pozo. Posteriormente se rayó la placa con una torunda humedecida en la solución de la bacteria en cuatro direcciones opuestas. Se introdujo una punta de espátula en el pozo previamente realizado, se sacó de la cámara de flujo laminar y se dejó en la incubadora por 24h a 33°C

## CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

La información que se presentará a continuación es el resultado del procedimiento experimental de cada una de las fases descritas, estos resultados están basados en la información obtenida mediante observación.

### Comparación de la Destilación Convencional por Arrastre con Vapor Frente a la Utilización de la Trampa Dean- Stark

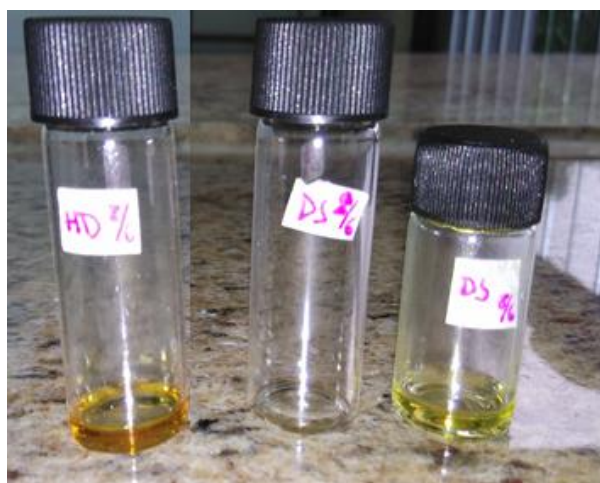
La primera etapa del proceso consistió en evaluar los métodos de extracción para la obtención del mejor rendimiento del aceite esencial, debido a esto se emplearon la hidrodestilación convencional y la destilación con un aparato de Dean- Stark, por triplicado obteniéndose los siguientes resultados mostrados en la tabla 3 y 4.

**Tabla 3. Promedio de la Masa del Aceite de Tomillo Obtenida de Acuerdo al Método de Extracción**

Método	Masa del aceite obtenido(g) (05/06/2017)	Masa del aceite obtenido(g) (06/06/2017)	Masa del aceite obtenido(g) (08/06/2017)	Masa del aceite obtenida promedio
Hidrodestilación convencional	0,3112	0,2622	0,3726	0,3153
Hidrodestilación con Dean- Stark	0,6730	0,5075	0,5981	0,5929

Fuente: Autor

**Figura 15. Apariencia de los Aceites de Tomillo Obtenidos de Acuerdo al Método de Extracción**



Fuente: Autor

**Tabla 4. Porcentajes de Rendimiento Promedio de Hidrodestilación Convencional e Hidrodestilación con Dean- Stark**

Método	Porcentaje de rendimiento 5/6/2017	Porcentaje de rendimiento 6/6/2017	Porcentaje de rendimiento 8/6/2017	Porcentaje de rendimiento Promedio
Hidrodestilación convencional	0,3113	0,2622	0,3726	0,3154
Hidrodestilación con Dean- Stark	0,6730	0,5075	0,5981	0,5929

Con lo reflejado en la tabla 4, se observa que el rendimiento porcentual promedio es superior para la destilación realizada con el aparato Dean- Stark, considerándose la mejor opción debido a que genera mejores resultados, en cuanto a material extraído y porcentaje de rendimiento del aceite esencial, la razón por la cual este método sobresale del convencional es que es un sistema cerrado, en donde el vapor de agua que arrastra al aceite esencial volátil, pasa por el condensador, el cual al estar en forma vertical condensa el agua y esta es arrastrada por las

paredes a favor de gravedad, quedando confinado en un tipo dispositivo bureta, en el cual es mucho más fácil de separar del agua, por el principio de diferencia de densidades, además que el número de etapas para la obtención del aceite es mucho menor.

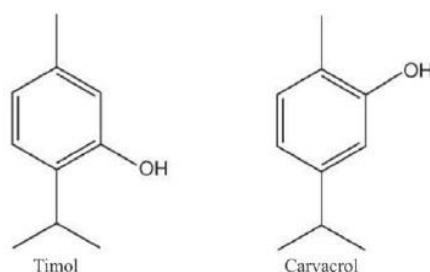
A diferencia del método convencional en donde hay que optar por otros métodos para separar la fase oleosa de la acuosa, quedando en este proceso de separación restos de la muestra en distintos instrumentos del laboratorio, conllevando a la pérdida de la muestra, lo cual se ve reflejado en los resultados. Además, que al utilizar un disolvente para separar en este caso el cloroformo, se hace un procedimiento extra, el cual implica la utilización de calor, conduciendo al sobrecalentamiento de la muestra y provocando el cambio de color, asimismo que no se puede saber con certeza si el disolvente ya fue eliminado por completo, ya que las trazas de cloroformo son tóxicas para el ser humano.

### **Análisis Cualitativo de las Muestras de los Aceites Esenciales de Tomillo y Orégano por Espectroscopía Infrarrojo**

Una vez que se contó con el aceite esencial extraído, la siguiente etapa consistió en determinar su composición para saber si se encontraban presentes las sustancias reportadas en la literatura que son sus componentes principales y a los cuales se les atribuye la actividad microbiológica determinada.

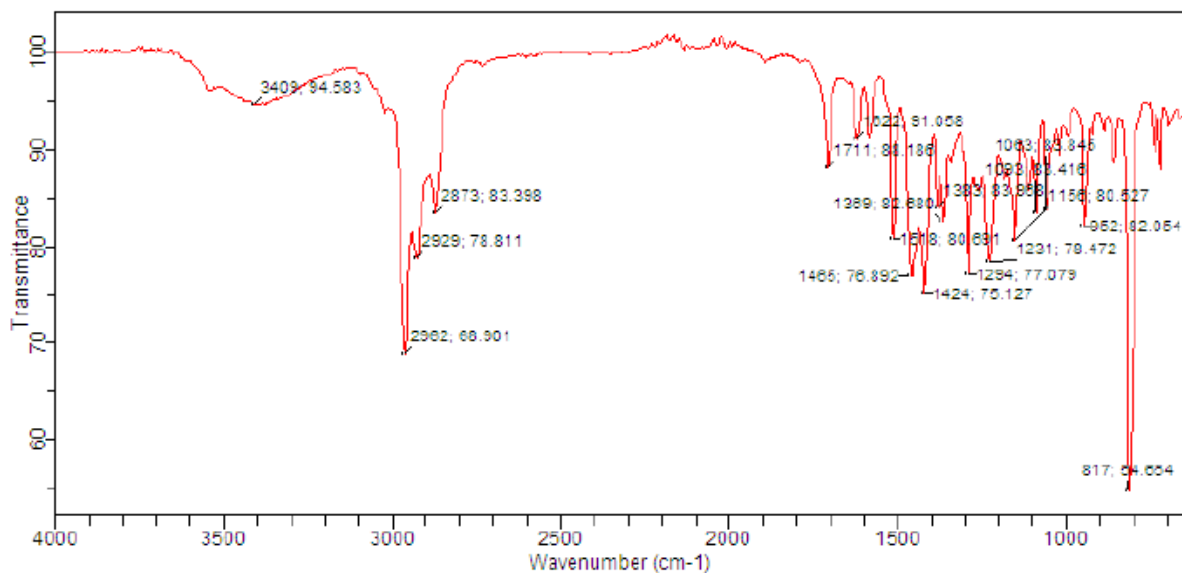
El primer análisis realizado fue el espectroscópico mediante infrarrojo para evidenciar la presencia de los grupos funcionales atribuidos a los componentes principales los cuales son el timol y carvacrol, cuyas estructuras se muestran en la figura 16.

**Figura 16. Estructura del Timol y Carvacrol**



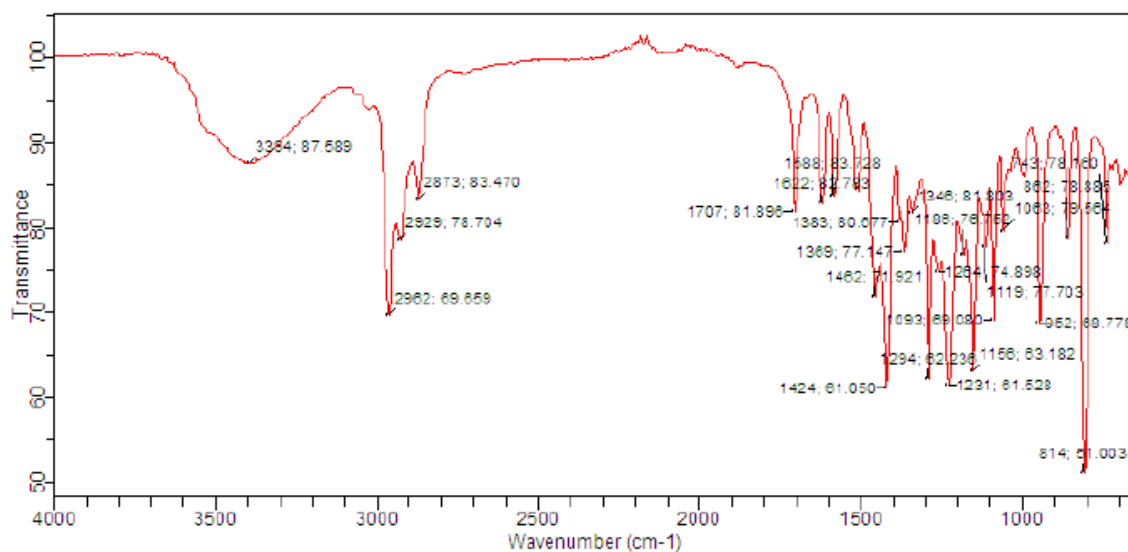
Fuente: Google imágenes

**Figura 17. Espectro Infrarrojo Obtenido del Aceite de Tomillo con el Método de Hidrodestilación con Dean- Stark**



Fuente: Autor

**Figura 18. Espectro Infrarrojo Obtenido de la Muestra del Aceite Esencial de Tomillo con el Método de Hidrodestilación Convencional**



Fuente: Autor

De las señales obtenidas por el equipo infrarrojo, expuestas en las figuras anteriores, mediante la utilización de una tabla comparativa, se enlistarán las señales obtenidas para cada grupo funcional que se logra divisar.

**Tabla 5. Señales Obtenidas en el Espectro Infrarrojo para la Muestra de Tomillo por Hidrodestilación Convencional (HD) e Hidrodestilación por Dean- Stark (DS)**

Señal detectada cm <sup>-1</sup> DS	Señal detectada cm <sup>-1</sup> HD	Grupo funcional	Intervalo de frecuencia teórico cm <sup>-1</sup>
3410	3385	O-H alcoholes, fenoles	3200-3650
2873	2874	C-H alcanos tensión	2850-2960
2929	2929	C-H alcanos tensión	2850-2960
1622	1622, 1588	C=C Anillos aromáticos	1600-2000 débil
1424	1424	C-H alcanos flexión	1350-1470
1462		C-H alcanos flexión	1350-1470
1231	1231	C-O fenol estiramiento	1000-1260
1294	1294	C-O fenol estiramiento	1000-1260
817	814	Anillos aromáticos	675-870

Fuente: Pavia (2013) y McMurry (2008)

De las figuras 17 y 18 correspondientes al espectro infrarrojo del aceite de tomillo, se logran observar algunas señales las cuales representan grupos funcionales presentes, tanto en el timol como en el carvacrol en donde se destacan las siguientes:

La primera señal intensa reflejada en el infrarrojo, corresponde a las señales detectadas a los 3384 cm<sup>-1</sup> y 3536 cm<sup>-1</sup>, en hidrodestilación con Dean-Stark e hidrodestilación convencional respectivamente, las cuales según la tabla de valores de referencia de Pavia (2013) y McMurry

(2008), pertenece al grupo hidroxilo (OH), el cual es característico del grupo fenol presente en ambas estructuras de los componentes que se encuentran en mayor proporción (Timol y Carvacrol).

Las regiones que se comprenden entre  $2850\text{ cm}^{-1}$  y  $2960\text{ cm}^{-1}$ , corresponden a la zona particular en donde se encuentran las señales de tensión de los enlaces tipo  $sp^3$  y  $sp^2$ , en las muestras analizadas de los métodos hidrodestilación con Dean-Stark y convencional, arrojan señales a los  $2873\text{ cm}^{-1}$  y  $2929\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, los cuales concuerdan con los rangos teóricos, al movimiento de tensión C-H alifática.

Para el mismo carbono  $sp^3$ , se detectaron las señales a los  $1424\text{ cm}^{-1}$  y  $1462\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a las vibraciones o movimientos de tipo intermolecular de tipo flexión particulares de la relación de un carbono e hidrógeno de los alcanos, relacionado estos valores con los teóricos junto con lo descrito anteriormente, ratifica el pensar de la existencia de estos grupos en las estructuras de los componentes del aceite esencial, en donde el timol y el carvacrol son los que se hallan en mayor cantidad.

Las señales entre  $1600\text{ cm}^{-1}$  y  $2000\text{ cm}^{-1}$ , son características de los grupos aromáticos, las cuales pertenecen a la relación de movimientos vibracionales ente dos carbonos (C=C). En el espectro las muestras se emiten señales de  $1622\text{ cm}^{-1}$  (DS) y  $1588\text{ cm}^{-1}$  (HD), las cuales coinciden con los valores teóricos, por lo tanto se confirma la presencia de grupos aromáticos, además se observa una señal muy fuerte a los  $817\text{ cm}^{-1}$  y  $814\text{ cm}^{-1}$  respectivamente, propios de la zona conocida como “huella digital” en la cual las señales reflejadas entre  $675\text{-}870\text{ cm}^{-1}$  se le atribuyen a movimientos de flexión de compuestos aromáticos.

Finalmente se detectaron señales a los  $1231\text{ cm}^{-1}$  y  $1294\text{ cm}^{-1}$  en ambas muestras, concordando con los valores teóricos propuestos por Pavia (2013) y McMurry (2008), en donde señales que tengan intensidad en el rango de  $1000\text{-}1260\text{ cm}^{-1}$ , se le atribuirán movimientos de tipo estiramiento en enlaces carbono-oxígeno (C-O) de un alcohol o fenol, corroborando la presencia de fenoles, los cuales están presentes en las estructuras del aceite esencial.

### Análisis Cuantitativo de los Componentes Presentes en los Aceites Esenciales de Tomillo y Orégano por Cromatografía de Gases Acoplado a Masas.

La siguiente fase consistió en la caracterización de los componentes del aceite esencial, tanto de tomillo como de orégano obtenidos por los métodos de hidrodestilación convencional e hidrodestilación con el aparato de Dean- Stark, con la utilización de un cromatógrafo de gases acoplado a masas, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6. Composición de las Muestras de Tomillo por Hidrodestilación Convencional (HD) y de Tomillo y Orégano por Dean- Stark (DS)**

Muestra	Número de pico	Tiempo de retención (min)	Porcentaje de Área	Compuesto	Probabilidad
Tomillo mediante DS	16	5,491	4,00	linalol	93,2% eucaliptol
	10	4,628	14,55	p-cimeno	83,4 % linalol
	30	7,520	17,24	timol / carvacrol	74,5% timol metil eter
Tomillo mediante HD	4	5,441	4,29	linalol	88,5% eucaliptol
	9	7,520	59,98	timol / carvacrol	88,5% p-cineol
	10	7,641	13,01	carvacrol	84,1 % linalol
Orégano mediante DS	20	7,510	9,78	timol / carvacrol	85% linalol
	21	7,631	38,49	carvacrol	
	12	5,461	7,02	linalol	
Tomillo patrón	22	7,520	24,36	timol / carvacrol	92,8% eucaliptol
	23	7,671	9,15	carvacrol	83,1% linalol
Orégano patrón	5	4,628	9,12	p-cimeno	89,6% eucaliptol
	11	7,631	69,54	carvacrol	82,8% linalol 75% timol metil eter

En la tabla 6, para la muestra del aceite esencial de tomillo se observan valores de porcentajes de área bastante satisfactorios, ya que alrededor de los 7 minutos, se logran observar los picos de las estructuras correspondientes al timol y carvacrol, los cuales presentan porcentajes de área del 17,24% y 59,98%, siendo los más representativos con respecto a toda la corrida cromatográfica, además se observa a los 4 minutos un pico representativo en la muestra del Dean- Stark correspondiente al p-cimeno, el cual es uno de los componentes mayoritarios del aceite esencial de tomillo, igualmente a los 5 minutos, refleja un pico el cual corresponde al linalol, y que comparado con los demás compuestos, es el que tiene mayor probabilidad (84,1%) de estar presente y ser compatible con la base de datos del masas, confirmando lo observado en el espectro infrarrojo, donde existía la presencia de los grupos funcionales de las estructuras mencionadas.

En los valores proyectados por el masas de las muestras de orégano hidrodestilado con el aparato Dean-Stak y el patrón comercial, según lo observado en la tabla 6, apoyado a lo establecido teóricamente, la estructura del carvacrol está presente en mayor proporción, ya que alrededor de los 7,6 minutos se observan porcentajes de área del 69,54 % y del 38,49%, siendo por mucho el componente más representativo de la muestra, sin embargo los picos siguientes de mayor porcentaje de área, son para timol con el 9,78%, p-cymeno con 9,12%, y el linalol con un 7.2% , siendo este último el que presenta mayor probabilidad de ser el compuesto detectado por el masas, ya que presenta una probabilidad del 85%, ratificando lo observado en el infrarrojo ya que estos son los componentes principales del aceite y presentan los grupos funcionales de las estructuras descritas.

### **Análisis Microbiológico de los Aceites Esenciales de Tomillo y Orégano Frente a *Staphylococcus aureus***

Una vez que se confirmó la presencia de los componentes principales del aceite esencial responsables del efecto antimicrobiano de acuerdo con lo reportado en la literatura, se procedió al análisis de su actividad microbiológica. Luego de 24 horas de incubación, se procedió a analizar las placas, con los halos de inhibición respectivos, en los medios de cultivo de Mueller- Hinton,

en donde en los pozos realizados se introdujo la muestra del aceite esencial, los resultados se muestran a continuación en las figuras 19, 20 y 21.

**Figura 19. Formación del Halo de Inhibición con el Control Positivo (Gentamicina)**



Fuente: Autor

**Figura 20. Formación del Halo de Inhibición en la Placa con el Aceite Esencial de Tomillo al 100%**



Fuente: Autor

**Figura 21. Formación del Halo de Inhibición en la Placa con el Aceite Esencial de Orégano al 100%**



Fuente: Autor

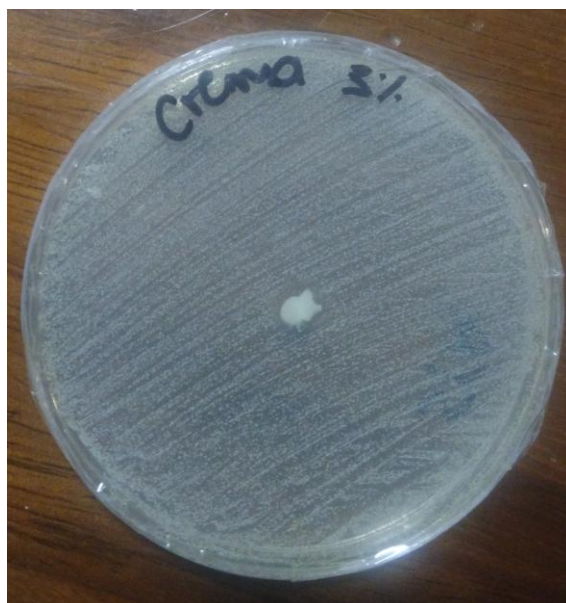
De acuerdo a lo observado en las figuras 20 y 21, se evidencia el poder antibiótico de los aceites esenciales frente al *Staphylococcus aureus*, presentando halos de inhibición de 38mm para el orégano, 52mm para el de tomillo y de 21mm para la gentamicina. Basándose en la tabla de Bernal y Guzmán (1984), en el cual se determina que para que la gentamicina tenga la capacidad bactericida deberá tener al menos un halo de 15mm.. En las muestras realizadas se logra apreciar que la gentamicina está dentro del rango correspondiente a sensible, por lo tanto los aceites esenciales al tener un halo de inhibición mayor que el antibiótico serán catalogados también como bactericidas ya que la bacteria en cuestión mostró ser sensible ante ellos.

### **Análisis Microbiológico de las Formulaciones Fitofarmacéuticas**

Posteriormente de que se determinó que efectivamente la bacteria era sensible a los aceites, se procedió a analizar la acción del fitofármaco sobre el *Staphylococcus aureus*. Teniendo como referencia a Fernández et al. (2015), los cuales indican que la concentración mínima inhibitoria es de 0,1% para el aceite esencial de tomillo, por lo tanto se procede a

formular una crema al 3% para tener un margen amplio de variación de la concentración mínima inhibitoria, y probar su efectividad frente al *Staphylococcus aureus*, el resultado se muestra en la figura 22

**Figura 22. Halo de Inhibición de la Crema de Tomillo al 3% Frente al *Staphylococcus aureus***



Fuente: Autor

Con la prueba microbiológica anterior, se logra apreciar que la crema al 3% no ejerce ninguna acción antimicrobiana frente al microorganismo ensayado pese a lo descrito por Fernández et al. (2015), aunque dentro de las posibles explicaciones destacan primeramente lo expuesto por Sharapin (2000), el cual enfatiza la existencia de variaciones con relación al contenido de componentes activos dentro de las especies de la misma planta, por factores como el tiempo recolección, condiciones climáticas, suelo, época del año, técnica de cultivo, entre otros, por lo tanto aunque hubiese referencia por parte de Fernández et al. (2015), no todos los aceites se comportan de la misma manera puesto que dependiendo de los factores descritos existen variaciones en los componentes del aceite.

Asimismo según Villareal (2004) para la obtención de una formulación óptima, deben existir un conjunto de variables físico-químicas, como lo son un mínimo de tensión interfacial, lo cual la crema formulada no cumple, ya que al ser casi en su totalidad grasa, la tensión interfacial es muy alta, y debe poseer un coeficiente de reparto del surfactante aproximado a uno ( $R=1$ ), esto quiere decir que la tendencia hidrofílica y lipofílica debe ser equilibrada, lo cual tampoco se cumple en la formulación, ya que la mayor parte de sus componentes son lipofílicos, además de que no se utilizó un tensioactivo como tal, por lo tanto al no cumplir estos dos requisitos, no se cede la molécula activa, quedando ésta dentro de la matriz de la formulación.

Complementando lo referido por Sharapin (2000), con respecto a la variación de la concentración y composición de los aceites, se plantea la posibilidad de que la concentración del principio activo al 3% en la formulación, no tiene en su mayoría la molécula activa, debido a esto se consideró determinar la concentración mínima efectiva de las diluciones de los aceites esenciales, para así conocer la concentración mínima del aceite, la cual pueda ser utilizada en la formulación que desde el principio se planteó.

### **Determinación de la Concentración Mínima Efectiva en Distintas Diluciones Frente al *Staphylococcus aureus***

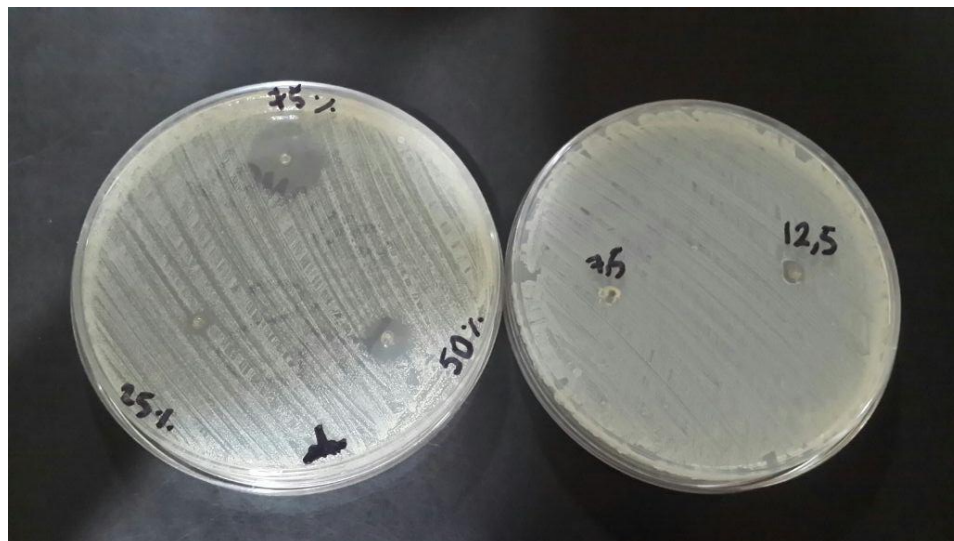
Tras encontrar resultados negativos para la inhibición de la bacteria en la fase anterior, se decidió realizar distintas diluciones del aceite esencial puro, tanto del tomillo como del orégano, para así determinar la concentración mínima efectiva, y posteriormente elaborar las formas farmacéuticas. Para ello se establecieron concentraciones del 75%, 50%, 25%, 12,5% y 7,5%, en donde se utilizó como disolvente el aceite de oliva, el cual se había ensayado previamente para demostrar que era inocuo frente a la bacteria. Los resultados obtenidos se presentan a continuación con las figuras 23, 24 y 25.

**Figura 23. Halos de Inhibición Presentados por las Distintas Diluciones del Aceite Esencial de Orégano**



Fuente: Autor

**Figura 24. Halos de Inhibición Presentados por las Distintas Diluciones del Aceite Esencial de Tomillo**



Fuente: Autor

**Figura 25. Inocuidad del Aceite de Oliva Frente al *Staphylococcus aureus***



Fuente: Autor

**Tabla 7. Halos de Inhibición de las Diluciones del Aceite Esencial de Orégano y Tomillo**

Concentración porcentual	Halo de inhibición tomillo mm	Halo de inhibición orégano mm
75%	20	22
50%	8	28-30
25%	4	12
12,5%	NI	4
7,5%	NI	NI

Según lo observado en las figuras 23,24, 25 y los halos de inhibición presentados en la tabla 7, se logra determinar que para que el aceite se comporte como bactericida, comparando con la tabla de Bernal y Guzmán (1984), se necesita que en el caso del tomillo, el aceite esté puro o al 75%, mientras que el orégano se puede utilizar puro, al 75% y al 50%, por lo tanto, se comprueba que a pesar de tener en cuenta lo expresado por Fernández et al. (2015), en donde refiere que la

concentración mínima inhibitoria es de 0,1% para el aceite esencial de tomillo, las condiciones de cultivo, época del año, los suelos, condiciones climáticas y otros factores no fueron los mismos conllevando a variaciones en el contenido de los componentes activos del aceite.

Por tanto, las formulaciones propuestas no serían adecuadas para este aceite en particular, puesto que a proporciones tan altas de aceite esencial para lograr la inhibición, las bases de las formulaciones descritas se disolverían, perdiendo así su composición y naturaleza de la forma farmacéutica. La posible solución se fundamenta en la formulación de una loción, ya que según lo señalado por Sharapin (2000), las lociones después de evaporar el agua contenida, presentan concentraciones superiores del fármaco que las conseguidas por las pomadas, aumentando así su poder bactericida, además que podrán mantener con mayor facilidad el equilibrio entre las fases oleosas-acuosas ya que las lociones son formas farmacéuticas líquidas, y utilizando polietilenglicoles o glicerina pueden mejorar la plasticidad de la película conduciendo a una mejor la adhesión a la piel.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

Al finalizar la investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

- ✓ El mejor método para la extracción de los aceites esenciales es la implementación de un aparato de Dean- Stark, ya que se logró un mejor rendimiento porcentual de extracción.
- ✓ Las muestras obtenidas por hidrodestilación convencional, a pesar de tener procedimientos extra y utilización de calor adicional para la obtención del aceite, no mostraron modificaciones en cuanto a los grupos funcionales que sobresalen en el infrarrojo.
- ✓ Para las muestras de aceite de tomillo obtenidas por hidrodestilación convencional y Dean-Stark y orégano por Dean- Stark, se logran divisar los componentes principales del aceite mediante cromatografía de gases, dándose cuenta que ambos métodos son factibles para extraer el aceite, ya que no pierden los componentes mayoritarios responsables de los efectos deseados.
- ✓ Tanto el aceite de tomillo como el de orégano tienen propiedades bactericidas frente al *Staphylococcus aureus*, presentando halos de inhibición mayores al del antibiótico comercial.
- ✓ Para obtener un efecto bactericida ante el *Staphylococcus aureus* en la utilización del aceite esencial de tomillo, este se debe utilizar en concentraciones mayores al 75%, ya que a esta concentración no logra llegar al valor del rango de inhibición.
- ✓ El aceite de orégano es eficaz contra el *Staphylococcus aureus* en concentraciones mayores al 50%, ya que en esta proporción logra un halo de inhibición bastante considerable, confirmando su poder bactericida.
- ✓ Las formulaciones propuestas al comienzo de la investigación, no son las adecuadas, ya que las proporciones en las cuales el aceite esencial debe estar presente en la formulación son muy altas, por lo tanto no se pueden considerar las formas farmacéuticas de tipo semisólidas.

## Recomendaciones

### Experimentador

- ✓ Tomar en cuenta desde el principio el porcentaje de rendimiento teórico de la planta por analizar, ya que teniendo en cuenta este valor se evalúa si existe el equipo adecuado en el laboratorio.
- ✓ Utilizar la trampa del Dean- Stark desde el comienzo de la extracción, ya que es mucho más efectivo y se ahorra mucho tiempo en el proceso experimental.
- ✓ Obtener la planta de un establecimiento en donde certifiquen el origen y pureza de la misma.
- ✓ Realizar las pruebas de concentración mínima efectiva de las diluciones del aceite antes de formular, ya que basarse en estudios previos no garantiza que su muestra se comporte de la misma manera.
- ✓ Realizar una formulación fitofarmacéutica que logre soportar tal cantidad de aceite esencial y que este pueda tener efecto antimicrobiano.

## Referencias

- Alonso, A. (2001). Tecnología Farmacéutica, Formas Farmacéuticas, volumen II. España. SINTESIS.
- Angurell, I., Casamitjana, N., Caubet, A., Dinares, N., Muñoz, D., Nicolás, E., Pérez, L., Pujol, M., Rosell, G., Seco, M., Velasco, D. (2014) Técnicas y operaciones avanzadas en el laboratorio químico (talq). Departamento de Química Inorgánica. Recuperado de: <http://www.ub.edu/talq/es/node/238>
- Arias, M., Calderón, L., Castillo, J., Moreno, J., Leal, L., Cortés, A., y Grebo, G. (2016). Factores de riesgo de la resistencia a meticilina de *Staphylococcus aureus* causante de bacteriemia: estudio multicéntrico de casos y controles emparejados. *Biomédica*. Recuperado de <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/3193/3386>
- Asensio, C. (2013). Utilización de aceites esenciales de variedades de orégano como conservante antimicrobiano, antioxidante y de las propiedades sensoriales de alimentos: quesos cottage, ricota y aceite de oliva. (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Ávalos, A., y Pérez, E. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Recuperado de <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798/814>
- Barrientos, C., Cano, T., Chávez, B., Godínez, J. (2001). Obtención y caracterización del aceite esencial de tomillo (*thymus vulgaris*) cultivado en Guatemala, utilizado en diversidad de productos fitofarmacéuticos. Facultad de Ingeniería, Guatemala. Recuperado de <http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puidi/inf-2001-075.pdf>
- Bellido, L y García A (diciembre, 2006). ¿Dispondremos de antimicrobianos adecuados frente a *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina? *Revista Española de Quimioterapia*. Recuperado de [http://www.seq.es/seq/0214-3429/19/4/munoz\\_bellido\\_editorial.pdf](http://www.seq.es/seq/0214-3429/19/4/munoz_bellido_editorial.pdf)
- Berga, A. (2009). Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Marge books. Recuperado de [https://books.google.es/books?id=qFRukXHQX6QC&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.es/books?id=qFRukXHQX6QC&source=gbs_navlinks_s)

- Bernal, M., y Guzmán, M. (1984). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, 4(3-4). Recuperado de: <https://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1891>
- Cañigueral, S. (2002). La Fitoterapia: ¿una terapéutica para el tercer milenio? *Revista de Fitoterapia*. Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/Salvador\\_Canigueral/publication/228863288\\_La\\_Fitoterapia\\_una\\_terapeutica\\_para\\_el\\_tercer\\_milenio/links/0fcfd50d6c017e6fea000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Salvador_Canigueral/publication/228863288_La_Fitoterapia_una_terapeutica_para_el_tercer_milenio/links/0fcfd50d6c017e6fea000000.pdf)
- Castillo, R., Fernández, J., Del Castillo, F (2014). Guía de práctica clínica en el pie diabético. *iMedPub Journals*. Recuperado de <http://www.archivosdemedicina.com/medicina-de-familia/gua-de-prctica-clnica-en-el-pie-diabtico.pdf>
- Castro, G., Liceaga, G., Arriola, A., Calleja, J. M., Espejel, A., Flores, J., y Nettel, F. J. (2009). Guía clínica basada en evidencia para el manejo del pie diabético. *Med Int Mex*, 25(6), 481-526.
- Centro Nacional de Información de Medicamentos.(2002) Instituto de Investigaciones Farmacológicas, Facultad de farmacia. Universidad de Costa Rica. Serie de Actualización Profesional 2002.
- Cepae, A. (1999). WHO monographs on selected medicinal plants. Geneva: World Health Organization. Recuperado de [http://kamillaviragzat.hu/wtDocument/browse/root/szakmai-anyagok/WHO\\_Monographs\\_vol1.pdf](http://kamillaviragzat.hu/wtDocument/browse/root/szakmai-anyagok/WHO_Monographs_vol1.pdf)
- Chang, Y. (2016). Evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano del orégano (*Origanum Vulgare*) en polvo y en oleorresina y de la mostaza china (*Brassica rapa* var. *Pekinensis*) en polvo, como alternativa natural en productos cárnicos. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Cué, M. (2007). Supermicrobios" resistentes crean la necesidad de nuevos antibióticos. *Revista Cubana de Farmacia*. Recopilado de <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v41n3/far14307.pdf>
- Días, L. y Montero W. (2015). Sustancias alternativas con acción antimicrobiana para la elaboración de desinfectantes de cavidades a partir de macadamia (*Macadamia*

Intergrifolia) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.). (Seminario de graduación). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

Dozal, M. (2010) Técnica de análisis de aceite esencial de orégano por cromatografía de gases. (Tesis grado). Instituto tecnológico de Durango, México

Echeverría, J. E Iglesias, D. (2003). Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. Revista Médica Herediana. Recuperado de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2003000400008&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2003000400008&script=sci_arttext)

Farmacopea de Estados Unidos (2013). The United States Pharmacopeial Convention. (USP 36-NF 31).

Fernández, A., García, A., Pérez, M., y Blázquez, M. (2016) *Staphylococcus aureus*. Recuperado de [https://books.google.co.cr/books?id=uPUzDQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=uPUzDQAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

Fernández, M., López, M. C., Pérez, Y., Brito, D., de Oca, R., Martínez, Y., y Pérez, O. (2015). Actividad antibacteriana de aceites esenciales sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Revista de Protección Vegetal, 29(3), 197.. Recuperado de <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/521>

Fonnegra, R. y Jiménez, S. (2007) Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia. Recuperado de [https://books.google.co.cr/books?id=K8eI-7ZeFpsC&pg=PA193&dq=taxonomia+del+origanum+vulgare&hl=es&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q=taxonomia%20del%20origanum%20vulgare&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=K8eI-7ZeFpsC&pg=PA193&dq=taxonomia+del+origanum+vulgare&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=taxonomia%20del%20origanum%20vulgare&f=false)

Gamboa M, Rodríguez, E. y Rojas M. (Julio- Setiembre, 2003). Bacterias de importancia clínica en respiradores y aires acondicionados de hospitales de San José, Costa Rica. Revista Biomed. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2003/bio033c.pdf>

García, J., Cantón, R., García, E., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. <http://coesant->

seimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos\_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf

Gary, C. (2009). Química Analítica. México: McGraw-Hill.

Gómez, L., Núñez, D., Perozo, A., Bermúdez, J., y Marín, M. (2016). Staphylococcus aureus con resistencia múltiple a los antibióticos (MDR) en un Hospital de Maracaibo Venezuela. Recuperado de <http://www.produccioncientificaluz.org/index.php/kasmera/article/view/21302/21136>.

González, L., Morffi, J., Nadal, L., Vallin, C., Contreras, R., y Roura, G. (2005). Frecuencia de aislamiento de Staphylococcus spp metilina resistentes y Enterococcus spp vancomicina resistentes en hospitales de Cuba. Revista Cubana de Farmacia. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152005000300003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000300003).

Hernández, R., Fernández, C., Baptista, P. (2014). Metodología de la investigación Mexico: McGraw-Hill.

Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathélet, P., Ankit, M., Khedid, K., y Bachiri, A. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (Thymus vulgaris) from Eastern Morocco. Int. J. Agric. Biol, 11(2), 205-208. Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/Amhamdi\\_Hassan/publication/266048756\\_Chemical\\_Composition\\_and\\_Antimicrobial\\_Activity\\_of\\_Essential\\_Oil\\_of\\_Thyme\\_Thymus\\_vulgaris\\_from\\_Eastern\\_Morocco/links/562e770208ae518e34837d2d.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Amhamdi_Hassan/publication/266048756_Chemical_Composition_and_Antimicrobial_Activity_of_Essential_Oil_of_Thyme_Thymus_vulgaris_from_Eastern_Morocco/links/562e770208ae518e34837d2d.pdf)

León, G., Fortich, O., del Rosario, M., y Martínez, S. (2015). Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de Citrus sinensis L. Revista Cubana de Farmacia. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152015000400014](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152015000400014)

Lizano, I. (2013). Efecto de la aplicación de los aceites esenciales extraídos a partir de las hojas de la pimienta de jamaica (Pimenta dioica), hojas de canela (Cinamomum zeylanicum) y orégano (Origanum vulgare) en la preservación de la carne de res. (Tesis de grado). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

- Martínez, A. (1996). Aceites esenciales. *J. Nat. Prod.* Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/Alejandro\\_Martinez\\_Martinez/publication/283308669\\_Aceites\\_esenciales/links/56323a7308ae242468d99608.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Alejandro_Martinez_Martinez/publication/283308669_Aceites_esenciales/links/56323a7308ae242468d99608.pdf)
- McMurry, J. (2008). *Química orgánica*. 7ª. Edición. Mexico: Cengage Learning.
- Miladinović, L., Ilić, S., Mihajlov, M., Nikolić, D., Miladinović, C., y Cvetković, G. (2012). Investigation of the chemical composition–antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. *Analytical and bioanalytical chemistry*. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/221886922\\_Investigation\\_of\\_the\\_chemical\\_compositionantibacterial\\_activity\\_relationship\\_of\\_essential\\_oils\\_by\\_chemometric\\_methods](https://www.researchgate.net/publication/221886922_Investigation_of_the_chemical_compositionantibacterial_activity_relationship_of_essential_oils_by_chemometric_methods)
- Ministerio de Salud del Perú. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicobiana por el método de disco de difusión. Recuperado de [http://190.102.152.73/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua\\_1%20sensibilidad.pdf](http://190.102.152.73/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua_1%20sensibilidad.pdf)
- Nodarse, R. (2009). Detección de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina mediante disco de cefoxitina. *Revista Cubana de Medicina Militar*. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v38n3-4/mil043-409.pdf>
- Notario, R., Lejona, S., Méndez, E., All, L., Lascialandare, S., y Borda, N. (2007). Aislamiento de *Staphylococcus aureus* metilino resistentes adquiridos en la comunidad (SAMR-AC), en Rosario y Santa Fe. *Rev Méd Rosario*, 73. Recuperado de [http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/40302923/aislamiento\\_de\\_samr-ac\\_en\\_rosario\\_y\\_santa\\_fe\\_1.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1490500553&Signature=1U18EQPKsB56GBmUloDPetsRtb%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DAISLAMIENTO\\_DE\\_STAPHYLOCOCCUS\\_AUREUS\\_MET.pdf](http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/40302923/aislamiento_de_samr-ac_en_rosario_y_santa_fe_1.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1490500553&Signature=1U18EQPKsB56GBmUloDPetsRtb%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DAISLAMIENTO_DE_STAPHYLOCOCCUS_AUREUS_MET.pdf)
- Núñez, I. (2014). Prevalencia y caracterización fenotípica y molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina en superficies de contacto humano y animal en el Hospital de Especies Menores y Silvestres de la Escuela de Medicina Veterinaria UNA. (Tesis de grado). Universidad Nacional, Costa Rica.

Pavia, D. (2013). Introduction to spectroscopy. United States: Cengage Learning

Pickering, W. (1980). Química analítica moderna. Australia: Reverte.

Prasanth, Ravi, Varsha y Satyam, (2014). Review on Thymus vulgaris traditional uses and pharmacological properties. Medicinal & Aromatic Plants, 3, 164-166. Recuperado de <https://www.omicsgroup.org/journals/review-on-thymus-vulgaris-traditional-uses-and-pharmacological-properties-2167-0412.1000164.php?aid=31617>

Sánchez, Y. (29, 10, 2007). Vías de Administración de Fármacos. Recuperado de <http://www.portalesmedicos.com/publicaciones/articulos/775/1/Vias-de-Administracion-de-Farmacos.html>

Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos (Vol. 78). Convenio Andrés Bello.

Shawar, R., Scangarella-Oman, N., Dalessandro, M., Breton, J., Twynholm, M., Li, G., y Garges, H. (2009). Topical retapamulin in the management of infected traumatic skin lesions. Therapeutics and Clinical Risk Management. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2697516/pdf/tcrm-5-0041.pdf>

Tamariz, J., Agapito, J., Horna, G., Tapia, E., Vicente, W., Silva, M., y Guerra, H. (2010). Staphylococcus aureus resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. Revista Médica Herediana. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v21n1/v21n1ao1.pdf>

Thornton, R., y Neilson, R. (1998). Química Orgánica. Recuperado de [https://books.google.co.cr/books?id=3b2Yk\\_dzH70C&printsec=frontcover&dq=polaridad+de+compuestos+organicos+pdf&hl=es&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=3b2Yk_dzH70C&printsec=frontcover&dq=polaridad+de+compuestos+organicos+pdf&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)

Universidad Nacional Autónoma de México. (2007). Técnicas Cromatográficas, Química Analítica Instrumental II. Facultad de Química. Recuperado de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos\\_6700.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf)

Valverde, G. (2012). Enjuagues bucodentales a partir de Sustancias Naturales Costarricenses con propiedades antibacterianas aplicadas al control del Biofilme en el año 2012. (Seminario de Graduación). Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

Vanaclocha, B., Cañigual, S. (2003) Fitoterapia: vademécum de prescripción. Recuperado de [https://books.google.co.cr/books?id=K3V4p5Pj\\_dAC&printsec=frontcover&dq=vademecum+de+prescripcion+de+plantas+medicinales&hl=es&sa=X&redir\\_esc=y#v=onepage&q=vademecum%20de%20prescripcion%20de%20plantas%20medicinales&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=K3V4p5Pj_dAC&printsec=frontcover&dq=vademecum+de+prescripcion+de+plantas+medicinales&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=vademecum%20de%20prescripcion%20de%20plantas%20medicinales&f=false)

Villareal, A. (2004). Formulación de una nanoemulsión dermocosmética, nutritiva, y regeneradora de la piel (Doctoral dissertation, Tesis de maestría). Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela).

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS  
AMÉRICAS**

**ESCUELA DE FARMACIA**

**DESARROLLO DE DIVERSAS FORMULACIONES  
FITO-FARMACÉUTICAS TÓPICAS PARA  
DIABÉTICOS, A PARTIR DE LAS PARTES AÉREAS DE  
DOS DROGAS VEGETALES. A SABER *THYMUS  
VULGARIS L Y ORIGANUM VULGARE L.***

**MÓNICA JIMÉNEZ SÁNCHEZ**

**SAN JOSÉ, AGOSTO, 2017**