

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

**FACULTA DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE FARMACIA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL PRODUCTO
ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*THYMUS
VULGARIS*) EN EL *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Tesis para optar al grado de Licenciatura

FLORY MARÍA MADRIGAL BARRETT

**TUTOR:
DR. CARLOS MORA RODRÍGUEZ**

**LECTOR:
LIC. LEXI CHÁVEZ SILES**

SAN JOSÉ, COSTA RICA, 2017

Contenido

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	8
Planteamiento del Problema	8
Hipótesis	9
Objetivos	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos.	9
Justificación	9
Antecedentes	11
Proyecciones	15
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	17
Plantas medicinales	17
Fitoterapia	17
Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).....	18
Clasificación sistemática.....	19
Composición química.	19
Aceite esencial.	22
Acciones farmacológicas.	24
Toxicidad.....	25
Método de extracción.....	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	26
Características del <i>Staphylococcus aureus</i>	26
Infecciones producidas por <i>S. aureus</i>	28
Forma farmacéutica	30
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO.....	31

Enfoque de la Investigación.....	31
Diseño de la Investigación.....	31
Objetos de Estudio	31
Variables de Análisis	31
Instrumentos y técnicas de recolección.....	33
Proceso para la recolección de la muestra	33
Obtención del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> por el método de arrastre con vapor.	33
Materiales y equipo para la obtención del aceite de <i>Thymus vulgaris</i> por el método de arrastre con vapor.	34
Método para destilación y extracción del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> por el método de arrastre con vapor.	35
Purificación del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	36
Identificación de los compuestos y tamizaje fitoquímico.....	38
Análisis cualitativo por espectroscopia IR del aceite esencial de tomillo.	38
Análisis de los componentes del aceite esencial del <i>Thymus vulgaris</i> mediante cromatografía de gases acoplado a un detector de masas.	38
Tamizaje fitoquímico	38
Materiales y equipo para el tamizaje fitoquímico.	38
Reacciones de caracterización para el tamizaje fitoquímico.	39
Pruebas microbiológicas para la evaluación de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de tomillo	41
Materiales y equipos para el desarrollo de la prueba microbiológica.....	41
Método para el cultivo e identificación de la actividad antibacteriana.....	43
Métodos para el desarrollo de la prueba de la catalasa.	44
Elaboración de la forma farmacéutica	44

Materiales y equipo utilizados en la elaboración del gel antibacteriano.	44
Método utilizado para la elaboración del gel antibacteriano.	45
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS	47
Variable 1. Extracción del aceite esencial presente en el tomillo	47
Variable 2. Identificación de los compuestos y tamizaje fitoquímico presentes en el aceite esencial de <i>Thymus Vulgaris</i>	50
Análisis cualitativo por espectroscopia IR del aceite esencial de tomillo.	50
Análisis de los componentes del aceite esencial del <i>Thymus Vulgaris</i> mediante cromatografía de gases acoplado a un detector de masas.	55
Análisis de Barrido Compuestos Orgánicos GC-MS en la Muestra del Aceite Esencial de Tomillo.....	57
Reacciones de caracterización para el tamizaje fitoquímico.....	58
Variable 3. Evaluación de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de tomillo frente a <i>Thymus Vulgaris</i>	61
Prueba de la catalasa.	63
Evaluación de la actividad antibacteriana del gel antibacteriano elaborado.....	64
Variable 4. Formulación de gel antibacterial a partir del aceite esencial de tomillo	65
Envase primario del gel antibacteriano.	67
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	699
Conclusiones	69
Recomendaciones	71
Referencias.....	72
Anexo.....	777

Tablas

Tabla 1: Clasificación Sistemática de <i>Thymus vulgaris</i> L.....	19
Tabla 2: Determinante de Patogenicidad de <i>S. aureus</i>	27
Tabla 3: Secuencia de Eventos Patogénicos en Infecciones Serias Causadas por <i>S. Aureus</i>	29
Tabla 4: Definición de las Variables de la Investigación.....	32
Tabla 5: Características Organolépticas del Aceite esencial de Tomillo Obtenido por el Método de Arrastre de Vapor	49
Tabla 6: Señales Obtenidas por Medio del Espectro Infrarrojo, según Grupo Funcional, Rango E Intensidad Teórico	52
Tabla 7: Resultados de las Pruebas de las Reacciones de Caracterización para el Tamizaje Fitoquímico	58
Tabla 8: Resultados de la Formación de los Halos de Inhibición Formadas con las Diferentes Muestras Evaluadas.....	62
Tabla 9: Actividad Antibacteriana del Cetraxal Otico® contra el Gel Antibacteriano.	64
Tabla 10: Elaboración del Gel Antibacteriano de Tomillo	65
Tabla 11: Características Organolépticas del Gel Antibacteriano	66

Figuras

Figura 1: Planta Conocida como Tomillo	18
Figura 2: Análisis GC-MS de Aceite Esencial de <i>Thymus vulgaris</i>.....	21
Figura 3: Componente del Aceite Esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	22
Figura 4: Estructura del Timol.....	23
Figura 5: Espectro IR del Timol	23
Figura 6: Estructura del Carvacrol.....	24
Figura 7: Equipo para Arrastre de Vapor	35
Figura 8: Reactivos y Equipo Utilizado en el Proceso de Secado y Obtención de la Fase Oleosa del Aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	36
Figura 9: Métodos para la Purificación del Aceite Esencial <i>Thymus vulgaris</i>, Mediante el Uso del Rotavapor	37
Figura 10: Métodos para la Purificación del Aceite Esencial <i>Thymus vulgaris</i>, Mediante el Uso del Baño María	37
Figura 11: Reactivos Utilizados para la Caracterización Fitoquímica	39
Figura 12: Cultivo de la Cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Figura 13: Materiales y Reactivos para el Desarrollo de la Prueba Microbiológica.....	42
Figura 14: Equipo Utilizado para el Desarrollo de las Pruebas Microbiológicas.....	43
Figura 15: Materiales y Reactivos para la Prueba de la Catalasa	43
Figura 16: Reactivos para la Elaboración del Gel Antibacteriano.....	46
Figura 17: Destilado Acuoso del Aceite Esencial de <i>Thymus Vulgaris</i> Obtenido por Arrastre de Vapor	47
Figura 18: Extracción Líquido-Líquido en Embudo Separador del Aceite Esencial con Diclorometano	48
Figura 19: Aceite Esencial de Tomillo y su Respectivo Almacenamiento	49
Figura 20: Espectro Infrarrojo Obtenido de una Muestra Control UIA	51
Figura 21: Espectro Infrarrojo Obtenido de una Muestra del Aceite esencial de Tomillo...51	
Figura 22: Superposición de IR Obtenidos	53

Figura 23: Análisis Cromatográfico de Gases (GC) Acoplado a un Detector de Masas (MS).....	56
Figura 24: Análisis de barrido compuestos orgánicos GC-MS en la muestra del aceite esencial de tomillo.....	57
Figura 25: Identificación de alcaloides: Ensayo de Dragendorff	¡Error! Marcador no definido.
Figura 26: Identificación de Fenoles: Prueba de Tricloruro de Hierro.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 27: Identificación de Alcaloides: Prueba de Mayer.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 28: Identificación de Terpenos: Prueba de Libermann-Burchard.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 29: Identificación de Saponinas: Prueba de Espuma.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 30: Identificación de Flavonoides: Prueba de Shinoda.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 31: Formación de los Halos de Inhibición Obtenidos en el Medio de Cultivo Mueller-Hinton Impregnados con las Diferentes Muestras	¡Error! Marcador no definido.
Figura 32: Resultado de la Prueba de Catalasa	63
Figura 33: Cetraxal Otico® Contra el Gel Antibacteriano Elaborado.....	64
Figura 34: Proceso de la Formulación del Gel Antibacteriano.....	66
Figura 35: Recipiente Cosmético, Vidrio Ámbar 20 ml	67

Resumen

Los aceites esenciales vegetales forman una parte importante en la etnofarmacología, ya que presentan propiedades significativas para el tratamiento de patologías y el desarrollo de nuevas formulaciones de origen natural.

El trabajo de investigación que se presenta en este documento tiene como objetivo principal evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) en el *Staphylococcus aureus*, esto como un fundamento científico sobre su actividad y una nueva alternativa para el tratamiento de enfermedades dermatológicas afectadas por esta bacteria.

La investigación fue desarrollada en la Universidad Internacional de las Américas, Laboratorio Microlabs, y Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas (Larep), permitiendo desarrollar cada objetivo mediante procedimientos experimentales y observacionales.

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* se obtuvo mediante el método de arrastre de vapor, obteniendo un volumen aproximado de 4 ml, posterior a un proceso de purificación utilizando como solvente el diclorometano y para eliminar trazas de agua sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), la identificación de los metabolitos activos presentes se realizó por medio de pruebas de las reacciones de caracterización para el tamizaje fitoquímico, permitiendo corroborar la presencia de fenoles, flavonoides, alcaloides, y terpenos. Otras de las técnicas utilizadas para la identificación de los componentes del aceite esencial fue el análisis por espectroscopia infrarroja IR, el cual fue comparado con una sustancia control UIA, y un análisis por espectroscopia de masas. Se efectuaron pruebas microbiológicas, para evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial, por medio de la formación de halos de inhibición en las placas bacterianas, cuyos resultados fueron positivo en la inhibición de la bacteria. A su vez, la actividad bacteriana fue comparada con la sustancia control UIA y un antibiótico comercial, desarrollando un halo de mayor tamaño el aceite esencial obtenido del tomillo.

Dicho aceite esencial fue diluido en aceite mineral para determinar si se obtenía algún tipo de inhibición, observándose actividad antibacteriana en las dos primeras diluciones realizadas.

Para concluir, con el aceite esencial obtenido de tomillo, se elaboró un gel antibacteriano, que presentaba características organolépticas deseadas y agradables al ser aplicado en la piel, esta

forma farmacéutica fue evaluada para determinar su actividad antibacteriana, sin embargo, esta no fue tan positiva como se esperaba.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del Problema

Con el pasar del tiempo, la utilización de plantas medicinales y el desarrollo de fitofármacos ha crecido, de manera tal que en el mercado se pueden encontrar diferentes presentaciones de productos elaborados a partir de una misma planta medicinal, esto debido a las propiedades farmacológicas que estas ofrecen. La población en general las utiliza en algunos casos como medicina alternativa, sin embargo, debido a la multiculturalidad, los diferentes usos que ofrecen y los métodos para su utilización, resulta importante su investigación y estudios que comprueben la efectividad, para de esta manera poder establecer con un respaldo científico sus usos

Según Balunas y Kinghorn citado por Rivas, Oranday, y Verde(2016) “Con el tiempo la información sobre la utilización de plantas medicinales se fue registrando en herbarios lo que permitió tener un mejor registro de las plantas con propiedades de interés para el hombre” (2016, p.271), ofreciendo un mayor conocimiento para su utilización.

Las plantas medicinales se utilizan ampliamente en algunas formas de medicina complementaria, a saber, medicina antroposófica, quiropráctica, homeopatía, naturopatía y osteopatía (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2013), y de igual manera, existen ciertos procesos, pruebas experimentales y científicas que avalan los beneficios de diversas plantas medicinales en diversas afecciones, permitiendo el desarrollo de la fitoterapia.

Dado que en Costa Rica existe una gran diversidad de plantas, es de suma importancia que se desarrollen investigaciones en las áreas terapéuticas naturales, con el fin de tener una base sólida que fundamente su uso y tener alternativas adicionales para tratar ciertas patologías que comúnmente se tratan con antibióticos vías oral o tópica y resultan muy lesivos para el estrato corneo, por lo cual se plantea el siguiente problema de la investigación a realizar:

¿Cuál es la actividad antibacteriana de aceite esencial de *Thymus vulgaris* en el *Staphylococcus aureus*?

Lo cual puede resultar de gran ayuda para el desarrollo de nuevas alternativas en las terapias para tratar esta patología en particular.

Hipótesis

El aceite esencial de *Thymus vulgaris*, presenta propiedades antibacterianas sobre el *Staphylococcus aureus*.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del producto aceite esencial de *Thymus vulgaris* en el *Staphylococcus aureus*.

Objetivos específicos.

- Realizar la extracción del aceite esencial de tomillo mediante el método de arrastre de vapor.
- Identificar la presencia de metabolitos activos en el aceite esencial de tomillo.
- Evaluar la capacidad antibacteriana del aceite esencial de tomillo frente a *Staphylococcus aureus*, mediante el cultivo de placas.
- Elaborar un gel antibacterial para su aplicación tópica a partir de aceite esencial de *Thymus vulgaris* obtenido.

Justificación

A nivel mundial, la medicina tradicional es el pilar principal de la prestación de servicios de salud o su complemento. “En algunos países, la medicina tradicional o medicina no convencional suele denominarse medicina complementaria” (OMS, 2013), debido al aumento en el desarrollo de productos farmacéuticos a base de plantas naturales, es importante el desarrollo e

investigación de los componentes de las mismas para determinar su potencial farmacológico o para mediar en la prevención de su consumo, para así evitar los riesgos asociados a la posible toxicidad en ciertas concentraciones y formas de uso.

En algunos casos, los pacientes no responden de la manera deseada a los tratamientos establecidos, por lo que se recurre a la búsqueda de nuevas opciones, las cuales en algunas ocasiones, por el tipo de metodología pueden resultar un poco más costosas de adquirir o, caso contrario, es más accesible a la población, la cual la elabora de manera más sencilla gracias a los conocimientos etnofarmacológicos. Es por ello, que se hace necesaria la búsqueda de antibacterianos de origen natural, que aporten una opción nueva para el control y prevención de las enfermedades y que estos se fundamenten científicamente.

Se sabe que los microorganismos tales como hongos, virus y bacterias son los mayores responsables de causar desequilibrios y enfermedades en el ser humano; tal es el caso del *Staphylococcus aureus*, bacteria la cual es muy frecuente que se presente a nivel dérmico causando, por ejemplo, infecciones en las heridas.

El *Thymus vulgaris* pertenece a la familia *Lamiaceae*, es una planta arbustiva achaparrada de unos 30 cm de altura y muy olorosa. Se encuentra en zonas expuesta a la acción de fuertes y constantes vientos. (Segura, y Torres, 2009, p. 348) Según un estudio realizado por Estrada (2010) de manera *in vitro*, determinó que uno de los componentes principales del aceite esencial de *Thymus vulgaris* como lo es el timol, presenta una inhibición importante de las bacterias y una actividad bacteriana significativa sobre el *Staphylococcus aureus*.

A partir de lo anteriormente mencionado y conociendo las propiedades antibacterianas que posee el *Thymus vulgaris*, se da el desarrollo de esta investigación.

Entre los aspectos prácticos que podría ayudar a resolver la presente investigación y como parte de un aporte a la sociedad, se pueden mencionar los siguientes: la utilización de los aceite esencial s del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, constituye una opción farmacológica distinta, natural y novedosa para la prevención de enfermedades infecciosas. Al ser esta una opción

fitoterapéutica contribuye con la salud de las personas de forma efectiva y segura, reduciendo en gran medida la aparición de efectos adversos indeseados.

Esta investigación tiene como objetivo la extracción del aceite esencial de tomillo para determinar la actividad antibacteriana contra el *Staphylococcus aureus*.

Por lo tanto, según lo antes expuesto; eventualmente, mediante los procesos correctos se podrían desarrollar antibióticos tópicos que contengan el aceite esencial de *Thymus vulgaris* y que este uso se fundamente de manera científica. El desarrollo de este tipo de investigación proporciona un apoyo adicional para futuros proyectos en el desarrollo de las diferentes formulaciones farmacéuticas.

Antecedentes

Para la recolección de antecedentes nacionales e internacionales relacionados con esta investigación, se utilizaron bases científicas como Scielo, Pubmed, BINASSS, bases de universidades internacionales como la de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, y la Universidad Central de Ecuador, con predominio en el tema de estudio. A nivel nacional, se realizó una búsqueda en OPAC de la Universidad de Costa Rica (UCR), la Universidad de Iberoamérica (UNIBE), la Universidad Internacional de las Américas (UIA) y la Universidad Latina de Costa Rica (ULATINA) y la Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED).

Después de la respectiva búsqueda, se logró encontrar a nivel nacional cuatro antecedentes y cinco a nivel internacional.

A nivel internacional, se encuentran varios artículos, uno de ellos relacionado con la actividad de aceites esenciales de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externas, de los autores Souza, Frascolla, Santin, Dos Santos, Costa, Alves, Damé, y Araújo (2008), ellos con los aceites esenciales y tinturas realizadas lograron inhibir el crecimiento de los hongos y de las bacterias, logrando inhibir el crecimiento de los microorganismos evaluados hasta del 1.25 % en el caso de la actividad del aceite esencial de tomillo, actuando en el *S. aureus*, al no

encontrar trabajos relacionados, no pudieron realizar un análisis comparativo, sin embargo, para la elaboración de este trabajo va a servir de referencia, con el fin de comparar los patrones obtenidos y los métodos realizados para obtener el aceite esencial.

En Ecuador, Estrada S (2010) llevó a cabo una *Determinación de la actividad Antibacteriana IN VITRO de los aceite esenciales de romero (Rosmarinus Officinalis) y tomillo (Thymus vulgaris)*, en diferentes microorganismos utilizando tres tipos de concentraciones para cada una de las determinaciones, llevó a cabo varios procesos para la caracterización de la droga cruda utilizada, sin embargo, para la elaboración de esta tesis se tomará como referencia los resultados de las características organolépticas y las reacciones de caracterización para comprobar la presencia y actividad bacteriana del aceite esencial, y la determinación de la densidad relativa de la muestra.

Zambrano M (2014, p:9) determinó: “la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de tomillo (*thymus vulgaris*) en comparación con la nistatina y el gluconato de clorhexidina al 0,2 % sobre cepas de *Candida albicans*”. Para esto llevó a cabo una evaluación a diferentes concentraciones del aceite esencial de tomillo, y mediante la respuesta de sensibilidad bacteriana del halo de inhibición en un respectivo tiempo determinó su efectividad sobre la cepa analizada. Este resultado fue comparado con productos comerciales para determinar su similitud en eficacia. Para efectos de esta tesis, permite ampliar la idea de llevar a cabo las impregnaciones del aceite esencial en la placa con el microorganismo a diferentes concentraciones.

Rojas, Ortiz, Jáuregui, Ruiz, y Almonacid (2015), realizaron un estudio *in vitro* experimental mediante cultivos con la respectiva cepa y un estudio *in vivo* de toxicidad en la dermis de conejos del *Aceite esencial de Thymus vulgaris L (tomillo)*, su combinación con EDTA contra *Candida albicans* y formulación de una crema, obteniendo como resultado una actividad inhibitoria sobre *Candida albicans* y al adicionarle EDTA, dicha actividad inhibitoria se incrementaba, además, el timol, citral, carvacrol, EDTA, y el aceite esencial formulados en crema no presentaron toxicidad en la dermis, pero sí un efecto sinérgico. Para efectos de esta tesis, se toma como referencia la utilización del aceite esencial combinado con EDTA, para potenciar el

efecto que se espera obtener y valorar un posible comportamiento en una cepa de *Staphylococcus aureus*, y el método para deshidratar el aceite esencial.

Reyes, López y Palou (2016) en *Antimicrobial Activity of Individual and Combined Essential Oils against Foodborne Pathogenic Bacteria* realizaron una evaluación antimicrobiana de aceites esenciales de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer), mostaza (*Brassica nigra*), y tomillo (*Thymus vulgaris*), los cuales fueron evaluados de manera individual o combinando dos de los aceite esencial s realizados contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, y *Salmonella enteritidis*. Los aceite esencial s fueron analizados por cromatografía de gases- masa, espectrometría, identificando el componente principal de cada uno de los aceite esencial s ya mencionados. En general, dentro de los resultados obtenidos se encuentra la efectividad de los aceite esencial s de manera individual y su efecto sinérgico al ser combinados. Para efectos de esta tesis, se toma como referencia las características individuales y mezcladas para potenciar el efecto que se espera obtener y valorar un posible comportamiento en una cepa de *Staphylococcus aureus*.

A nivel nacional, Acosta, y Céspedes (2004) realizaron una tesis en la cual demostraron la “Actividad antibacteriana de los aceites esenciales derivados del tomillo y el orégano”, para cumplir con ese objetivo aislaron los respectivos aceites esenciales, por medio del método de arrastre de vapor, determinaron la presencia de carvacrol y timol mediante métodos espectroscópicos y cromatógrafos, obteniendo que estaban mayormente compuestos por grupos fenólicos, su actividad antibacteriana en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Streptococcus pneumoniae*, las cuales mostraron una sensibilidad positiva para ambos aceite esencial s. Determinaron, además, una concentración mínima inhibitoria (CMI) dando como resultado una similitud en las cepas analizadas. Para el desarrollo de esta tesis, se tomó como referencia el método utilizado de extracción por destilación con vapor de agua, el ensayo de difusión y como punto comparativo de la CMI obtenida.

León y Ulate (2013) formularon “un enjuague bucal a base de aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y el clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) que pueda competir con los diferentes colutorios del mercado costarricense”. Realizaron la caracterización de las estructuras químicas presentes en el aceite esencial, una vez determinada su potencia y efectividad, se comparó con

cuatro de los enjuagues más comercializados en el país. Para el desarrollo de esta tesis, dicho estudio se tomó como referencia para llevar a cabo los antibiogramas y la inoculación de la cepa con la que se va a trabajar.

García. C yGarcía. O (2014), realizaron una evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de tomillo (*Thymus vulgaris*) y propuesta de la elaboración de una presentación farmacéutica que actúe a nivel de piel. Para la respectiva extracción utilizaron tallos, flores, y parte aérea de la planta de *T. vulgaris* por arrastre con vapor de agua, sometiénolo a un análisis de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, espectroscopía infrarroja para caracterizar los componentes (timol, carvacrol), se utilizó la técnica de tamizaje fitoquímico aplicada al aceite esencial acuoso de la planta, el cual había sido previamente liofilizado, finalmente, se elabora un gel para uso cutáneo.

Para el desarrollo de esta tesis, se tomó como referencia para comparar los resultados de los aceite esencial s realizados en el espectrofotómetro, ya que ellos caracterizaron los grupos funcionales y describieron las propiedades farmacológicas adicionales que podía presentar.

Díaz (2015) probó “Alternativas no tradicionales para el control del biofilme dental: sustancias alternativas con acción antibacteriana para la desinfección de cavidades: sustancias alternativas con acción antimicrobiana para la elaboración de desinfectantes de cavidades a partir de macadamia (*Macadamia integrifolia*) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.)”, para efectos prácticos de esta tesis, se tomó en cuenta su importancia en el desarrollo de las pruebas *in vitro* para evaluar la actividad del aceite esencial . En el desarrollo de esta tesis, además de las propiedades antibacterianas estudiadas, determinaron el poder curativo del aceite esencial gracias a sus fitonutrientes y metabolitos activos y se hicieron tres comparaciones para determinar cuál presentaba una mejor respuesta antibacteriana entre los respectivos aceite esencial s y la utilización de Clorhexinadina 2 %.

Rodríguez (2012) realizó una *Formulación de un ungüento y un gel a base del aceite esencial natural de Oreganun Vulgare y de Thymus vulgaris para el tratamiento complementario del síndrome de la piel escaladada estafilocócica*, comparó el porcentaje de rendimiento del aceite

esencial mediante dos métodos, Soxhlet y destilación simple, con dos disolventes: etanol y éter ético, identificó los grupos funcionales presentes en el aceite esencial y determinó la actividad en la que obtuvo una inhibición positiva frente el *Staphylococcus aureus*.

En la Universidad Latina de Costa Rica y la UCIMED no se encontró ningún tema relacionado con la actividad del *Thymus vulgaris* o posibles investigaciones relacionadas.

En la UNIBE, se desarrollaron tres investigaciones, la primera relacionada con la actividad antibacteriana de los aceites esenciales derivados del tomillo y el orégano, formularon “un enjuague bucal a base de aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y el clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) que pueda competir con los diferentes colutorios del mercado costarricense; la segunda una evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de tomillo (*Thymus vulgaris*) y propuesta de la elaboración de una presentación farmacéutica que actúe a nivel de piel, por último, se estudió la actividad antibacteriana de los aceites esenciales derivados del tomillo y el orégano.

En la UCR, se realizó una investigación relacionada con las alternativas no tradicionales para el control del biofilme dental, sustancias alternativas con acción antibacteriana para la desinfección de cavidades, sustancias alternativas con acción antimicrobiana para la elaboración de desinfectantes de cavidades a partir de macadamia (*Macadamia integrifolia*) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.).

Por último, en la UIA, la investigación realizada fue en la formulación de un ungüento y un gel a base del aceite esencial natural de *Oreganum vulgare* y de *Thymus vulgaris* para el tratamiento complementario del síndrome de la piel escaladada estafilocócica.

Proyecciones

Se pretende obtener mediante el uso del método de arrastre de vapor el aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

Se demostrará la actividad antibacteriana del aceite esencial de tomillo, mediante análisis cualitativo de los metabolitos activos y mediante pruebas microbiológicas in vitro, evaluando su capacidad inhibitoria, se espera realizar una preparación farmacéutica.

La importancia de esta investigación radica en el beneficio que se puede proporcionar tanto a la población como a los farmacéuticos, para poder desarrollar formas farmacéuticas a base del aceite esencial de tomillo como alternativa para tratar el *Staphylococcus aureus*, para lo cual se pretende elaborar un gel antibacteriano.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

En el presente segundo capítulo, sección definida como el marco teórico, se muestra la información obtenida a partir de diferentes fuentes bibliográficas en relación con el tema de investigación.

Plantas medicinales

Son aquellas que están compuestas por principios activos o metabolitos activos que pueden utilizarse en el tratamiento y curación de enfermedades, desde la antigüedad, el hombre ha experimentado con diferentes hierbas, árboles, arbustos, sus hojas o flores para desarrollar y tratar alguna patología.

Según Mendoza (2008, p. 228), la utilización de plantas como agentes terapéuticos busca los siguientes objetivos:

1. Sintetizar compuestos de estructuras conocidas para producir entidades patentables con mejor eficacia y menor toxicidad.
2. Utilizar fármacos derivados de plantas como herramientas farmacológicas.
3. Utilizar la planta entera o parte de ella como remedio medicinal o como fitofármaco.

Fitoterapia

La fitoterapia se utiliza tanto para el cuidado de la salud y mejora de la calidad de vida como en la prevención y tratamiento de las enfermedades. En unos casos es suficiente para curar una patología y en otros, será el coadyuvante de otras medicaciones o ayuda a aliviar determinados síntomas asociados. Su principal campo de acción son las afecciones leves y moderadas, así como las enfermedades crónicas, siendo útil en la terapia de más del 90 % de las afecciones tratadas habitualmente, en atención primaria.

La Sociedad Española de Fitoterapia define según Vanaclocha, y Cañigüeral (2003) que La Fitoterapia es un término acuñado por el médico francés Henri Leclerc a principios de siglo XX, un neologismo formado a partir de dos vocablos griegos: phytón (planta) y therapeía (tratamiento).

Se emplean productos de origen vegetal que presentan una característica básica, sus márgenes terapéuticos son amplios, incluye productos relativamente poco potentes o de potencia intermedia y excluye aquellos con un margen terapéutico estrecho. Lo cual la hace ideal, ya que el paciente está expuesto a una terapia menos agresiva y con una menor posibilidad de presentar efectos adversos. (Vanaclocha, y Cañigüeral, 2003)

Es una terapéutica suave, poco agresiva y con bajo porcentaje de efectos secundarios, se recomienda su uso principalmente para cuidar la salud y mejorar la calidad de vida.

Tomillo (*Thymus vulgaris*)

El tomillo (*Thymus vulgaris*) es una planta aromática y medicinal, planta perenne generalmente vertical, con base leñosa que se cultiva principalmente como una hierba culinaria en los jardines de hierbas. Numerosos tallos leñosos crecen hacia arriba para formar un montículo que alcanza de 15 a 30 cm de altura, tiene hojas opuestas, lanceoladas, con los bordes enrollados y pilosos. Los tallos son revestidos con minúscula, lineal a elípticas, puntiagudas, hojas de color verde grisáceo que son distintivamente de revolución. Requiere suelos ligeros con buen drenaje y secos. Se desarrolla bien a pleno sol.

Las partes más utilizadas son sus hojas y sus tallos, se caracteriza por un olor aromático, intenso.

Figura 1: Planta Conocida como Tomillo



Nota: elaboración propia.

Thymus deriva del egipcio *tham*, una especie de tomillo utilizado en los embalsamamientos, utilizado después por los griegos con el significado de planta perfumada y traducido al latín por Virgilio, que usó este nombre por primera vez. Se cree que fueron los monjes benedictinos quienes la introdujeron en Europa, siendo muy comúnmente utilizado como antiparasitario. Un boticario alemán de nombre Neumann obtuvo el aceite esencial iniciando a partir de ahí con estudios con fines terapéuticos. (Alonso, 2007)

Clasificación sistemática.

La Plants Database, USDA (2015) brinda la siguiente clasificación sistemática de esta planta, la cual se observa en la siguiente tabla 1.

Tabla 1: Clasificación Sistemática de *Thymus vulgaris* L

Reino	División	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
<i>Plantae</i>	<i>Magnoliophyta</i>	<i>Magnoliopsida</i>	<i>Lamiales</i>	<i>Lamiaceae</i>	<i>Thymus</i>	<i>Vulgaris</i> <i>L.</i>

Nota: Plants Database USDA (2017).

Los principios activos o sustancias activas son los que definen y sirven para clasificar a estas plantas y el principal criterio para su selección y mejora, el control del rendimiento y calidad del cultivo, conjuntamente, del procesado industrial, así como los que dotan a la planta de sus propiedades y sus usos terapéuticos y farmacológicos. (Muñoz, 2002, p 16)

Composición química.

El aceite esencial de tomillo se extrae por destilación de sus partes aéreas y se obtienen dos esencias, una más volátil que otra, la de color rojo es más pura que la de segunda destilación de un color blanquecino, dentro de los componentes principales se obtiene fundamentalmente el timol (40%), 1,8-cineol (3%), p-cimeno (15-50%), carvacrol (2.5-14.6%), linalol (4%), γ -terpineno (1-

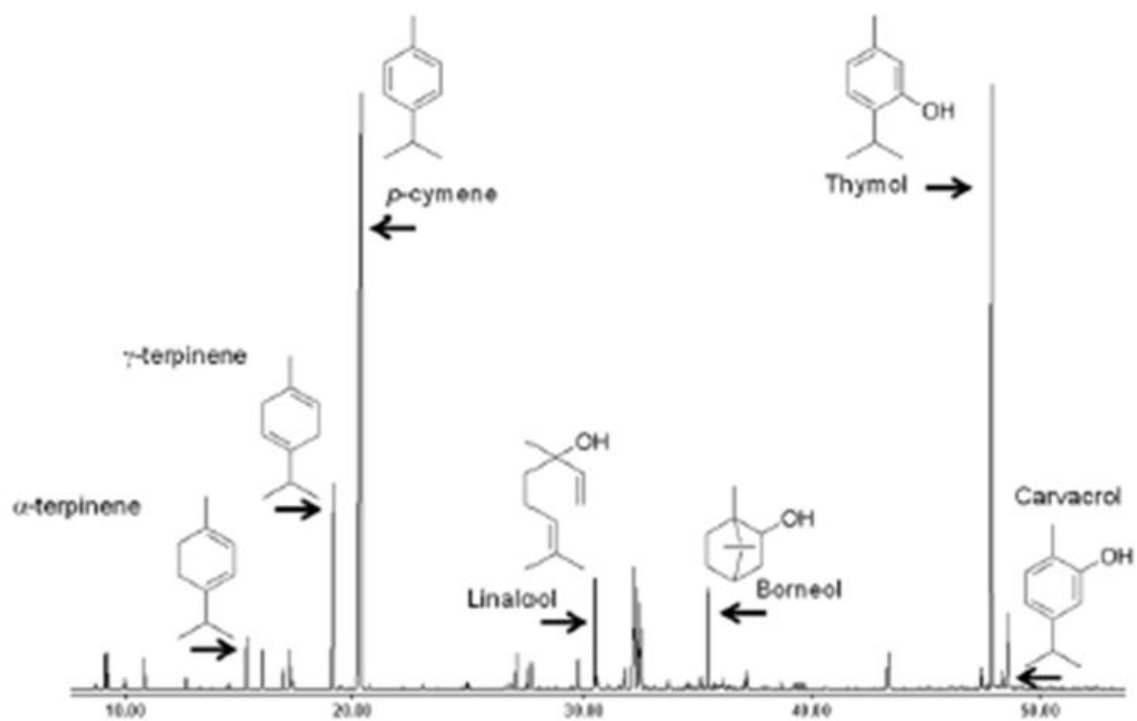
5%), borneol, acetato de bornilo, acetato de linalilo, geraniol, α y β -pineno, limoneno, α -terpineol, β -cariofileno, β -terpineol, γ -cadineno, verbenona, alcanfor (11-16%), tuyen-4-ol, entre otros.

Existen seis quimiotipos diferentes. Los más corrientes son aquellos en que predomina el timol, carvacrol o linalol, aunque existen tomillos donde los componentes mayoritarios son el geraniol, acetato de geraniol, acetato de terpinilo o tuyen-4-ol.

Flavonoides: principalmente heterósidos del luteol y apigenol, y en menor medida flavonas metoxiladas: cosmosina, timonina, isotimonina, 8-dimetil-timonina, timusina, naringenina, eriodictiol, cirsimarina, xantomicro, 5-desmetilnobiletina, 5-desmetilsinensetina, sideritol, flavona, y 8-metoxi-cirsilineol. También se ha señalado la presencia de flavanonas, flavonoles y heterósidos de luteoluteolina.

Otros como taninos (7-10%), serpilina (principio amargo), saponinas ácidas y neutras, ácidos labiático, oleanólico y ursólico (1,5%), ácidos fenilcarboxílicos (clorogénico y cafeico), ácido rosmarínico (<1%), ácido litospermico y resinas.

Figura 2: Análisis GC-MS de Aceite Esencial de *Thymus vulgaris*



Nota: Molecules (2014).

Figura 3: Componente del Aceite Esencial de *Thymus vulgaris*

No.	Compound	Total oil %	Retention indices
1	α -Thujene	0.6	932
2	α -Pinene	1.9	936
3	Camphene	1.2	950
4	Oct-1-en-3-ol	1.0	962
5	β -Pinene	0.3	978
6	Myrecene	1.1	987
7	<i>p</i> -Cymene	29.1	1,015
8	1.8-Cineole	2.1	1,024
9	Limonene	0.2	1,025
10	γ -Terpinene	5.2	1,051
11	<i>p</i> -Cymenene	0.1	1,075
12	Terpinolene	0.1	1,082
13	Linalool	3.7	1,086
14	Camphor	0.5	1,123
15	Borneol	1.9	1,150
16	Terpinen-4-ol	1.3	1,164
17	α -Terpineol	0.3	1,176
18	Thymol methyl ether	1.3	1,215
19	Carvacrol methyl ether	1.0	1,226
20	Borneol acetate	0.3	1,270
21	Thymol	38.1	1,267
22	Carvacrol	2.3	1,278
23	Thymol acetate	0.2	1,329
24	African-1-en	0.1	1,356
25	α -Copaene	0.2	1,379
26	β -Burbonene	0.1	1,386
27	β -Caryophyllene	3.1	1,421
28	Thymohydroquinone	0.1	1,509
29	α -Humulene	0.1	1,455
30	γ -Muurolene	0.3	1,474
31	cis- β Guaiene	0.1	1,488
32	Cuparene	0.1	1,498
33	γ -Cadinene	0.6	1,507
34	Calamenene B	0.2	1,517
35	δ Cadinene	0.3	1,520
36	α -Cadinene	0.1	1,534
37	Caryophyllene oxide	0.5	1,578
38	γ -Eudesmol	0.1	1,618
39	Eudesm-3-en-7-ol	0.1	1,650
40	Cadalene	0.1	1,659

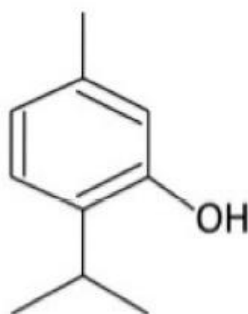
Nota: Microbial drug resistance (2012).

Aceite esencial.

El principal componente del tomillo es el timol, el cual según Helander citado por García y Palou (2008, p.47), es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacaridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática. El timol se caracteriza por su poder desinfectante y fungicida, sin embargo, su sensibilidad depende del tipo de microorganismos, de la temperatura de incubación y del pH del

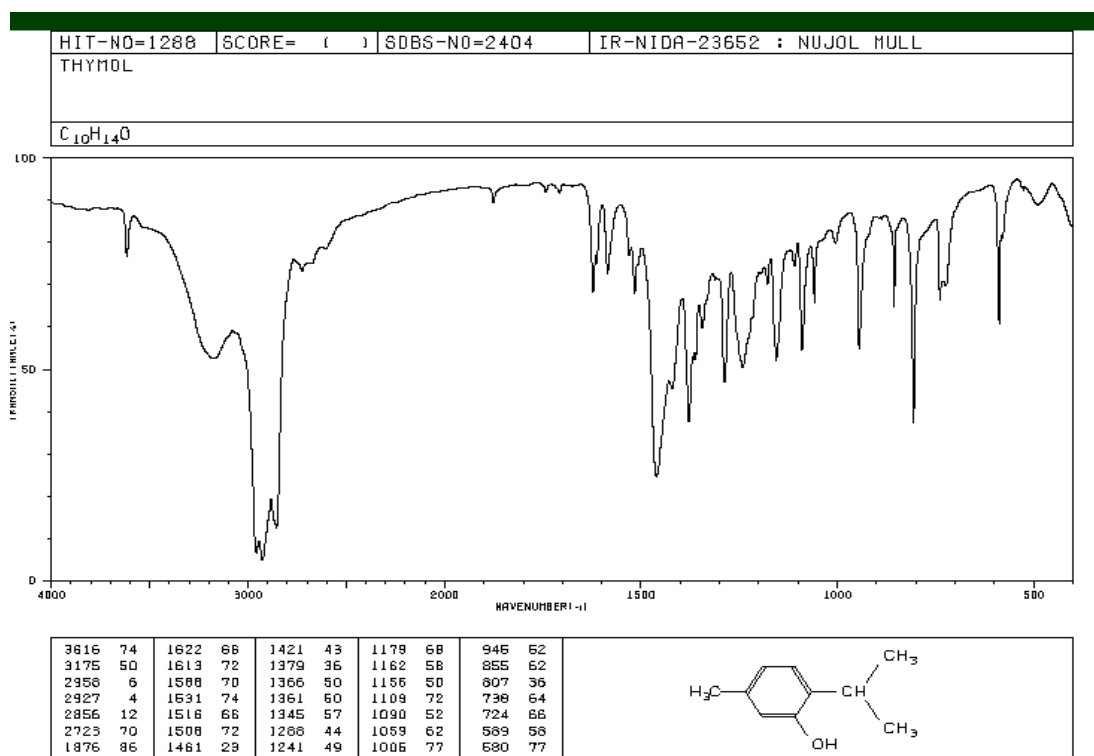
medio. Muy poco soluble en agua, muy soluble en etanol al 96 %, fácilmente soluble en aceites esenciales y aceites grasos, bastante soluble en glicerol. Se disuelve en disoluciones diluidas de hidróxidos alcalinos. Punto de fusión: 51,5 °C.

Figura 4: Estructura del Timol



Nota: Peredo, Palou, López (2009).

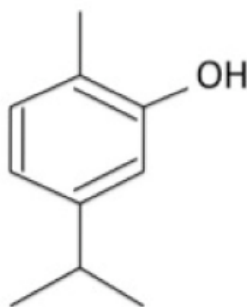
Figura 5: Espectro IR del Timol



Nota: Spectral Database for Organic Compounds (SDBS).

El carvacrol al igual que el timol es capaz de atravesar la membrana celular cuando está protonado (en medio ácido) y al alcanzar el citoplasma libera un protón, resultando en la acidificación de la célula. (Ugalde, Cezaro, Cenci, Claudio, Paroul, Toniazzo, Steffens, y Cansian, 2016)

Figura 6: Estructura del Carvacrol



Nota: Peredo, Palou, López (2009).

Acciones farmacológicas.

Dentro de las propiedades farmacológicas que caracterizan a esta planta, se puede mencionar su capacidad desinfectante, antiséptica, antifúngica, antitusiva, antiinflamatoria, estimulante del sistema inmunitario, tónico nervioso, estimulante del sistema inmunitario y de la circulación, vermífugo.

Es un desinfectante de tipo fenólico con actividad antibacteriana y antifúngica, más potente que el fenol, pero de uso limitado debido a su baja solubilidad en agua, a la pérdida de actividad en presencia de proteínas, y a que produce irritaciones. También se utiliza por vía tópica por su acción antiséptica, antimicótica, y antipruriginosa, eficaz en el tratamiento de úlceras y heridas infectadas, y en onicomycosis y dermatomycosis, aplicándose en forma de soluciones, polvos, y pomadas. Se suele asociar a sustancias astringentes, absorbentes, y otros antisépticos. Por vía tópica también se usa como irritante en el tratamiento de la alopecia areata. Por vía bucal, se emplea en colutorios y otros preparados para odontoestomatología como antiséptico, y para las aftas bucales. Además, se usa en inhalaciones junto con otras sustancias volátiles en preparados

para la tos, resfriados y trastornos respiratorios. Aceite esencial de tomillo (contra las picaduras de insecto). (López, 2006)

Toxicidad.

El aceite esencial a dosis altas puede causar convulsiones, hiperemia e inflamación severa y dermatitis. La planta y el aceite pueden ser estimulantes uterinos, razón por la que está contraindicado durante el periodo de embarazo.

Método de extracción.

Existen en la actualidad diferentes métodos para la extracción de aceites esenciales, y por lo tanto, de sus metabolitos activos. Existen métodos que han sido utilizados desde la antigüedad para elaborar remedios caseros, dentro de los que se destacan los métodos de infusión o de cocción, principalmente, para la elaboración de tés de plantas con propiedades medicinales.

Por otra parte, en la actualidad se cuenta con métodos más elaborados y sofisticados para la obtención de sustancias cada vez más puras, dentro de ellos se destaca la maceración con disolventes orgánicos, hidrodestilación, la destilación, el arrastre con vapor, soxhlet, entre otros.

En esta investigación, interesa estudiar un tipo de método de extracción que es el utilizado para extraer el aceite esencial del tomillo, necesario para concretar los resultados de la primera variable. El método de arrastre con vapor es un sistema que utiliza agua como gas de arrastre de sustancias presentes la mayoría de veces en plantas.

Según Villegas, Acereto, y Vargas (2006, p. 34): La destilación por arrastre de vapor de agua permite aislar y purificar a bajas temperaturas sustancias orgánicas líquidas inmiscibles o muy poco miscibles en agua, que no reaccionan a ella así se evita la descomposición de las especies que resultan se termolábiles a temperaturas cercanas a su punto de ebullición.

También se puede usar el llamado *método directo*, en el que el material está en contacto íntimo con el agua generadora del vapor. En este caso, se ponen en el mismo recipiente el agua y el material a extraer, se calientan a ebullición y el aceite extraído es arrastrado junto con el vapor

de agua hacia un condensador, que enfría la mezcla, la cual es separada posteriormente para obtener el producto deseado. Este método es usado de preferencia cuando el material a extraer es líquido o cuando se utiliza de forma esporádica. Una variante de esta última técnica es la llamada *hidrodestilación*, en la que se coloca una trampa al final del refrigerante, la cual va separando el aceite del agua condensada, con lo cual se mejora y se facilita el aislamiento del aceite esencial.

Staphylococcus aureus

Los estafilococos son cocos Gram positivos, catalasa positiva y el diamino ácido en el peptidoglicano es la L-lisina. El género *Staphylococcus* posee alrededor de 30 especies, de las cuales se hará referencia al *S. aureus*.

Según Cervantes, García, y Salazar (2014) el género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas.

Ogston introdujo el nombre de *Staphylococcus*, del griego *staphyle* que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas.

Características del *Staphylococcus aureus*.

S. aureus posee dos componentes en la pared celular: del ácido lipoteicoico juega un papel en la adherencia, mientras que la parte covalente del peptidoglicano se une a las proteínas con función de adhesinas.

La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género

Staphylococcus de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos. Se diferencia de las demás especies por producir coagulasa que se manifiesta por su capacidad para coagular, es resistente al calor, a la desecación y puede crecer en medios con grandes cantidades de NaCl (7.5%). *S. aureus* crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate, cerebro, corazón, infusión agar (BHI, por sus siglas en inglés) y medios líquidos para hemocultivo, donde se recupera fácilmente. Se debe usar un medio selectivo en muestras clínicas donde hay bacterias Gram negativas junto con *S. aureus*.

Staphylococcus aureus produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel intrahospitalario. En la comunidad, las infecciones por *S. aureus* por lo general son agudas, piogénicas y superficiales, de igual manera, se pueden producir cuadros más complicados como meningitis, peritonitis, osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. A nivel nosocomial, *S. aureus* es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica, y de prótesis.

El principal reservorio de *S. aureus* es el ser humano, detectándose en los pacientes sanos, muy comúnmente en las fosas nasales, así como en los pacientes infectados. La colonización puede asentar sobre la mucosa nasal, orofaringe, epidermis íntegra, úlceras crónicas cutáneas, heridas en fase de cicatrización o en la uretra de portadores de sonda.

Además, posee una gran capacidad para sobrevivir en un ambiente adverso y, por la acción de sus determinantes de patogenicidad (cápsula mucoide polisacárida, componentes antigénicos de la pared, producción de enzimas como catalasa, coagulasa, hialuronidasa, estafiloquinasas, lipasas, β -lactamasas, o la secreción de diversas toxinas como la exotoxina epidermolítica, enterotoxinas o la toxina del síndrome de shock tóxico), acaba produciendo infección.

Tabla 2: Determinante de Patogenicidad de *S. aureus*

Determinante de patogenicidad	Propiedades
• Peptidoglicano • Ácidos teicoicos • Proteína A	Activación del complemento Antifagocítica

Determinante de patogenicidad	Propiedades
• Cápsula mucoide	Antifagocítica Adherencia
<u>Enzimas</u>	
• Coagulasa • Estafiloquinasas • Hialuronidasas • Lipasas	Formación de absceso Destrucción del coágulo Invasión hística Colonización
<u>Toxinas</u>	
• Hemolisinas • Leucocidina • Toxina exfoliativa • Toxina del shock tóxico • Enterotoxinas	Rotura de la membrana celular Alteración de la permeabilidad celular de fagocitos Epidermólisis Shock Intoxicación alimentaria

Nota: Etiopatogenia microbiológica 2005

Infecciones producidas por *S. aureus*.

Invasión directa

-Superficial

- Piodermas, incluyendo impétigo y paroniquia.
- Infecciones de piel y tejidos blandos, forúnculos, celulitis, linfangitis, linfadenitis.

-Profunda

- Artritis séptica
- Osteomielitis
- Piomiositis

Diseminación por vía sanguínea

- Bacteriemia con o sin *shock* o falla multiorgánica.

- Formación de abscesos metastásicos (cerebro, pulmón, hígado, bazo, retroperitoneo, riñón, tracto genital).

Enfermedades mediadas por toxinas

- Síndrome de piel escaldada
- Intoxicación alimentaria
- Síndrome del *shock* tóxico

Tabla 3: Secuencia de Eventos Patogénicos en Infecciones Serias Causadas por *S. Aureus*

Secuencia de eventos	Evento patogénico
Evento 1	Colonización, portador, producción de toxina
Evento 2	Rotura de barrera cutaneomucosa
Evento 3	Invasión • Celulitis, linfangitis • Formación de absceso • Eventual invasión de la sangre
Evento 4	Bacteriemia
Evento 5	Síndrome de sepsis • Componentes de la pared • Toxina del shock tóxico • Rol de los mediadores disparados
Evento 6	Complicaciones • Abscesos supurados metastásicos, endocarditis, etc. • <i>Shock</i> séptico o falla multiorgánica

Secuencia de eventos	Evento patogénico
Evento 7	Muerte

Nota: Etiopatogenia microbiológica

Forma farmacéutica

Los geles son formas farmacéuticas de consistencia semirrígida, generalmente no tienen aceites grasos en su formulación, son homogéneos y claros. Poseen una matriz polimérica formada por agentes gelificantes, razón por la que no deben friccionarse para no romper la conformación tridimensional del polímero.

Algunas de las ventajas que ofrecen es que son bien tolerados, fáciles de lavar, algunos producen frescor y su aplicación es fácil. Dentro de las desventajas que se pueden presentar está la incompatibilidad con numerosos principios activos y bajo poder de penetración. Su formulación, por lo general, está destinada para aplicaciones sobre las membranas mucosas.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

Se describen los distintos procesos metodológicos llevados a cabo para el desarrollo de esta investigación

Enfoque de la Investigación

La presente investigación va a consistir en la elaboración y observación de los procedimientos realizados en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas. Donde se aplican conocimientos de métodos químicos para la extracción y la identificación del producto en análisis. Además, se hará uso de métodos microbiológicos para demostrar la capacidad antibacteriana y cumplir con los objetivos del proyecto, “el enfoque cuantitativo emplea la recolección de datos para probar hipótesis, con base en la medición numérica y el análisis estadístico, para establecer patrones de comportamiento y probar teorías” (Hernández, Fernández y Baptista, 2014, p.96).

Diseño de la Investigación

Según Hernández et al. (2014) “el diseño de una investigación “se refiere al plan o estrategia concebida para obtener la información que se desea con el fin de resolver al planteamiento del problema” (p. 128). La investigación va a ser de tipo experimental porque consiste en la extracción de los principios activos del tomillo, identificación de metabolitos activos, pruebas *in vitro* para demostrar la acción antibacteriana y la elaboración de una forma farmacéutica.

Objetos de Estudio

Para el presente estudio experimental, se utilizará tomillo seco, además, para la evaluación de la actividad antibacteriana, se hará uso de la especie *Staphylococcus aureus*.

Variables de Análisis

“Una variable es una propiedad que puede ser cambiante y cuya variación es capaz de medirse u observarse” (Hernández, et al. 2014).

Tabla 4: Definición de las Variables de la Investigación

Variable	Definición conceptual	Definición operacional e instrumental	Instrumentación
Aceite esencial	“Son sustancias aromáticas, de base lipídica encontradas prácticamente en todas las plantas, distribuidas en las diferentes partes de la planta” (Peredo, Palou, López, 2009,párr. 6).	Se obtendrá mediante el proceso de arrastre de vapor del tomillo.	Equipo de arrastre de vapor, <i>beaker</i> .
Principio activo	“Los principios activos o sustancias activas son los que definen y sirven para clasificar a estas plantas y el principal criterio para su selección y mejora, el control del rendimiento y calidad del cultivo, conjuntamente, del procesado industrial, así como los que dotan a la planta de sus propiedades y sus usos terapéuticos y farmacológicos”. (Muñoz, 2002, p 16).	Se identificará por medio del uso de espectroscopia infrarroja y determinaciones en diferentes soluciones de los reactivos para determinar los componentes mediante pruebas de coloración.	Infrarrojo. Espectrómetro de masas. Tubos de ensayo, gotero, soluciones de los reactivos para las pruebas de coloración.
Actividad antibacteriana	Constituida por el cambio en la pared y membrana celular de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> causado por agentes químicos externos,	Se determinará la inhibición del halo en cultivo agar y se comparará por medio del uso de la acción de discos antimicrobianos.	Regla, placa Petri, cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>

Variable	Definición conceptual	Definición operacional e instrumental	Instrumentación
	produciendo una inhibición en el crecimiento del mismo.		
Gel	“Son sistemas semisólidos que consisten en suspensiones compuestas por partículas inorgánicas pequeñas o moléculas orgánicas grandes interpenetradas por un líquido” (Gennaro, 2003)	Se desarrollará un gel antibacteriano, cuyo procedimiento se detalla más adelante en el apartado método de análisis.	<i>Beaker</i> , probeta, goteros, pastillas de agitación, agitador de vidrio, agitador magnético.

Nota: elaboración propia.

Instrumentos y técnicas de recolección

En el siguiente apartado, se hará una descripción de los instrumentos y técnicas a utilizar para el desarrollo de este proyecto, los cuales se desarrollaron en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas, aplicando los conocimientos relacionados con los métodos de extracción, identificación fitoquímica, desarrollo de forma farmacéutica y análisis microbiológico para demostrar la capacidad antibacteriana.

Proceso para la recolección de la muestra

El material vegetal utilizado es obtenido mediante la compra de un lote de 5 kilos en La Casa del Condimento en el Mercado Central de San José, el cual se encontraba en un saco cerrado y almacenado en la bodega, en el período de mayo del año 2017. Dicho material vegetal es importado de Guatemala, y es secado de manera artesanal en graneros.

Obtención del aceite esencial de *Thymus vulgaris* por el método de arrastre con vapor.

El aceite esencial de tomillo se procede a extraer del material vegetal seco en este caso, por medio de la destilación por arrastre con vapor.

Materiales y equipo para la obtención del aceite de *Thymus vulgaris* por el método de arrastre con vapor.

Balanza analítica y granataria

Balón de fondo redondo de 1000 ml

Balón de fondo redondo de 500 ml

Columna de relleno para termómetro

Termómetro

Beaker 250 ml, 600 ml

Probeta 100 ml

Condensador para destilación

Manguera para conexiones

Alargadera

Agitador-calentador

Embudo separador 500 ml

Prensas

Soporte universal

Pastilla de agitación

Piseta

Pescador

Cronómetro

Tiras reactivas de pH

Agua destilada

Rota vapor

Bomba para generar vacío

Erlenmeyer de 1000 ml

Buchner

Papel de filtro

Probeta 200 ml

Papel aluminio

Etiquetas

Tomillo (*Thymus vulgaris*) = 150 g de material vegetal seco.

Reactivos.

Sulfato de sodio anhidro

Diclorometano

Método para destilación y extracción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* por el método de arrastre con vapor.

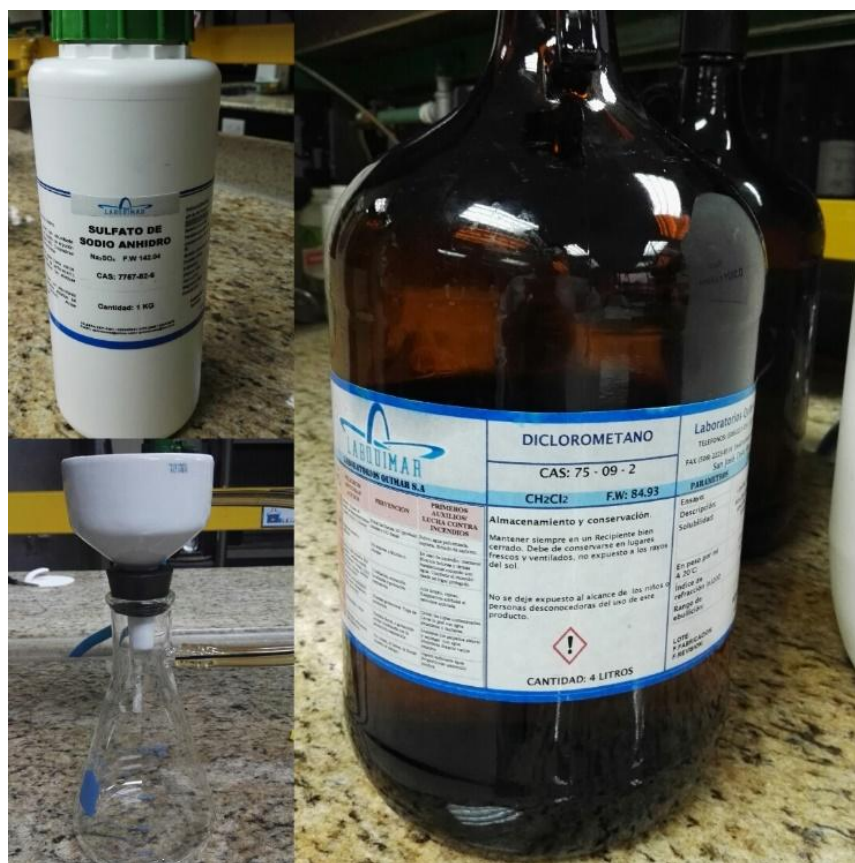
1. Pesar 150 gramos del material vegetal seco en balanza granataria y colocarlo en el balón de fondo redondo de 1000 ml limpio y seco, forrar con papel aluminio.
2. Adicionar aproximadamente, 200 ml de agua destila.
3. Armar el sistema de destilación por arrastre con vapor
4. Utilizar 500 ml de agua destilada en un balón de 500 ml de fondo redondo, calentando a ebullición con una temperatura máxima y agitación constante para el proceso de destilación como se observa en la figura siete.
5. Tiempo de destilación cinco horas.
6. Observar las primeras gotas de destilado, y sus características físicas.

Figura 7: Equipo para Arrastre de Vapor



Nota: elaboración propia.

Figura 8: Reactivos y Equipo Utilizado en el Proceso de Secado y Obtención de la Fase Oleosa del Aceite esencial de *Thymus vulgaris*



Nota: elaboración propia.

Purificación del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

1. Colocar la muestra líquida obtenida durante el secado del aceite esencial oleoso en el balón del rotavapor o en baño maría como se observa en la figura nueve y diez.
2. En el caso del rotavapor, ajustar la temperatura a una temperatura de 42°C y a 136 rpm
3. En el caso del baño maría, mantener una agitación constante, mantener una temperatura de 40 °C
4. Determinar el pH mediante el uso de tiras reactivas.
5. Almacenar el aceite en un recipiente ámbar o forrado con papel aluminio para protegerlo de la luz.

Figura 9: Métodos para la Purificación del Aceite Esencial *Thymus vulgaris*, Mediante el Uso del Rotavapor



Nota: elaboración propia.

Figura 10: Métodos para la Purificación del Aceite Esencial *Thymus vulgaris*, Mediante el Uso del Baño María



Nota: elaboración propia.

Identificación de los compuestos y tamizaje fitoquímico

Los aceites esenciales puros del aceite esencial del tomillo se analizaron mediante la utilización del equipo de espectroscopia infrarroja de la Universidad Internacional de las Américas, en el mes de junio, los cuales se utilizarán para obtener un espectro y realizar la comparación de las señales obtenidas

Análisis cualitativo por espectroscopia IR del aceite esencial de tomillo.

Para dicho análisis, se utilizaron unos μl del aceite esencial de *Thymus vulgaris* obtenido anteriormente, se procede a colocar un volumen en el equipo infrarrojo de la Universidad Internacional de las Américas. Se analiza y se obtiene el respectivo espectro, el cual se compara con la muestra control y en la base de datos de SBDS, para así identificar la presencia de timol, carvacrol y otros componentes.

Análisis de los componentes del aceite esencial del *Thymus vulgaris* mediante cromatografía de gases acoplado a un detector de masas.

Para determinar las áreas relativas presentes en el aceite esencial del tomillo, se procedió a realizar un análisis por medio de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas, y el análisis de barrido de compuestos orgánicos GC-MS en la muestra del aceite esencial de tomillo.

La muestra se analizó en el Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas (Larep) del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (Iret-UNA) a cargo del Químico ambiental Clemens Ruepert. (ver anexo)

Tamizaje fitoquímico

Materiales y equipo para el tamizaje fitoquímico.

Gradilla

Tubos de ensayo

Goteros

Balón aforado 100ml

Beaker de 50 ml

Pipeta 1 ml

Piseta

Reactivos.

Agua destilada

Aceite esencial de tomillo

Virutas de magnesio.

Reactivo de dragendorff

Reactivo de Mayer.

Ácido clorhídrico 1 % en agua

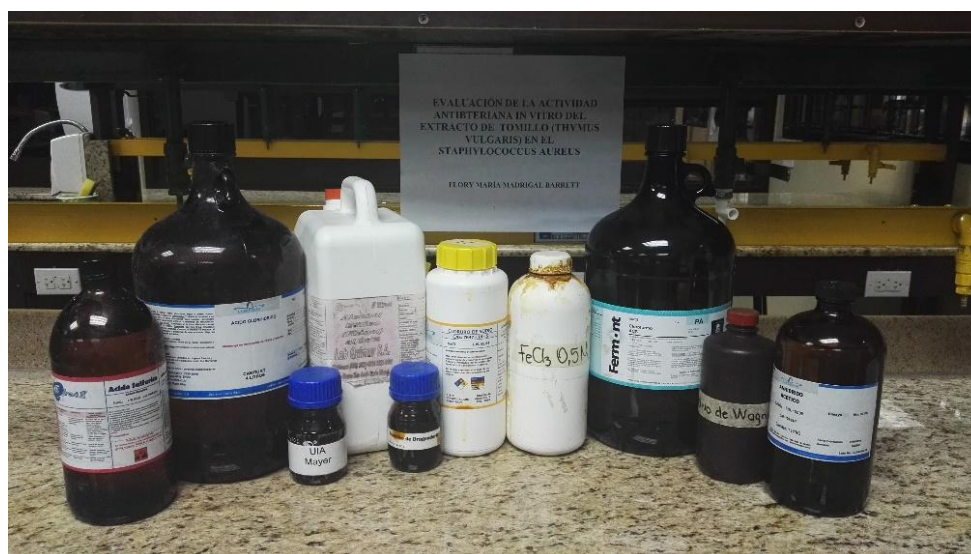
Cloroformo

Anhídrido acético

Tricloruro de hierro III

Ácido sulfúrico concentrado

Figura 11: Reactivos Utilizados para la Caracterización Fitoquímica



Nota: elaboración propia.

Reacciones de caracterización para el tamizaje fitoquímico.

Identificación de alcaloides: Ensayo de Dragendorff.

1. Tomar una alícuota de 0.5 ml del aceite esencial hidroalcohólico, colocarla en un tubo de ensayo limpio y seco.
2. Adicionar un ml de ácido Clorhídrico al 1% en agua.

3. Añadir tres gotas del reactivo de Dragendorff.
4. Observar si se presenta algún cambio (opalescencia, turbidez, precipitado).

Identificación de fenoles: Prueba de tricloruro de hierro

1. Tomar una alícuota de 0.5 ml del aceite esencial hidroalcohólico, colocarla en un tubo de ensayo limpio y seco.
2. Añadir tres gotas de cloruro de hierro III.
3. Dejar reposar y observar si se presenta algún cambio (coloración verde o azul).

Identificación de alcaloides: Prueba de Mayer

1. Tomar una alícuota de 0.5 ml del aceite esencial hidroalcohólico, colocarla en un tubo de ensayo limpio y seco.
2. Adicionar un ml de ácido clorhídrico al 1% en agua.
3. A la solución acuosa agregarle cloruro de sodio en polvo, agitar y filtrar.
4. Añadir dos o tres gotas de la solución reactiva de Mayer.
5. Observar si se presenta algún cambio (opalescencia, turbidez, precipitado).

Identificación de terpenos: Prueba de Libermann- Burchard.

1. Tomar una alícuota de 0.5 ml del aceite esencial hidroalcohólico, colocarla en un tubo de ensayo limpio y seco.
2. Adicionar un ml de cloroformo.
3. Adicionar un ml de anhídrido acético, mezclar bien.
4. Por las paredes del tubo de ensayo, dejar resbalar dos a tres gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.
5. Observar si se presenta un cambio.

Ensayo de Espuma, identificación de saponinas

1. Disolver una alícuota de 0.5 ml del aceite esencial hidroalcohólico en etanol en un tubo de ensayo limpio y seco.
2. Diluir en cinco veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 min.

3. Observar si se produce una espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor o altura y se mantiene.

Identificación de flavonoides: Prueba de Shinoda

1. Tomar una alícuota de un ml del aceite esencial hidroalcohólico, colocarla en un tubo de ensayo limpio y seco.
2. Adicionar dos virutas de magnesio.
3. Adicionar 0.5ml de ácido clorhídrico concentrado, agitar bien.
4. Observar si se presenta un cambio.

Pruebas microbiológicas para la evaluación de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de tomillo

Para evaluar la posible actividad antibacteriana de la formulación del enjuague bucal, es necesario comprobar que el aceite esencial de tomillo utilizado en la formulación es efectivo ante los microorganismos Gram positivo como el *Staphylococcus aureus*. Dicha prueba fue realizada en el Laboratorio Microlabs, Guadalupe.

Materiales y equipos para el desarrollo de la prueba microbiológica.

Goteros

Asas para inoculación para la esterilización

Lámpara de alcohol para la esterilización

Medios de cultivo Mueller-Hinton

Portaobjeto

Hisopos

Discos de antimicrobianos

Regla con escala métrica.

Reactivos.

Aceite mineral

Peróxido de hidrógeno

Aceite esencial del aceite esencial de tomillo

Patrón del aceite esencial de tomillo

Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Cetraxal otico (Ciprofloxacino)

Figura 12: Cultivo de la Cepa *Staphylococcus aureus*



Nota: elaboración propia.

Figura 13: Materiales y Reactivos para el Desarrollo de la Prueba Microbiológica



Nota: elaboración propia.

Figura 14: Equipo Utilizado para el Desarrollo de las Pruebas Microbiológicas



Nota: elaboración propia.

Figura 15: Materiales y Reactivos para la Prueba de la Catalasa



Nota: elaboración propia.

Método para el cultivo e identificación de la actividad antibacteriana.

1. Realizar tres hoyos pequeños en el medio de cultivo Mueller-Hinton.
2. Numerar cada uno de los hoyos para identificar las muestras.
3. Tomar una muestra de la colonia con la que se va trabajar e inocular con movimiento de estrías en el medio de cultivo Mueller-Hinton.
4. Inyectar en cada uno de los hoyos las respectivas muestras a analizar.

5. Identificar y almacenar los medios por un periodo de 24 horas, a una temperatura de 35°C.
6. Evaluar si se da la formación en cada disco, halos de inhibición que demuestren la actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo, sobre los microorganismos Gram positiva como el *S. Aureus*.
7. Comparar los halos de inhibición producidos por los discos de las diferentes muestras inyectadas.
8. Observar y medir los halos de inhibición, que pudieran formarse.

Métodos para el desarrollo de la prueba de la catalasa.

1. Esterilizar el asa para inoculación, y el portaobjetos.
2. Tomar una muestra del cultivo de *Staphylococcus aureus*, colocarla en el portaobjetos.
3. Adicionar una gota de peróxido de hidrógeno.
4. Observar y anotar los cambios.

Elaboración de la forma farmacéutica

Una vez obtenido el aceite esencial del tomillo, se realizó una formulación para la elaboración del gel antibacteriano.

Materiales y equipo utilizados en la elaboración del gel antibacteriano.

Beakers de 250 ml, 500 ml

Gotero

Probeta 25 ml, 50 ml

Espátula

Papel filtro

Agitador de vidrio

Pastilla de agitación magnética

Calentador – agitador magnético

Tira de pH

Balanza analítica

Reactivos.

Aceite esencial de *Thymus vulgaris*

Carbopol

Trietanolamina (TEA)

Propilengicol

Metilparabeno y propilparaeno

Glicerina

Agua destilada

Método utilizado para la elaboración del gel antibacteriano.

1. Etiquetar tres beaker.
2. En el beaker #1 (Fase I), a una agitación constante, adicionar el agua necesaria para la formulación y adicionar lentamente el carbopol requerido.
3. En el beaker #2 (Fase II), disolver el metilparabeno y propilparabeno en el propilengicol a una agitación constante aplicando calor.
4. En el beaker #3 (Fase III), adicionar la glicerina y el aceite esencial hidroalcohólico de *Thymus vulgaris*.
5. Una vez disuelto el carbopol y los parabenos en sus respectivos beaker, manteniendo una agitación constante, se procede a mezclar el fase II en la fase I.
6. Adicionar lentamente la fase III a la formulación.
7. Agregar las gotas de trietanolamina y verificar el pH, este debe ser de 6,
8. Rotular y envasar.

Figura 16: Reactivos para la Elaboración del Gel Antibacteriano



Nota: elaboración propia.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

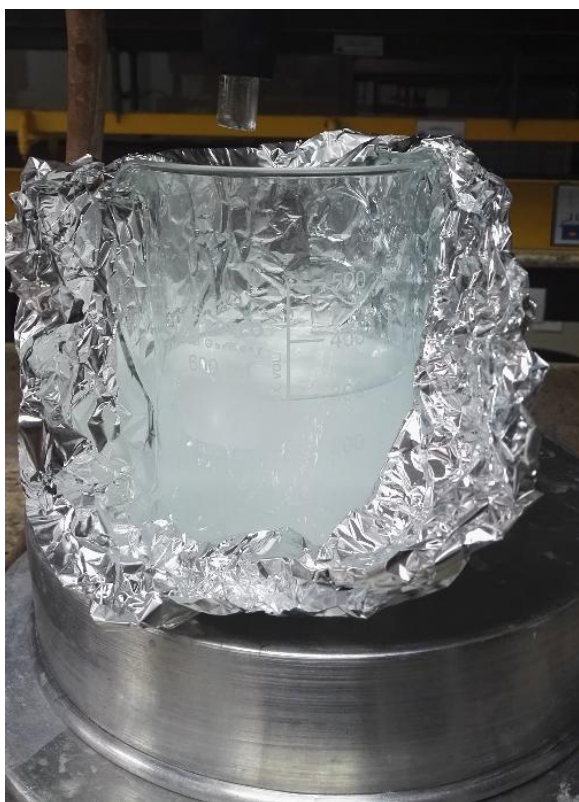
La información proporcionada en este capítulo es el resultado del desarrollo investigativo de cada variable de los objetivos correspondientes.

Variable 1. Extracción del aceite esencial presente en el tomillo

La materia prima para realizar la extracción del aceite esencial fue adquirida en el Mercado Central de San José, la cual ya venía seca. Se procedió a pesar 150g de tomillo en una balanza granataria para realizar la destilación por arrastre de vapor.

Transcurrido el periodo de destilación por arrastre de vapor, se obtiene un aproximado de 350-400 ml del aceite esencial acuoso de tomillo, como se observa en la figura, el cual es incoloro, presenta un olor fuerte característico del tomillo y a la vista se observa una consistencia acuosa-oleosa.

Figura 17: Destilado Acuoso del Aceite Esencial de *Thymus Vulgaris* Obtenido por Arrastre de Vapor



Nota: elaboración propia.

Se procede a la obtención del aceite esencial del *Thymus Vulgaris*, colocando el volumen obtenido en un embudo separador de 500 ml, con la probeta de 200 ml, se miden 150 ml de diclorometano y se vierten en el embudo, observándose la separación de dos fases como se observa en la figura 18.

Figura 18: Extracción Líquido-Líquido en Embudo Separador del Aceite Esencial con Diclorometano



Nota: elaboración propia.

La fase acuosa con una densidad de 1.0053 Kg/m^3 y la fase oleosa con una densidad de 1.3283 Kg/m^3 . Se elimina la fase acuosa y se procede a trabajar con la fase oleosa, a la cual se le elimina cualquier posibilidad de traza de agua con Na_2SO_4 y mediante el uso de rota vapor o baño maría, se elimina el solvente orgánico,

Se procedió a utilizar una temperatura entre $40\text{-}42^\circ\text{C}$, esto debido a que el punto de ebullición de diclorometano corresponde a 39.6°C , permitiendo de esta manera una separación idónea.

Una vez obtenido el aceite esencial del cual se obtuvo un volumen aproximado de 4 ml, este se almacenó a temperatura ambiente en un vial, el cual fue recubierto con papel aluminio para protegerlo de la luz, y así evitar la inactivación de los componentes activos.

Figura 19: Aceite Esencial de Tomillo y su Respectivo Almacenamiento



Nota: elaboración propia.

Tabla 5: Características Organolépticas del Aceite esencial de Tomillo Obtenido por el Método de Arrastre de Vapor

Propiedades físicas	Aceite esencial de <i>Thymus Vulgaris</i>
Color	Amarillo oscuro
Sabor	Amargo
pH	5
Olor	Fuerte y penetrante característico del tomillo
Textura	Viscosa

Nota: elaboración propia.

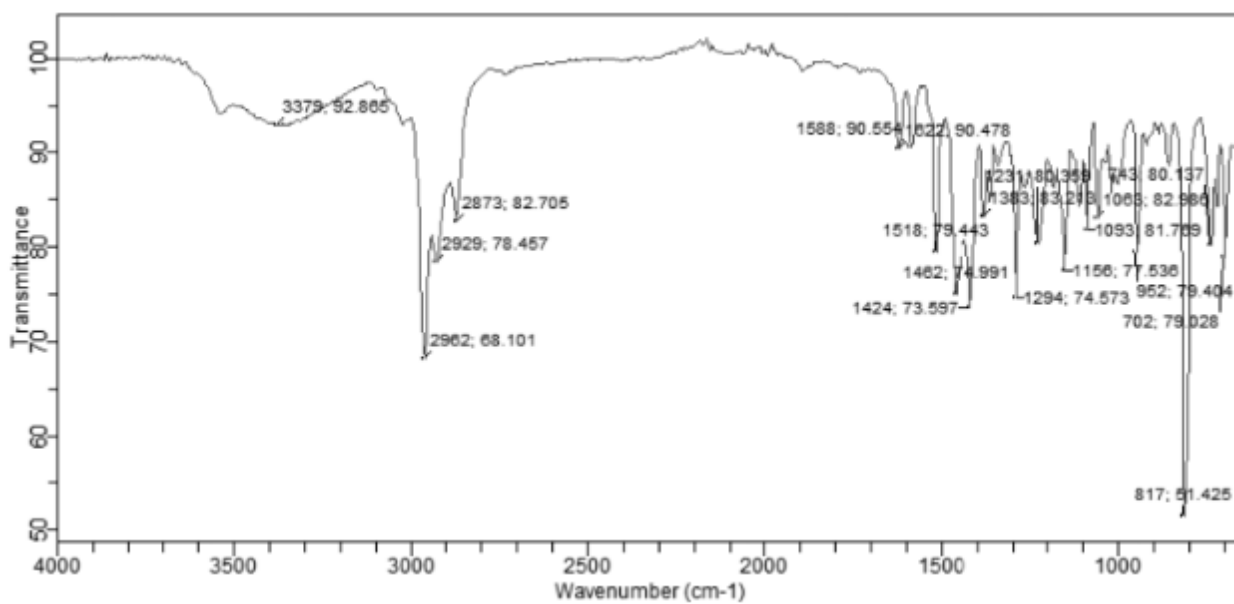
En la tabla 5, se muestran las características organolépticas del aceite esencial de *Thymus Vulgaris* obtenido por el método de arrastre de vapor, inicialmente presentaba una coloración blanquecina, una mezcla entre el aceite extraído y el agua presente, sin embargo, después de los respectivos procesos, se observó una coloración amarilla oscura, con un olor fuerte, penetrante y persistente, al tacto presenta una textura viscosa, la cual deja un olor fuerte y aromático característico, según la literatura a la presencia del timol. Un pH ácido de 5 determinados mediante el uso de tiras reactivas, un sabor amargo, el cual producía ligero picor.

Variable 2. Identificación de los compuestos y tamizaje fitoquímico presentes en el aceite esencial de *Thymus Vulgaris*

Análisis cualitativo por espectroscopia IR del aceite esencial de tomillo.

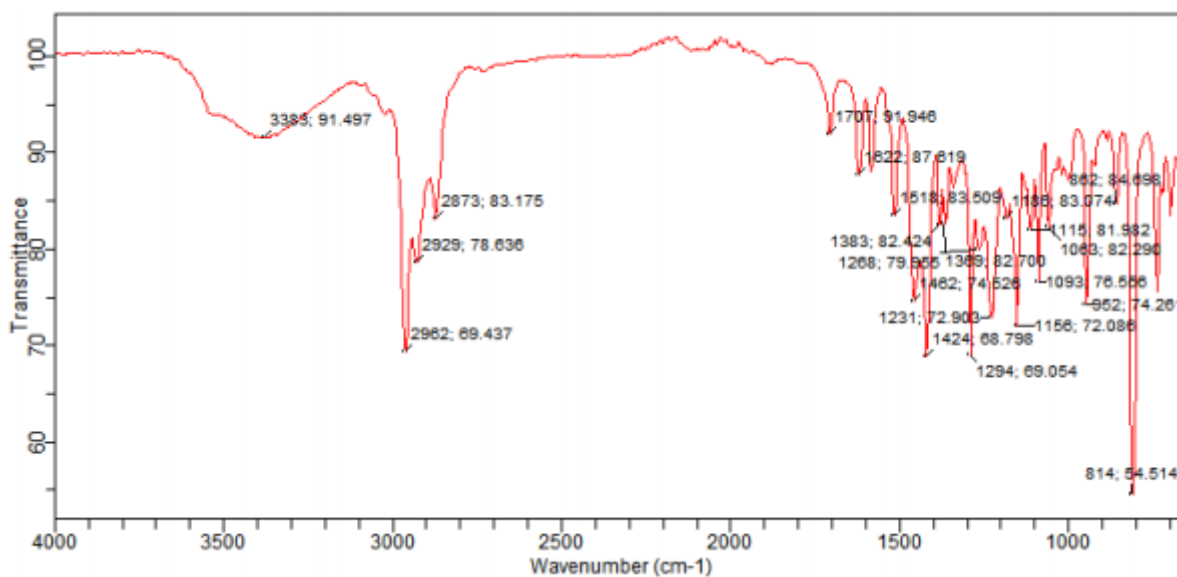
De las señales obtenidas en los respectivos IR, se procedió a enlistarlas, clasificándolas según el grupo funcional y el rango aproximado de la señal teórica de los autores Pavia, Lampman, Kriz, Vyvyan. (2013). Una vez identificadas, se procedió a sobreponer la imagen para corroborar la similitud en los resultados y las posibles diferencias en las señales obtenidas.

Figura 20: Espectro Infrarrojo Obtenido de una Muestra Control UIA



Nota: elaboración propia.

Figura 21: Espectro Infrarrojo Obtenido de una Muestra del Aceite esencial de Tomillo



Nota: elaboración propia.

Tabla 6: Señales Obtenidas por Medio del Espectro Infrarrojo, según Grupo Funcional, Rango E Intensidad Teórico

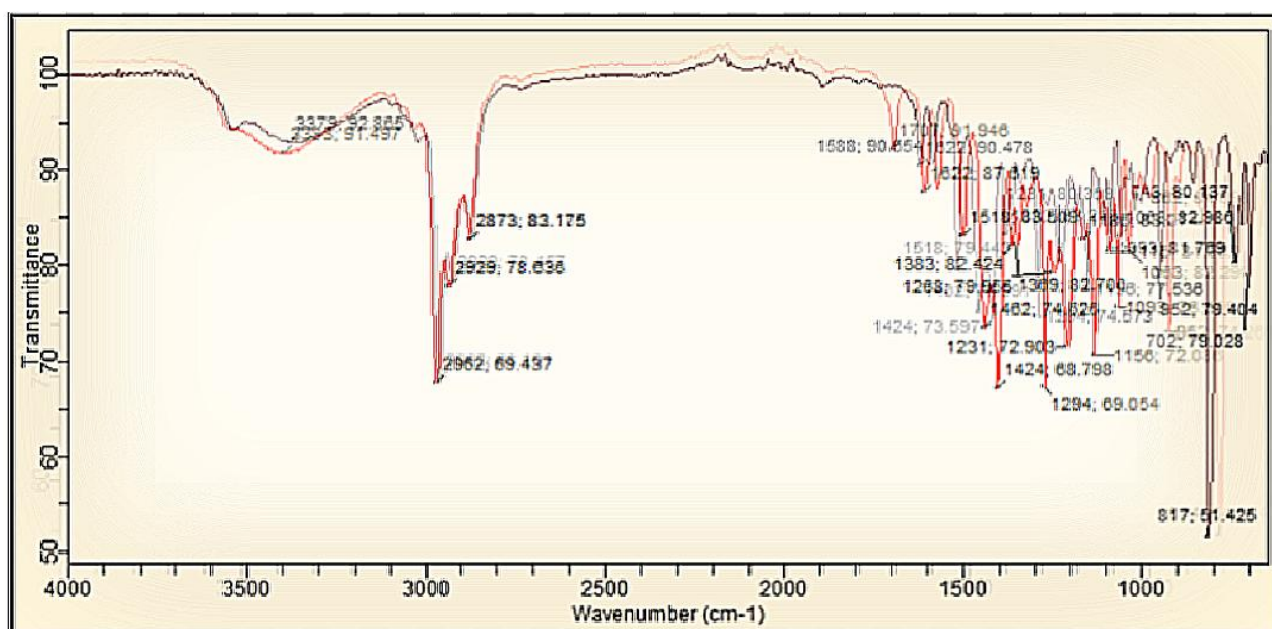
Tipo de muestra	Señal detectada (cm⁻¹)	Grupo funcional correspondiente	Rango aproximado de la señal teórico (cm⁻¹)	Intensidad de la señal teórico
Aceite esencial de tomillo	3383	O-H fenol estiramiento	3200-3650	M
Aceite esencial de tomillo	2982	C-H alcano estiramiento	3000-2850	S
Aceite esencial de tomillo	2929	C-H alcano estiramiento	3000-2850	S
Aceite esencial de tomillo	2873	C-H alcano estiramiento	3000-2850	S
Aceite esencial de tomillo	1424	CH ₂ flexión sp ³	1450	M
Aceite esencial de tomillo	1294	C-O alcohol	1300-1000	S
Aceite esencial de tomillo	1156	C-O fenol estiramiento	1260-1000	m-s
Aceite esencial de tomillo	1093	C-O-H flexión	1440-1220	m-s
Aceite esencial de tomillo	952	Aromático flexión	900-690	m-s

Tipo de muestra	Señal detectada (cm ⁻¹)	Grupo funcional correspondiente	Rango aproximado de la señal teórico (cm ⁻¹)	Intensidad de la señal teórico
Aceite esencial de tomillo	814	Aromático flexión	900-690	m-s

Nota: Introduction to spectroscopy (2013).

Según los datos obtenidos en la tabla anterior y la figura, se puede observar que se obtuvieron varias señales que coinciden entre sí, corroborando la presencia de los principales componentes del aceite esencial de tomillo, como lo son el timol y el carvacrol, esto al hallarse compuestos fenólicos y aromáticos, a los que se les atribuye en gran medida la propiedad antibacteriana.

Figura 22: Superposición de IR Obtenidos



Nota: elaboración propia.

Como se pudo observar en el espectro IR, a los 3383 cm⁻¹ se presenta una señal de estiramiento de C-H para el carbono sp² correspondiente al O-H característico del grupo fenol

presente en la molécula del timol y carvacrol, la cual es una de las señales más amplias e intensas, la región característica de este grupo corresponde a $3650\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$.

Las señales detectadas en 2982 cm^{-1} , 2929 cm^{-1} , 2873 cm^{-1} corresponden a un C-H alcano estiramiento, caracterizado por presentarse en el rango de $3000\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$, característico de la presencia de un flavonoide en la estructura.

En el espectro IR, realizado a la muestra aceite esencial de *Thymus Vulgaris* figura 21, se puede observar la presencia de una señal en 1588 cm^{-1} , la cual no se muestra en el IR realizado a la muestra control UIA como se observa en la figura 22 en la sobreposición de los IR, la cual corresponde a la tensión C=C de un anillo aromático, al ser una de las regiones de absorción característica de este grupo funcional de $1600\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$.

Característico del grupo funcional flavonoide, se detectó la señal correspondiente al movimiento intermolecular CH₂ de tipo de flexión a un valor de 1424 cm^{-1} , el cual se acerca al valor del carbono sp³, el cual es 1450 cm^{-1} .

Las señales detectadas en 1294 cm^{-1} y 1156 cm^{-1} corresponden a banda de estiramiento de C-O en el espectro a $1260\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, puede usarse para asignar una estructura primaria, secundaria o terciaria a un alcohol.

Se puede observar también una señal en 1093 cm^{-1} , lo que corresponde a la flexión C-O-H, pues la región de $1150\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ es característica de este grupo funcional.

Se detectaron dos señales, una a 952 cm^{-1} y la segunda a 814 cm^{-1} , estas señales pueden ser muy útiles para asegurar el patrón de sustitución de anillos, destacan los picos de flexión planos que aparecen en el rango $900\text{-}690$ los anillos aromáticos.

Análisis de los componentes del aceite esencial del *Thymus Vulgaris* mediante cromatografía de gases acoplado a un detector de masas.

Para comprobar la presencia de los componentes del tomillo se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS), siendo una opción confiable y eficaz para obtener la composición real del aceite esencial de *Thymus Vulgaris*.

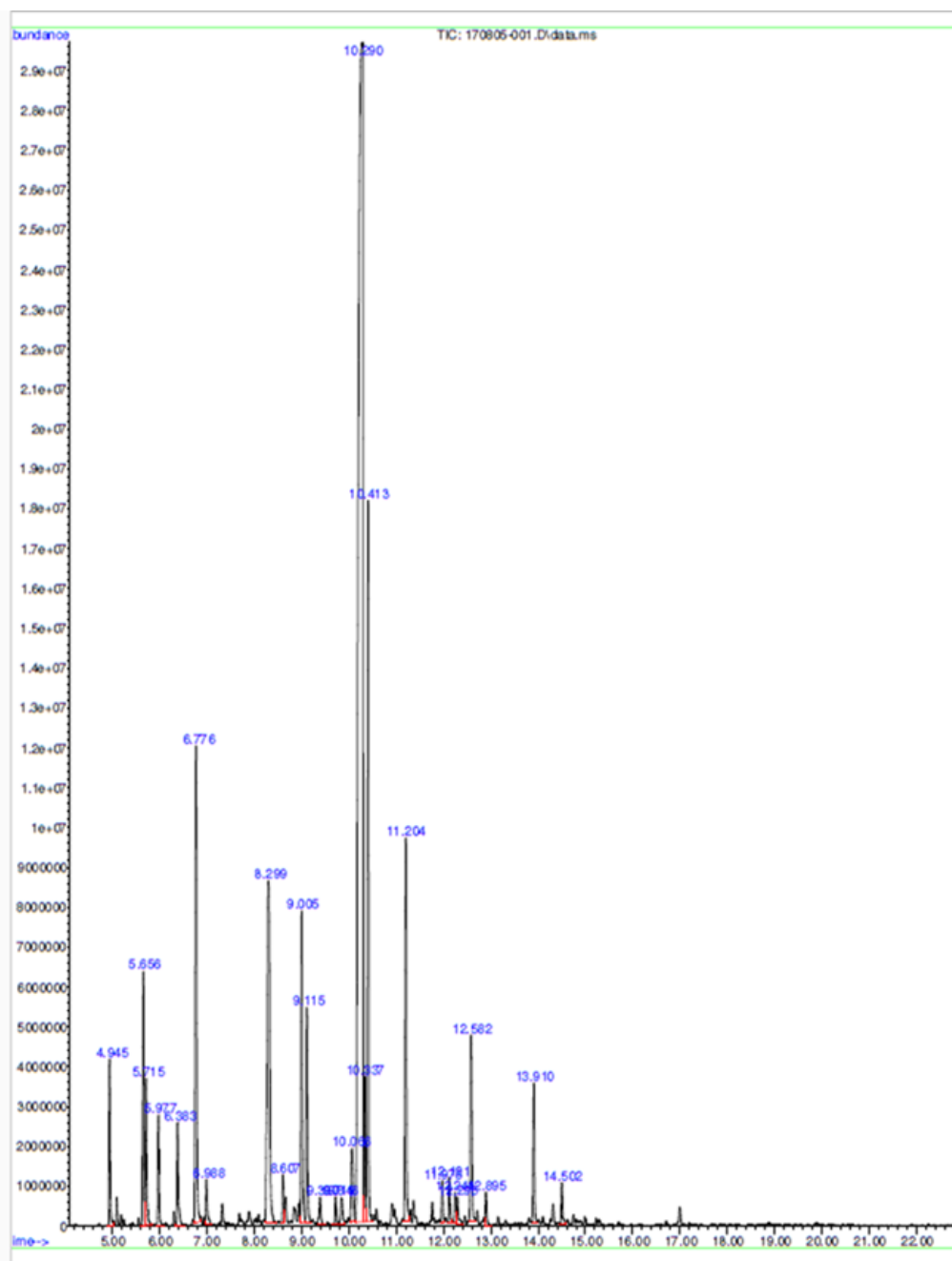
El análisis por espectrometría de masas fue realizado por el Laboratorio de Análisis de Residuos de Plaguicidas (Larep) del Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas (Iret-UNA) de la Universidad de Nacional, al aceite esencial obtenido, como se muestra en la figura 24, obteniendo un total de la composición porcentual de 27 componentes encontrados en el aceite esencial de *Thymus Vulgaris*.

De acuerdo con la literatura se comprueba en el análisis elaborado la presencia de los componentes habituales en el aceite esencial de *Thymus Vulgaris*, 1-octen-3-ol (1.7%), p-cimeno (2.7%), carvacrol (1.2%), linalol (6.2%), timol (47.1%), γ -terpineno (1,2%), borneol (7.7%), acetato de bornilo (0.4%), α y β -terpineol (0.6 y 1.2% respectivamente), β -cariofileno (4.8%), α -cadineno (2.7%), alcanfor (7.7%), entre otros.

Del análisis GC-MS, se determina, que efectivamente el aceite esencial obtenido de la parte aérea de tomillo posee un elevado porcentaje de timol (47.1 %), componente al cual se asocia la mayor actividad antibacteriana.

El resto de componentes, en composición porcentual minoritaria, corresponden a estructuras principalmente de terpenos, los cuales, contribuyen con la actividad biológica del aceite esencial extraído de *Thymus Vulgaris*.

Figura 23: Cromatografía de Gases (GC) Acoplado a un Detector de Masas (MS)



Nota: Laboratorio De Análisis De Residuos De Plaguicidas, UNA

Análisis de Barrido Compuestos Orgánicos GC-MS en la Muestra del Aceite Esencial de Tomillo.

Figura 24: Barrido de Compuestos Orgánicos GC-MS en la Muestra del Aceite Esencial de Tomillo.

Código laboratorio				17-395
Código original				M1
Tipo de muestra				aceite esencial de tomillo
Nombre del compuesto	#CAS	Tiempo de retención	Certeza de identificación*	% área
1-octen-3-ol	3391-86-4	4,95	xx	1,7
p-cimeno	99-87-6	5,68	x	2,7
eucaliptol	470-82-6	5,71	xx	1,7
y-terpinene	99-85-4	5,98	xx	1,2
trans-β-Terpineol	7299-40-3	6,38	x	1,3
β-linalool	78-70-6	6,78	xx	6,2
cis-β-Terpineol	7299-41-4	6,99	xx	0,6
alcanfor	464-49-3	8,26	xx	7,7
borneol	10385-78-1	8,33	xx	
α-Terpineol	98-55-5	8,61	x	0,6
timol metil éter	1076-56-8	9,00	x	3,6
timol metil éter	31574-44-4	9,11	x	2,3
trans geraniol	106-24-1	9,39	x	0,4
borneol acetato	76-49-3	9,72	x	0,4
borneol acetato	76-49-3	9,85	x	0,5
timol	89-83-8	10,07	x	1,3
timol	89-83-8	10,29	x	47,1
carvacrol	499-75-2	10,34	x	1,2
iso-timol	499-75-2	10,41	x	8,0
β-cariofileno	87-44-5	11,20	x	4,8
α-amorfano	483-75-0	11,97	x	0,5
geraniol propionato	105-90-9	12,12	x	0,5
β-bisaboleno	495-61-4	12,24	x	0,4
α-murolene	10208-80-7	12,29	x	0,4
α-cadineno	39029-41-9	12,58	x	2,7
calameneno	483-77-2	12,89	x	0,4
cariofileno oxide	1139-30-6	13,91	x	1,7
y-murolano	30021-74-0	14,50	x	0,5
% total del area identificada: 100,0				

* certeza de la identificación:

xx : alta similitud con el espectro en la base de datos de espectro de MS NIST 08

x : media similitud con el espectro en la base de datos de espectro de MS NIST 08

Resp: Clemens Ruepert



Nota: Laboratorio De Análisis De Residuos De Plaguicidas, UNA

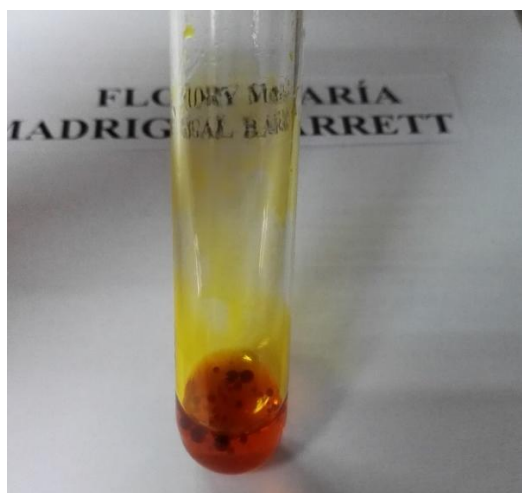
Reacciones de caracterización para el tamizaje fitoquímico.

Tabla 7: Resultados de las Pruebas de las Reacciones de Caracterización para el Tamizaje Fitoquímico

Tipo de reacción	Componente	Observación	Resultado
Prueba de Dragendorff.	Alcaloides	Precipitado color ladrillo	Positivo
Prueba de tricloruro de hierro	Fenoles	Coloración verde oscura	Positivo
Prueba de Mayer	Alcaloides	Turbidez	Positiva
Prueba de Libermann-Burchard.	Terpenos	Coloración purpura	Positivo
Prueba de Espuma	Saponinas	No se observó ningún cambio	Negativo
Prueba de Shinoda	Flavonoides	Coloración anaranjada	Positivo

Nota: elaboración propia

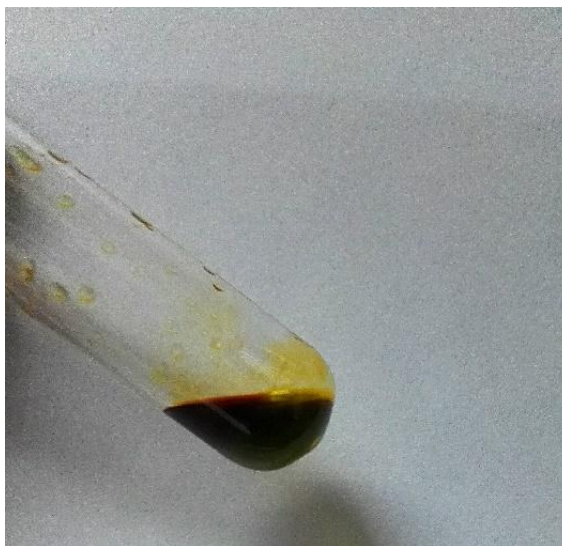
Figura 25: Identificación de alcaloides: Ensayo de Dragendorff



Nota: elaboración propia.

Se determina que existe la presencia de alcaloides en el aceite esencial, ya que se observa la presencia de un precipitado anaranjado.

Figura 26: Identificación de Fenoles: Prueba de Tricloruro de Hierro



Nota: elaboración propia.

Para la prueba de identificación de fenoles, se espera un cambio de coloración verde, la cual indica la presencia de un derivado de catecol o una coloración azul de un derivado de prirogolol, siendo la coloración verde la que se pudo observar durante la prueba, confirmando la presencia de fenoles en el aceite esencial de *Thymus Vulgaris*.

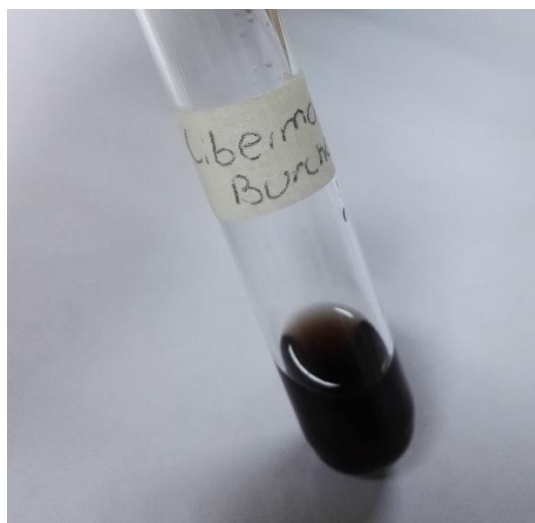
Figura 27: Identificación de Alcaloides: Prueba de Mayer



Nota: elaboración propia.

El reactivo de Mayer se emplea para la caracterización no específica de alcaloides, en el caso de esta reacción con el aceite esencial de *Thymus vulgaris*, se observó la formación de una turbidez blanquecina.

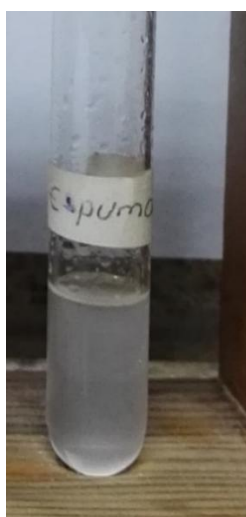
Figura 28: Identificación de Terpenos: Prueba de Libermann- Burchard



Nota: elaboración propia.

En la Prueba de Libermann- Burchard, para la determinación de terpenos se observa resultados positivos, presentado una coloración púrpura al instante de adicionar ácido sulfúrico concentrado.

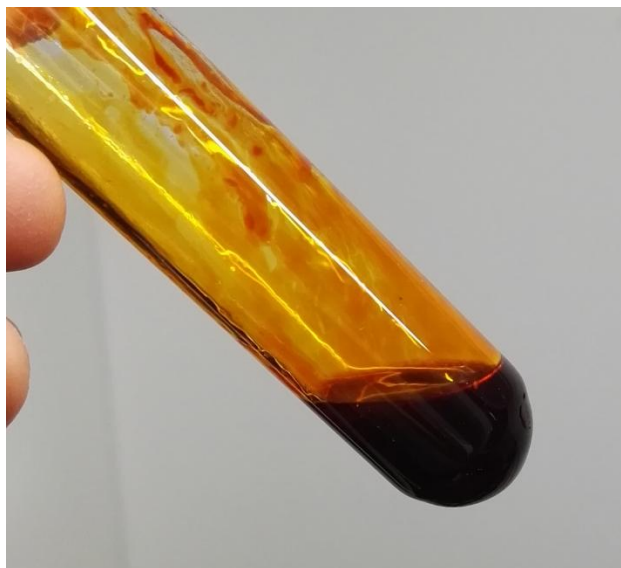
Figura 29: Identificación de Saponinas: Prueba de Espuma



Nota: elaboración propia.

El resultado esperado para esta prueba era la presencia y permanencia de una capa de espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de espesor, posterior a una agitación constante, sin embargo, no se presentó ningún cambio, posiblemente debido a que la presencia de saponinas en la planta de *Thymus Vulgaris* es mínima y los constituyentes mayoritarios son los flavonoides y fenoles.

Figura 30: Identificación de Flavonoides: Prueba de Shinoda



Nota: elaboración propia.

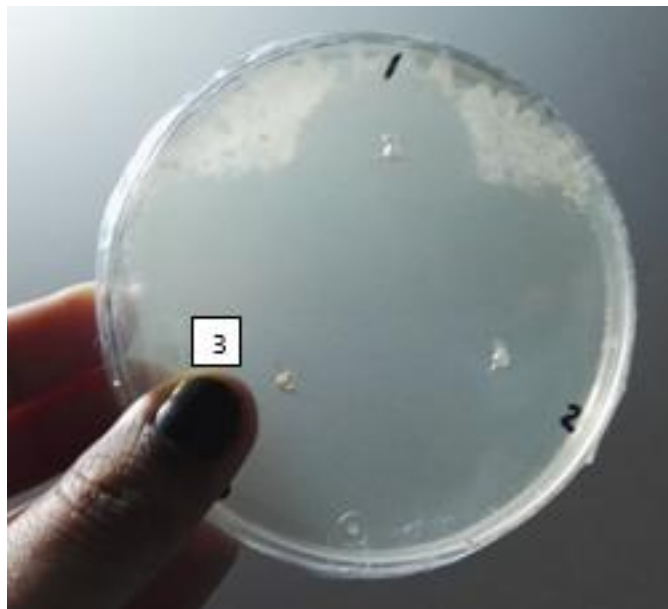
La coloración obtenida es característica de una reacción de Shinoda, en la cual al adicionar la virutas de magnesio al aceite esencial obtenido en medio ácido, se presenta una coloración anaranjada.

Variable 3. Evaluación de la capacidad antibacteriana del aceite esencial de tomillo frente a *Thymus Vulgaris*

Para el desarrollo de esta evaluación antibacteriana, se utilizó el cultivo fresco de la Cepa *Staphylococcus aureus*, se replicó durante 24 hora previas a su uso y se procedió a la siembra en medios de cultivo Mueller-Hinton, en el cual se colocaron las diferentes muestras en cada hoyo para determinar la formación de halos.

Posterior a las 24 horas de incubación, a una temperatura controlada de 35°C, se observó el desarrollo de los halos de inhibición microbiana en el medio de cultivo.

Figura 31: Formación de los Halos de Inhibición Obtenidos en el Medio de Cultivo Mueller-Hinton Impregnados con las Diferentes Muestras



Nota: elaboración propia.

Tabla 8: Resultados de la Formación de los Halos de Inhibición Formadas con las Diferentes Muestras Evaluadas

Muestra	Muestra inyectada	Medida del halo de inhibición
1	Cetraxal Otico® (Ciprofloxacino)	3cm
2	Control UIA	6cm
3	Aceite esencial de Thymus Vulgaris	7cm

Nota: elaboración propia.

Como se pudo observar en la figura 31, las tres muestras colocadas en la placa presentaron una actividad antibacteriana positiva sobre el *Staphylococcus aureus*, se observa la formación de halos de inhibición de gran tamaño ejerciendo una acción irreversible sobre la bacteria estudiada.

En la tabla, se puede observar la medición de los halos de las respectivas muestras, siendo el Cetraxal Otico® el que presentó un menor tamaño en el diámetro, este fue de 3 cm, este antibiótico se utilizó como referencia para la comparación de los resultados del aceite esencial, esto debido a que el mecanismo de acción de este fármaco interfiere en la replicación de ADN bacteriano por inhibición de la ADN-girasa y topoisomerasa IV bacterianas. Para el control UIA se obtuvo un valor de 6 cm y para el aceite esencial de *Thymus Vulgaris* un valor de 7 cm, comprobando la potente actividad bactericida que según la literatura se puede encontrar en el aceite esencial de tomillo.

Prueba de la catalasa.

Figura 23: Resultado de la Prueba de Catalasa



Nota: elaboración propia.

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición del agua oxigenada en agua y oxígeno; se utiliza para diferenciar los estafilococos (catalasa positiva) de los estreptococos (catalasa negativa).

Mediante esta prueba, se comprobó la presencia de esta enzima en la muestra, observando que, al momento de adicionar la gota de agua oxigenada, se dio la formación de burbujas y liberación de oxígeno como se observa en la figura 32.

Evaluación de la actividad antibacteriana del gel antibacteriano elaborado.

Tabla 9: Actividad Antibacteriana del Cetraxal Otico® contra el Gel Antibacteriano.

Muestra inyectada	Medida del halo de inhibición
Cetraxal Otico® (Ciprofloxacino)	3cm
Gel antibacteriano 2%	0.5cm

Nota: elaboración propia.

Figura 24: Cetraxal Otico® Contra el Gel Antibacteriano Elaborado



Nota: elaboración propia.

Una vez finalizada la elaboración del gel que se describe más adelante, se procedió a evaluar la actividad antibacteriana en las mismas condiciones de incubación de las placas antibacterianas, esta muestra fue comparada contra el Cetraxal Otico® como muestra control, valorando la posibilidad de una alternativa para el tratamiento, obteniendo los resultados positivos, el tamaño de halo de inhibición Cetraxal Otico® fue mayor que la de gel elaborado, el gel elaborada al 2% presento una actividad formando un halo de 0.5cm esto se pudo deber a que la concentración del aceite esencial en la formulación debió de estar en mayor porcentaje para una mejor inhibición.

Variable 4. Formulación de gel antibacterial a partir del aceite esencial de tomillo

En la siguiente tabla, se muestra los excipientes utilizados para parte del proceso para la formulación del gel antibacteriano y en la figura, se puede observar el proceso de desarrollo del gel.

Tabla 10: Elaboración del Gel Antibacteriano de Tomillo

Materias primas	Cantidad
Carbopol	0.75%
Propilengicol	10%
Propilarabeno	0.05%
Metilparabeno	0.15%
Glicerina	12%
Trietanolamina (TEA)	10 gotas

Materias primas	Cantidad
Aceite esencial de tomillo	2%
Agua csp	100%

Nota: elaboración propia.

Figura 25: Proceso de la Formulación del Gel Antibacteriano



Nota: elaboración propia.

Tabla 11: Características Organolépticas del Gel Antibacteriano

Propiedades físicas	Gel antibacterial
Color	Blaquecino
Textura	Suave y de fácil aplicación

Propiedades físicas	Gel antibacterial
Olor	Agradable a tomillo
pH	6

Nota: elaboración propia.

Para la elaboración del gel antibacteriano fue necesario mantener una agitación constante en cada una de las mezclas y pasar por un colador pequeño los excipientes sólidos, con el fin de eliminar la formación de grumos que pudieran evitar la homogeneidad de la formulación, una mala textura o una separación de fases al poco tiempo de elaborada.

Obteniendo, finalmente, un gel que presentaba un aroma suave, una textura agradable al momento de la aplicación, ya que no dejaba una sensación grasosa a pesar del uso de un porcentaje de glicerina, un pH de 6 y su secado fue rápido, dejando una sensación de frescura posterior a la aplicación.

Envase primario del gel antibacteriano.

Figura 26: Recipiente Cosmético, Vidrio Ámbar 20 ml



Nota: elaboración propia.

Tomando en cuenta las características físico-química del principio activo (aceite esencial del tomillo), se eligió un recipiente color ámbar, ya que este aceite esencial es fotosensible y al no almacenarlo en un recipiente adecuado, con el tiempo se podría descomponer y dejar de hacer el efecto deseado.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Una vez finalizada la investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

- El método idóneo para la realización del aceite esencial del aceite esencial de tomillo es el arrastre de vapor, ya que permite aislar los componentes principales de la planta, obteniendo una mezcla inmiscible en agua con un volumen total de 300-400 ml.
- Se debe realizar un proceso de separación de fases mediante extracciones repetitivas con un solvente no polar o poco polar como el diclorometano, que permitió aislar el aceite esencial del agua debido a la diferencia de densidades de los dos líquidos y una posterior eliminación de tazas de agua con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).
- Para la eliminación del solvente, se utilizó el equipo rotavapor y el proceso de secado por baño maría a una temperatura entre 40-42 °C, esto debido a que el punto de ebullición de diclorometano corresponde a 39.6 °C, permitiendo de esta manera, la eliminación total del solvente y obteniendo un volumen de 4 ml de aceite esencial puro con un pH de 5.
- La identificación de los metabolitos activos presentes se realizó por medio de pruebas de las reacciones de caracterización para el tamizaje fitoquímico, permitiendo corroborar la presencia de fenoles, flavonoides, alcaloides, y terpenos. La reacción de identificar saponinas fue negativa esto debido a una presencia poco significativa en el aceite esencial.
- Otras de las técnicas utilizadas para la identificación de los componentes del aceite esencial fue el análisis por espectroscopia infrarrojo IR que detectó la presencia de fenoles como era de interés el timol, el cual presentaba una señal bastante amplia, además de flavonoides, anillos aromáticos y alquenos.
- Al comparar los resultados de los IR realizados, una señal que apareció en la sustancia control no se presentó en el aceite esencial obtenido correspondiente a una señal de un anillo aromático.
- De la muestra analizada por GC- MS de aceite esencial de tomillo se obtuvo un porcentaje de área de 47,1% de timol y de 1,2% de carvacrol.
- Se efectuaron pruebas microbiológicas, para evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial por medio de la formación de halos de inhibición en las placas bacterianas, cuyos resultados fueron positivos en la inhibición de la bacteria, presentando un mejor resultado en

el halo de inhibición el aceite esencial de tomillo, el cual fue de 7 cm contra la sustancia control que fue de 6cm y el antibiótico utilizado con un halo de inhibición de 3cm.

- Se identificó la presencia de estafilococos en las placas de cultivos, al identificarlos con la prueba de catalasa positiva, en la cual se logró observar una formación abundante de espuma y liberación de oxígeno.
- Se compara la actividad antibacteriana del gel contra el antibiótico comercial y como resultado se obtiene un halo de inhibición de 0.5cm desarrollado por el gen antibacteriano elaborado con aceite esencial de tomillo.
- Con el aceite esencial obtenido de tomillo, se elaboró un gel antibacteriano, que presentaba características organolépticas deseadas y agradables al ser aplicado en la piel, el aceite esencial de tomillo se adaptó de una forma adecuada a la formulación.

Recomendaciones

- Una de las características que presenta el aceite esencial de tomillo es la fotosensibilidad, por lo que desde el proceso de extracción es necesario protegerlo de la luz con papel aluminio y almacenarlo en recipientes color ámbar o cubiertos de igual manera con papel aluminio.
- Para analizar las muestras por espectroscopia infrarroja es necesario eliminar cualquier traza de agua para que no interfiera en el análisis.
- A nivel de la identificación de estructuras funcionales, podría implementarse la técnica de cromatografía para aislar los componentes principales.
- Con respecto a las pruebas microbiológicas, se podría evaluar la actividad del aceite esencial ante otros agentes patógenos que sean importantes para la salud de la población.
- Además de elaborar un gel con una concentración mayor para determinar si es factible la actividad inhibitoria de la forma farmacéutica.
- En el momento de elaborar el gel, se recomienda pasar por un colador los excipientes sólidos, esto con la finalidad de obtener una mezcla homogénea y agradable a la hora de ser aplicada.
- Promover un mayor empleo de sus metabolitos secundarios, para permitir el desarrollo de productos en la industria farmacéutica por sus respectivas propiedades terapéuticas.

Referencias

- Alcalay, R. (2016). ¿Qué es Fitoterapia? Sociedad Española de Fitoterapia. Recuperado de www.sefit.es/que-es-fitoterapia/.
- Acosta, M, y Céspedes, Z, (2004). Actividad antibacteriana de los aceites esenciales derivados del tomillo y el orégano. (Tesis de licenciatura no publicada). Universidad de Iberoamerica, Costa Rica.
- Alonso, J. (2017). Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Buenos Aires, AR: Corpus Editorial, 2007. ProQuest ebrary. Web. 25 March 2017. Recuperado de <http://site.ebrary.com/lib/bibliouiasp/reader.action?docID=11087865>
- Cervantes E, García R, y Salazar P (2014), Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab; 61 (1): 28-40. Recuperado en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>.
- Díaz, L (2015). Alternativas no tradicionales para el control del biofilme dental: sustancias alternativas con acción antibacteriana para la desinfección de cavidades: sustancias alternativas con acción antimicrobiana para la elaboración de desinfectantes de cavidades a partir de macadamia (*Macadamia integrifolia*) y tomillo (*Thymus Vulgaris* L..) (Tesis de Licenciatura). UCR, Costa Rica.
- Estrada, S. (2010). Determinación de la actividad Antibacteriana IN VITRO de los aceite esenciales de romero (*Rosmarinus Officinalis*) y tomillo (*Thymus Vulgaris*). (Tesis de Licenciatura) Ecuador. Recuperado de <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/699/1/56T00229.pdf>
- García, C, y García. O. (2014). Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de tomillo (*Thymus Vulgaris*) y propuesta de la elaboración de una presentación Farmacéutica que

- actúe a nivel de piel. (Tesis de Licenciatura no publicada). Universidad de Iberoamérica, Costa Rica
- García M, y Palou, E. (2008). Mecanismo de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre mecanismos de interés en alimentos. Recuperado de [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2\(2\)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2(2)-Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf).
- Gennaro, A. (2003). Remington: Farmacia - Volumen 1 p: 846, Ed. Médica Panamericana.
- Recuperado de https://books.google.co.cr/books?id=Av4IIIsyH-qcC&pg=PA846&dq=forma+farmaceutica+enjuague+bucal&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=forma%20farmaceutica%20enjuague%20bucal&f=false
- Hernández R, Fernández, C y Baptista, L. (2014). Metodología de la investigación. México: Mac Graw Hill.
- León. J y Ulate F. (2013). Formulación de un enjuague bucal a base de aceites esenciales de tomillo y clavo de olor con propiedades antimicrobianas. (Tesis de licenciatura no publicada) Universidad de Iberoamérica, Costa Rica
- López, L. (2006) Tomillo propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas. Rev Of Farm; 25: pp.74- 77.
- Manzo, G, Flores, H, y Padilla, M (2014) Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo, México. Rev Biomed 25:129-143. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2014/bio143d.pdf>

Mendoza, N. Editorial Medica Panamericana. (2008). Farmacología medica / Medical Pharmacology, México.

Muñoz, F. (2002). Plantas medicinales y aromáticas estudio, cultivo y procesado. Madrid, España: Mundi-Prensa.

Natural Resources Conservation Service “plants database” (2017), *Thymus vulgaris* L. garden thyme recuperado en: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=THVU>

Organización Mundial de la Salud. (2013) Estrategias de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Recuperado de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf?ua=1

Pavia, D, Lampman, G, Kriz G, y Vyvyan, J. (2013). Introduction to spectroscopy. Estados Unidos. Cengage Learning.

Peredo H, Palou, E, y López, A. (2009) Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas selectos de ingeniería de alimentos 3-1 p: 24-32. Recuperado de [www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)

Reyes, F, López, A, y Palou. E. (2016). Antimicrobial Activity of Individual and Combined Essential Oils against Foodborne Pathogenic Bacteria (actividad antimicrobiana de los aceites esenciales individuales y combinados contra bacterias patógenas transmitidas por los alimentos) Journal of Food Protection, Vol. 79, No. 2, pp 309-315.

Rivas, C, Oranday, M, Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Book Google, México, Omniscience. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/316860979_investigacion_en_plantas_de_importancia_medica

Rodríguez, K. (2012). Formulación de un ungüento y un gel a base del aceite esencial natural de *Oreganum Vulgare* y de *Thymus Vulgaris* para el tratamiento complementario del síndrome de la piel escaladada estafilocócica.

Rojas, J; Ortiz Sánchez, J; Jáuregui, J; Ruiz, J; y Almonacid, R. (2015). Aceite esencial de *Thymus vulgaris* L (tomillo), su combinación con EDTA contra *Candida albicans* y formulación de una crema. *Anales de la Facultad de Medicina*, vol. 76, núm. 3, pp. 235-240. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37942607002>

Segura S, y Torres J. (2009) *Historia de las plantas en el mundo antiguo*. Universidad de Deusto; Consejo Superior de Investigaciones Científicas. p, 348.

Souza L, Frascolla R, Santin, R, Ziemann dos Santos M; Costa R, Alves MR, Damé L Schuch, y Araújo M.C (2008), Actividad de aceite esencial s de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa, *Cubana Plant Med* v.13 n.4, recuperado: SCIELO ISSN 1028-4796 (http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400003)

Spectral Database for Organic Compounds SDBS (2017) Recuperado de http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

Ugalde M, Cezaro A, Cenci A, Claudio V, Paroul N, Toniazzi G, Steffens J, y Cansian, R. (2016). Bacterial and Antioxidant Activity of Commercial Essential Oils of Rosemary, Clove, Oregano and Sage (Actividad antibacteriana y Antioxidante de los Aceites Esenciales Comerciales de Romero, Clavo de olor, orégano y salvia) *Rev. Cienc. Tecnol.* no.25 Posadas jun. 2016 ISSN 1851-7587. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S185175872016000100009

Vanaclocha. B, y Cañigüeral S. (2003). Fitoterapia, Vademécum de prescripción. Barcelona: Masson. Fitoterapia: definición, alcance y fuentes de información, parr 1 Recuperado de <http://www.sefit.es/que-es-fitoterapia/>

Vanaclocha B. (2003). Fitoterapia: Vademecum de prescripción. Barcelona, España: El sevier. Recuperado de https://books.google.es/books?id=K3V4p5Pj_dAC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbgbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Villegas. W, Acereto, P. y Vargas, M. (2006). Análisis Ultravioleta-visible. La Teoría y la Práctica en el ejercicio profesional.

Zambrano, M. (2014), Determinación de la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de tomillo (thymus vulgaris) en comparación con la nistatina y el gluconato de clorhexidina al 0,2% sobre cepas de Candida albicans. (Tesis de Licenciatura) Ecuador. Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2801/3/T-UCE-0015-85.pdf>

Anexo

Etiqueta.

Indicaciones: Antibacteriano.

Contraindicaciones: Personas con hipersensibilidad al aceite esencial de tomillo o cualquiera de sus componentes. Embarazo.

Instrucciones de uso: Lavarse las manos antes y después de la aplicación, aplicar dos o tres veces al día.

Precauciones: Sólo para uso externo. Manténgase lejos del alcance de los niños. Evitar contacto con los ojos.

Ingredientes: Aceite esencial de tomillo 2%, carbómero, parabenos, propilenglicol, glicerina, agua desionizada, trietanolamina.

Manténgase en un lugar fresco y alejado de la luz y el calor

Fabricado en Costa Rica por Mabanatural, Laboratorios S.A

ThymusGel
20 ml

