

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

CARRERA DE FARMACIA

**DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN FITOFARMACÉUTICA
ORAL NO ESTÉRIL (ENGUAJE BUCAL), A PARTIR DE LAS PARTES
AÉREAS DE DOS DROGAS VEGETALES TOMILLO (*THYMUS
VULGARIS L*) Y ORÉGANO (*OREGANUM VULGARE L*) EVALUANDO
LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA FRENTE A *CANDIDA ALBICANS***

Tesis para optar por el grado de Licenciatura

Sustentante:

Leidy Priscila Leiva Mora

Tutor:

Jorge Aguilar López

Lector:

Lic. Adam Amey Williams

San José, Costa Rica

Agosto, 2017

Contenido

Resumen.....	1
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	2
Planteamiento del Problema	2
Hipótesis	2
Objetivos.....	3
Objetivo General	3
Objetivos específicos.....	3
Justificación.....	4
Antecedentes.....	5
Proyecciones.....	9
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO.....	10
Fitoterapia	10
Fitofármaco	10
Planta Medicinal	10
Droga Vegetal	11
Metabolitos Secundarios	11
Principio Activo	11
Aceite Esencial.....	11
Cavidad Oral	11

Anatomía de la cavidad oral.....	12
Anatomía de la lengua.....	12
Micología	12
Hongos	13
Micosis oportunista	13
Candidiasis	13
Taxonomía	14
Morfología	14
Epidemiología	15
Manifestaciones clínicas	15
Lesiones Cutáneas.	16
Lesiones mucocutáneas.	16
Candidiasis generalizada.	16
Cultivo.....	17
Diagnóstico de laboratorio	17
Generalidades de las Plantas en estudio.....	17
Thymus Vulgaris (Tomillo)	17
Taxonomía.....	18
Descripción.....	18
Hábitat y distribución geográfica.	19

Partes medicinales de la planta y acción farmacológica.	19
Importancia en la medicina tradicional de <i>Thymus vulgaris</i> L.	19
Constituyentes del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L.	20
Análisis del aceite de tomillo.....	20
Actividad anti fúngica y antimicrobiana del tomillo.....	21
Otros usos y actividad biológica del tomillo.	21
Efectos secundarios.	22
Toxicidad.....	22
Orégano (<i>Origanum Vulgare</i> L).....	22
Taxonomía.....	22
Descripción.....	23
Partes medicinales.	23
Distribución y hábitat.	24
Constituyentes.	24
Usos medicinales.	24
Principales componentes químicos de los aceites	25
Métodos de extracción de los aceites esenciales.....	26
Hidrodestilación	26
Extracción con Soxhlet.....	27
Método Dean Stark.....	28

Identificación de compuestos.....	28
Prueba de Liebermann-Buchard.....	28
Cromatografía.....	29
La espectrometría de masas (MS).	30
Espectroscopia Infrarrojo (IR).....	30
Solubilidad de compuestos.....	32
Microbiología.....	33
Método del antibiograma disco-placa.	33
Concentración mínima efectiva.	33
Clasificación de la respuesta antimicrobiana:	33
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	34
Enfoque de la investigación	34
Diseño de la investigación	34
Objetos de estudio.....	34
Variables o Unidades de análisis de la investigación	34
Método de análisis	38
Instrumentos y Técnicas de recolección	38
Fase I. Adquisición de la materia vegetal:	39
Fase II. Extracción de los Aceites Esenciales:	39
Método por hidrodestilación.	39

Concentración y obtención del aceite esencial.....	42
Método Dean-Stark.	43
Fase III. Pruebas de Identificación de Compuestos	45
Espectroscopia IR.....	45
Cromatografía de gases acoplada a masas.	45
Prueba de Liebermann-Buchard.....	46
Fase IV. Pruebas Microbiológicas	47
Materiales, equipo y reactivos utilizados en la prueba microbiológica.	47
Procedimiento de la prueba microbiológica.....	48
Fase V. Formulación del Producto.....	49
Material y equipo utilizado para la preparación de un enjuague bucal anti fúngico.....	49
Procedimiento de la formulación.	50
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS	51
Extracción del aceite esencial de tomillo.....	51
Prueba cualitativa Liebermann-Bucher.....	52
Análisis cualitativo por espectroscopia infrarrojo de los aceites del tomillo y orégano.....	54
Análisis de cromatografía de gases acoplada a masas	57
Prueba de sensibilidad anti fúngica de los aceites esenciales de tomillo y orégano frente a <i>C. albicans</i>	59

Conclusiones63

Recomendaciones.....64

Referencias65

FIGURAS

Figura 1. <i>Cándida Albicans</i> en Mucosa Bucal	14
Figura 2. <i>C.Albicans</i> Levaduriforme Oval	15
Figura 3. <i>Thymus Vulgaris</i>	18
Figura 4. <i>Oreganun Vulgare L</i>	23
Figura 5. Estructura Química del Timol	25
Figura 6. Estructura Química del Carvacrol	26
Figura 7.Equipo de Hidrodestilacion Simple	27
Figura 8. Equipo de Extraccion Soxhlet.....	27
Figura 9. Equipo de Hidrodestilacion Acoplada a Trampa Dean-Stark	28
Figura 10. Reacción de Lieberman-Buchard.....	29
Figura 11.Espectroscopia Infrarrojo	31
Figura 12. Proceso de Hidrodestilación.....	40
Figura 13. Equipo Soxhlet para la Extracción Continua	42
Figura 14. Apariencia de los Aceites Esenciales Extraídos a Través de los Métodos Empleados	43
Figura 15. Equipo Utilizado para la Hidrodestilación Adaptado con un Aparato Dean-Stark .	44
Figura 16. Espectrofotómetro Infrarrojo Empleado en la Caracterización de las Muestras de Aceite Esencial de Óregano y Tomillo.....	45
Figura 17. Condiciones Cromatográficas Extractos Naturales Flash.....	46
Figura 18.Materiales y Reactivos Utilizados para la Prueba de Liebermann-Buchard.....	47
Figura 19. Cámara de Flujo Laminar	48
Figura 20.Equipo Empleado para la Elaboración del Enjuague Bucal Anti Fúngico	49
Figura 21.Material para la Formulación del Enjuague Bucal Anti Fúngico	50
Figura 22. Apariencia de la Forma Farmacéutica Desarrollada Enjuague Bucal.....	50
Figura 23. Espectro IR Obtenido de una Muestra del Extracto de Tomillo	54
Figura 24.Espectro IR Obtenido de una Muestra del Extracto de Orégano	54
Figura 25. Cromatograma de Gases Molécula de Timol Metil Éter	57
Figura 26 . Estructura Química Timol.....	58
Figura 27. Estructura Química del Éter de Metilo del Timol.....	58

Figura 28. Cromatograma de Gases Presencia de la Molécula de Eucaplitol	59
Figura 29. Halos de Inhibición Obtenidos con Diluciones al 75 % y 50 % del Aceite Esencial de Tomillo	60
Figura 30. Halos de Inhibición Obtenidos con Diluciones al 25 % ,12.5 % y 7.5 % del Aceite Esencial de Tomillo	60
Figura 31. Halos de Inhibición Obtenidos con Diluciones al 75 % y 50 % del Aceite Esencial de Orégano.....	61
Figura 32. Halos de Inhibición Obtenidos con Diluciones al 25 %,12.5 % y 7.5 % del Aceite Esencial de Orégano	61

TABLAS

Tabla 1. Frecuencia Aproximada a la que se Encuentra Algunos Grupos Funcionales Absorción IR	32
Tabla 2. Variables, Definición, Operacionalización e Instrumentalización	35
Tabla 3. Porcentaje de Rendimiento Obtenido Mediante Hidrodestilación, Trampa Dean-Stark y Soxhlet	51
Tabla 4. Resultados Obtenidos al Realizar la Prueba de Liebermann-Bucherl Utilizando el Aceite Esencial de Tomillo	52
Tabla 5. Señales Obtenidas en el Espectro IR de los Extractos de Tomillo, como los Grupos Funcionales Responsables de las Mismas, Así como la Región de Absorción Teórica Correspondiente de Cada Señal	55
Tabla 6. Señales Obtenidas en el Espectro IR de los Extractos de Orégano, como los Grupos Funcionales Responsables de las Mismas, Así como la Región de Absorción Teórica Correspondiente de Cada Señal	55
Tabla 7. Medidas Obtenidas de los Halos de Inhibición Formados por las Diluciones de los Aceites de Orégano y Tomillo a Diferentes Proporciones	62

Resumen

El desarrollo de este trabajo de investigación se basa en la determinación de la actividad anti fúngica de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris L*) y orégano (*Origanum vulgare L*) frente a la *Cándida albicans*, por ende, incorporarlos a una formulación fitofarmacéutica.

La *C.albicans* es un agente causal de diversas micosis superficiales oportunistas produciendo patologías como candidiasis oral, común en personas con un sistema inmunitario debilitado. Por lo tanto, es necesario y útil la búsqueda de nuevos agentes antimicóticos de origen natural.

Los aceites esenciales utilizados en el proyecto de investigación se obtuvieron de las hojas secas de las especies seleccionadas, utilizando un sistema de hidrodestilación, trampa Dean-Stark y soxhlet. Considerándose la técnica de trampa Dean-Stark la más favorable para la extracción y obtención de los aceites ya que proporciono un mayor porcentaje de rendimiento el cual fue de 0.71%, en comparación con los otros que mostraron valores de 0.27% y 0.12%.

Las técnicas empleadas para identificar los compuestos más relevantes de los aceites esenciales fueron el análisis de espectroscopia de infrarrojo, cromatografía de gases acoplado a masas, los cuales demostraron la presencia de los compuestos.

En el caso de las pruebas microbiológicas realizadas contra la *C.albicans* revelan un alto potencial antimicótico de ambos aceites, sin embargo, al comparar los extractos, el de orégano demuestra mayor actividad frente al hongo que el de tomillo.

Por otra parte se determinó la concentración mínima inhibitoria del orégano y tomillo necesario para realizar la formulación. Esto se realizó a través de la medición de los halos generados en los medios de cultivo empleando diferentes diluciones de los aceites. Estos reflejan que el orégano la concentración mínima inhibitoria será del 25% y la del tomillo del 50%.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del Problema

Las micosis son infecciones causadas por hongos, que se presentan tanto en ancianos como en adultos jóvenes e infantes. Estas son independientes de la edad y condición socioeconómica compartiendo la misma importancia médica de infecciones causadas por bacterias y virus.

Una de las patologías más comunes que presentan las personas es la candidiasis oral, siendo una infección asociada a la *Cándida albicans*. Este microorganismo conocido como un tipo de hongo oportunista, que forma parte normal de la micro biota humana en las vías respiratorias, cavidad bucal, sistema gastrointestinal y reproductor, no genera ningún tipo de complicación grave en individuos inmunocompetentes, pero sí puede aparecer en el momento donde nuestro sistema inmune recae, provocando serios problemas de salud tanto a nivel de mucosa como sistémico en el huésped (Rodríguez, Miranda, Morejón y Santana, 2002, párr. 2-3).

Según López, Dzul, Lugo, Arias y Zavala, (2016) en su estudio, una de las micosis oportunistas con mayor relevancia son las producidas por la especie de cándida, representando hasta un 80% de las infecciones intrahospitalarias observando así un incremento en los pacientes que no manifiestan respuesta positiva a los antimicóticos, generando mecanismos de defensa frente a estos, causado por su uso irracional (p.128).

Ante lo expuesto y conociendo que este es un problema de índole mundial según informes de la Organización Mundial de la Salud, (2000) en la creciente resistencia de los antimicrobianos dándose en hongos, bacterias, virus y parásitos.

La presente investigación muestra como principal interrogante. ¿Existe un efecto anti fúngico del aceite esencial de *Origanum Vulgare L* y *Thymus vulgaris L* sobre la “*C. albicans*”?

Hipótesis

El aceite esencial de la *T. Vulgaris* y *O. Vulgare L* presentan actividad antifúngica frente a la *candida albicans*.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la actividad antifúngica de los aceites esenciales extraídos de las partes aéreas de dos drogas vegetales tomillo (*T. vulgaris L*) y orégano (*O. vulgare L*) frente a *C. albicans*.

Objetivos específicos

Determinar la mejor técnica para la obtención del aceite esencial a partir de las partes aéreas de las dos drogas vegetales tomillo (*T. vulgaris L*) y Orégano (*O. vulgare L*).

Evidenciar la presencia de los componentes principales reportados para los extractos mediante análisis instrumental y pruebas de química líquida.

Evaluar el efecto anti fúngico *in vitro* del aceite esencial de *T. vulgaris L* y *O. vulgare L* frente a la *C. albicans*, mediante la medición de los halos de inhibición formados en el cultivo.

Justificación

La medicina es parte de la cultura, no hay pueblo que no haya desarrollado algún sistema de medicina y de prevención de las enfermedades, más concretamente sobre las causas de las afecciones, la manera de reconocerlas y diagnosticarlas, así como las formas o procedimientos para aliviar, curar o prevenir las enfermedades, además para preservar y promover la salud. Según la Organización mundial de la salud (1991-2002) la salud se denomina como un estado meramente de satisfacción tanto en el área físico, mental y social no solo se atribuye a la ausencia de afecciones o enfermedad.

El uso de las plantas medicinales es una práctica que se ha empleado desde la antigüedad, con el propósito curativo o preventivo de las enfermedades o sus síntomas. Durante mucho tiempo los remedios naturales fueron el principal recurso disponible, esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales, surgiendo así como una disciplina la fitoterapia. En todo el mundo, la medicina tradicional, complementaria o no convencional ha constituido un pilar importante en la prestación de servicios de salud. (García, Martínez, Ortega, y Castro, 2010, pp. 87-88).

Muchos países reconocen actualmente la necesidad de elaborar un enfoque coherente e integral de la atención de salud que facilite el acceso de la medicina tradicional de manera segura, respetuosa y efectiva, por lo que surge la estrategia de la OMS (2002-2005), que por su importancia fue actualizada para 2014-2023.

Actualmente, según la OMS (2000) alrededor de cuatro mil millones de personas, aproximadamente el 80% de la población mundial, utiliza las plantas para contrarrestar los efectos nocivos causados por una determinada afección. Basándose en conocimiento empírico asociado a los beneficios asumiendo como reales desde una perspectiva personal y se visualiza con el aspecto que expone el individuo con posterioridad del uso aplicado, siendo varias las razones por las que socialmente el uso de la medicina tradicional se torna de una manera atractiva y eficaz hacia la población mundial.

Por otra parte la frecuencia y la estadía de micosis invasora debido a hongos patógenos oportunistas han ido en aumento en las dos últimas décadas, demostrando una resistencia a los fármacos antimicóticos habituales. Se ha determinado que la especie del género *Cándida* constituye el grupo más importante, especialmente la *C. albicans*, responsable de infecciones bucodentales como la candidiasis oral e infecciones vaginales. (Murray, Rosenthal y Pfaller 2008, pp. 779-781).

Por lo tanto, hallar un efecto antimicótico positivo de los aceites esenciales del orégano y tomillo sobre la *C. albicans* serviría de apoyo para nuevos estudios y desarrollo de diferentes fitofármacos anti fúngicos con base en principios activos procedentes de plantas medicinales, generalmente son fáciles de adquirir y son abundantes en el país, permitiendo de esta manera la eliminación eficaz del hongo y mejorando los beneficios terapéuticos ofrecidos por los medicamentos habituales.

El desarrollo de la medicina tradicional costarricense necesita de estudios de investigación científica para demostrar el posible efecto farmacológico de las plantas y determinar las indicaciones, dosis, reacciones adversas, contraindicaciones y toxicidad de los extractos naturales. La medicina tradicional es una alternativa de elección para muchas personas dado que representa una opción de menor costo que los medicamentos sintéticos o semisintéticos comercializados.

La investigación busca proporcionar mayor conocimiento de las propiedades antimicóticas de los aceites esenciales de las partes aéreas de las dos drogas vegetales *T. Vulgaris L* y en *O. Vulgare L*. Con el fin de promover la realización de formulaciones fito farmacéuticas.

Antecedentes

La recolección de antecedentes internacionales como nacionales se realizó por medio de consultas a bases de datos especializadas como EBSCO y otros de acceso libre de índole científico; en antecedentes nacionales se consultó la base de datos de las diferentes

universidades tales como la Universidad de Costa Rica (UCR), la Universidad de Iberoamérica (UNIBE) y la Universidad Internacional de las Américas (UIA).

En Antecedentes Internacionales se encuentran varios artículos y trabajos de investigación relacionados con el uso y las propiedades medicinales de las dos plantas orégano y tomillo por estudiar.

El trabajo investigativo, el orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes de los autores Arcila, Loarca, Lecona y González, (2004) menciona que: El orégano posee una buena capacidad antioxidante y antimicrobiana contra microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre otros. Estas características son sumamente importantes para la industria alimentaria puesto que pueden favorecer la inocuidad y estabilidad de los alimentos como también protegerlos contra alteraciones lipídicas (párr. 1).

Por otra parte el artículo Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (2001), autores Albado, Saez y Ataucusi generalmente lo que realizan es la descripción de los principales grupos funcionales de la droga vegetal y es la extracción del principal componente del aceite esencial carvacrol para experimentalmente determinar su propiedad antiséptica, obteniendo como resultado sensibilidad contra los siguientes microorganismos: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella cholerae suis* y *Vibrio cholerae* y las bacterias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*.

Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales (2010), autores García, Martínez, Ortega y Castro investiga la relación entre los componentes químicos y las propiedades farmacológicas de ciertos extractos vegetales como son el de perejil (*Petroselinum sativum*), de la ruda (*Ruta graveolens*), del tomillo (*Thymus vulgaris*), de la gobernadora (*Larrea tridentata*) y de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y orégano (*Lippia graveolens*).

Las investigaciones anteriores proporcionan información tanto teórica como experimental de las propiedades, composición y actividad biológica del *Origanum vulgare L.*, contra

microorganismos patógenos especialmente el de interés *Staphylococcus aureus*, entre otros, lo cual es sumamente importante para el trabajo en proceso de investigación.

En el artículo “Evaluación del efecto antioxidante de aceites esenciales y extractos del *Eugenia caryophyllata*, *O. vulgare* y *T. vulgaris*” de los autores Cardona y Mejía (2009) se refiere al poder antioxidante y antimicrobiano de los distintas drogas vegetales y su actividad biológica. (pp. 58-70)

El trabajo de graduación Determinación de la actividad antimicótica in vitro del extracto de tomillo (*T. vulgaris*) en comparación con la nistatina y el gluconato de clorhexidina al 0.2% sobre cepas de *C.albicans* (2014), autor Inlago, se basa en una comparación entre productos ya existentes en el mercado y el extracto del tomillo, dando como resultado que el aceite esencial de tomillo al 75% presenta una actividad mayor al inhibir el crecimiento bacteriano al compararlo con el gluconato de clorhexidina al 0,2% y la nistatina al 0,2% que presenta una sensibilidad media (p.64).

En el caso de los antecedentes nacionales se encuentra seis investigaciones de las cuales se relacionan con el tema de estudio.

García y García (2014) estudiaron de forma experimental la actividad antimicrobiana del tomillo (*T. Vulgaris*) y propuesta de la elaboración de una presentación farmacéutica que actúe a nivel de piel, tesis realizada en la Universidad de Iberoamérica, la cual estudió experimentalmente la actividad antimicrobiana del aceite esencial del tomillo (*T. Vulgaris*) contra diferentes sepas patógenas procedentes de la American Type Culture Colection *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeuruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. Este trabajo demostró la funcionalidad antimicrobiana del aceite esencial contra los microorganismos antes mencionados, lo cual refleja la importancia para el trabajo de investigación (pp.3).

En el trabajo de graduación, Actividad antibacteriana de los aceites esenciales derivados del tomillo y el orégano (2004) los autores Acosta y Céspedes, hablan sobre comprobar la presencia de los distintos compuestos fenólicos encontrados en las dos plantas propuestas y su

potencial inhibitorio hacia el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, observando que extractos alcohólicos de los aceites esenciales derivados de las plantas producen sensibilidad a los microorganismos en estudio. Esta tesis es de suma importancia para poder analizar los métodos de identificación de uso para los compuestos hallados en los aceites esenciales y su potencial inhibitorio a los tres microorganismos descritos.

Alternativas no tradicionales para el control de biofilme dental: enjuagues bucales y desinfectantes de cavidades (2012) autores Ballesteros, Valverde, Madrigal, Rojas, Romero, es una investigación realizada en la facultad de Odontología, de la Universidad de Costa Rica. En ella los autores hablan del área de la salud oral y de nuevas sustancias naturales con propiedades antibacterianas como lo son la Albahaca y el Orégano, realizando una comparación de extractos de dichas plantas contra los productos bucales ya existentes en el mercado (clorhexidina), dando un resultado mayormente positivo para los extractos naturales en el control del biofilme dental, lo cual expresa la importancia de esta investigación para el presente trabajo de graduación (pp.15).

En el trabajo de investigación efectuado por Rodríguez y Flores, (2012): Determinación de nuevos compuestos con potencial bacteriostático y antihelmíntico en *Chenopodium ambrosioides* (apazote), evalúan los aceites esenciales de apazote, tomillo (*T. vulgaris*) y orégano (*Lippia graveolens*) por cromatografía de capa fina con fase estacionaria de sílica gel, todas mostraron presencia de compuestos fenólicos a los que se le atribuyen el potencial bacteriostático, se puede resumir que la importancia para la presente tesis es el método de estudio de los componentes de las plantas, cromatografía de capa fina (pp.6).

Elaboración de una tintura para el tratamiento de la tiña con base en extractos de Juanilama (*Lippia alba*) y Orégano (*Lippia graveolens*) y estudio fitoquímico de su actividad anti fúngica, (2011) autor Morales, comenta sobre los distintos métodos de extracción del aceite esencial del orégano utilizado para la elaboración de la tintura y de las actividades biológicas que esté presente contra hongos. Este antecedente es importante para el presente trabajo ya que utilizaron un método de extracción de interés, de igual manera como otros antecedentes anteriores

citados se refiere al potencial biológico antibacteriano y otros beneficios farmacológicos de la planta, asociándolo al tema actual sobre la aplicación a una levadura (pp.6).

El trabajo de graduación, Efecto de la aplicación de los aceites esenciales extraídos a partir de las hojas de pimientos de Jamaica (*Pimenta dioica*), hojas de Canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y Orégano (*Oreganum vulgares*) en la preservación de carne de res, (2013) autor Lizano se valoró cada aceite esencial por aparte y su efecto en la preservación de los alimentos (carne, en ese caso) debido a su efecto antimicrobiano. Se obtuvo como resultado que el aceite esencial de las hojas de orégano presentó el mayor rendimiento para preservar la carne que los demás aceites extraídos, por lo tanto, este otro antecedente revalida la acción antibacteriana de dicha planta de estudio al tema de investigación.

Proyecciones

Con esta investigación se pretende dar un aporte a la fitoterapia, mediante el estudio de la actividad biológica de las partes aéreas de dos drogas vegetales *T. vulgaris L* y *O. Vulgare L* a modo de combatir las infecciones bucales como propuesta para tratar una candidiasis bucal mediante pruebas de identificación de los aceites esenciales y pruebas microbiológicas para determinar su actividad frente a *C. albicans*; lo que representa un avance científico en la medicina natural.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

En el segundo capítulo de este trabajo se realiza un acercamiento, principalmente descriptivo, sobre el uso de la medicina tradicional o fitoterapia; enfocado en las drogas vegetales el tomillo y el orégano, que son plantas con acción biológica descrita. Se procederá a investigar las generalidades de las plantas por utilizar (drogas vegetales), su composición química y diferentes métodos de extracción como la posible acción antimicótica.

Fitoterapia

Según Avello y Cisternas (2010) la fitoterapia es la ciencia que estudia el manejo de los productos de origen vegetal con fines terapéuticos, ya sea para atenuar, curar o prevenir un estado patológico donde la medicina tradicional o natural valida su uso popular mediante métodos químicos con pruebas en el laboratorio. En otras palabras es la terapia suplementaria que manipula plantas o partes del material vegetal en donde el empirismo de la medicina tradicional se transforma en fundamento científico (p.1284).

Fitofármaco

Etimológicamente la palabra se torna de dos raíces griegas; “Fito” definido como planta y “Fármaco” siendo un medicamento. Por lo tanto, se puede deducir y concretar que un fitofármaco es un medicamento cuya sustancia activa contiene el extracto de una determinada planta, a diferencia de un fármaco químico que proviene de una molécula químicamente sintetizada. Se puede agregar también como productos medicinales acabados y etiquetados cuyos ingredientes activos estandarizados están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otro material vegetal, o combinaciones de éstos. Avello *et al.* (2010, pp.1286)

Planta Medicinal

Se describe como cualquier planta considerada como recurso biológico que posee en alguno de sus órganos o en toda la estructura los principios activos con actividad farmacológica útiles en la terapéutica. (Universidad de Antioquia, 2009).

Droga Vegetal

Parte de la planta que contiene los principios activos y con actuación farmacológica para su uso terapéutico. (Universidad de Antioquia, 2009).

Metabolitos Secundarios

Las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivado de sus actividades metabólicas llamados metabolitos secundarios enfocados a su sistema de defensa en contra de microorganismos, insectos y herbívoros. Se han identificado algunas sustancias simples como: quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas, terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, pectinas y poli péptidos (García, *et al.* (2010).

Principio Activo

Dícese, primero de sus palabras como captura de un resultado con un indicativo de llevar hacia adelante algo. Se establece como sustancia química pura (aislada de la droga) responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico que se le atribuye a una droga (Universidad de Antioquia, 2009).

Aceite Esencial

Son productos que contienen los principios volátiles de los vegetales que se extraen de diferentes partes de la planta: de las flores (rosa), de las hojas (eucalipto), de las raíces (vetiver) o de su madera, se agrega también brevemente que es una mezcla de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas. García *et al.* (2010).

Cavidad Oral

Antes de hablar de la cavidad oral, primero se debe describir un poco sobre cómo está constituido el tubo digestivo; este está integrado por: la boca, la faringe, el esófago, el estómago, el intestino delgado e intestino grueso y la cavidad oral. Esta última se ubica en la primera parte del aparato digestivo; exactamente en la parte inferior de la cara, entre las fosas nasales y el cuello, es recubierto por una mucosa cuya estructura está formada por: el epitelio, membrana basal y estrato conectivo (Martini, Timmons y Tallitsch, 2009, p.662).

Anatomía de la cavidad oral

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

La parte ósea lleva por nombre paladar duro porque está constituida por los huesos maxilar superior y el palatino; por el otro lado, está el paladar blando o velo del paladar, que está formado por músculos recubiertos de mucosa. Como ya se sabe la cavidad oral se comunica con el exterior, por la abertura de la boca y es en ese espacio donde se ubica la lengua, que es la estructura de mayor importancia en la investigación. Martini *et al.* (2009, pp.661-663).

Anatomía de la lengua

La lengua puede diferenciarse en dos porciones: un cuerpo anterior o porción oral y una raíz posterior o porción faríngea. Su superficie anterior contiene una gran cantidad de pequeñas proyecciones nombradas papilas. La lengua es un órgano impar, mediano y simétrico. Tiene la característica de ser muy móvil y está cubierta por una mucosa; este órgano tiene varias funciones importantes como lo son: la masticación, la deglución, la succión y la fonación y también es el órgano que se encarga de las sensaciones gustativas. Martini *et al.* (2009, pp.662-664).

A nivel de la cavidad bucal o mucosa oral hay una amplia diversidad microbiana debido a las agradables condiciones que proporciona como las concentraciones de oxígeno, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, el pH, la exposición a factores inmunológicos y las características anatómicas que permita que estos vivan como comensales. Martini *et al.* (2009, pp.662-664).

Micología

Se define micología que es una de las ramas de la microbiología, ciencia que se dedica al estudio de los hongos; seres vivos que al inicio se clasificaron como vegetales inferiores que

carecían de la capacidad de formar tejido, ya hoy forman parte del reino Fungi y del dominio Eumycota.

Hongos

Los hongos son microorganismos de estructura celular eucarionica, simples y con gran capacidad de adaptarse a diversos medios. Carecen de clorofila por lo cual son incapaces de sintetizar su propio alimento, por lo tanto, depende de una nutrición carbonada, la cual obtienen viviendo como saprofitos en materia orgánica en descomposición o como parásito sobre organismos vivos. (Rodríguez, 1998, p.19)

Micosis oportunista

Según Rodríguez (1998), la micosis oportunista son un grupo de enfermedades de etiología fúngica, para el desarrollo de la enfermedad el agente causal necesita un estado alterado de los mecanismos de defensa normales ya que estos son incapaces de producir una patología en un huésped con un estado inmune normal. (p.234)

A lo largo del tiempo las infecciones micóticas han tenido un incremento importante debido al aumento del número de pacientes inmunodeprimidos por diversas causas como el SIDA, la quimioterapia en pacientes con cáncer, las personas receptoras de trasplantes, además por el uso frecuente de procedimientos invasores y por los tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro y el uso de glucocorticoides. El caso más representativo de los agentes fúngicos oportunistas lo constituye el género *Candida*. (p.235)

Candidiasis

Enfermedad conocida también como moniliasis o algodoncillo, causada por un hongo del genero *Cándida*, se le atribuye más de 100 especies, aunque solo se implica en infecciones clínicas a la *C.Albicans*. Generalmente esta cepa es aislada entre un 90% y100% a partir de muestras de mucosa y entre un 50 y 70% de las cepas son procedentes de pacientes inmunosuprimidos. Murray *et al* (2008, pp779-780).

Figura 1. Cándida Albicans en Mucosa Bucal



Fuente: Google imágenes

Taxonomía

Como lo menciona Murray *et al* (2008), se extrae la información proveniente de clasificación taxonómica según reino como Hongo, con división Deuteromycota, de la clase Blastomycetes, perteneciente a la familia de Cryptococcaceae del género Cándida y de la especie Albicans (pp.780-781).

Morfología

Como lo menciona Murray *et al* (2008) todas las especies del género cándida se desarrollan como células levaduriformes ovals aproximadamente entre 3 a 5 μm las cuales forman yemas o blastoconidias, pseudohifas e hifas verdaderas también producen tubos germinales y clamidoconidias terminales de pared gruesa. Las levaduras son microorganismos eucarióticos y todas son gram positivas, su reproducción es asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación (pp.780-781).

Figura 2. *C.Albicans* Levaduriforme Oval



Fuente: Google imágenes

Epidemiología

Generalmente los hongos endógenos no habitan al huésped como parásitos, sino que lo hacen como saprofitos. Están representados esencialmente por *C. albicans* coloniza al ser humano como a animales, por lo que se encuentra tanto en personas como en la naturaleza. El lugar de colonización en el individuo es el tubo digestivo (desde la cavidad bucal hasta el recto), también se desarrolla como comensales en la uretra, vagina, piel y debajo de las uñas de los pies y manos. Se encuentra en estado saprofito en estas mucosas en bajas proporciones, pero puede desarrollarse en abundancia y causar alteraciones clínicas. Además el principal agente etiológico es la *C.albicans*, se estima que entre el 25 y 50% de las personas sanas portan la especie como micro flora normal en la cavidad bucal. (Murray *et al*, 2008, pp. 781-782).

Manifestaciones clínicas

Como lo determina Rodríguez (1998), las manifestaciones clínicas son muy variadas, cualquier tejido es susceptible a la invasión siempre y cuando el huésped lo permita. Puede generar lesiones cutáneas, mucocutáneas o generalizadas. La manifestación clínica de interés en la investigación son las infecciones a nivel de boca, pero se dará una descripción breve de las principales manifestaciones patológicas de la *C. albicans* (pp.235-239).

Lesiones Cutáneas

Intertrigo

Se presenta en áreas de roce y pequeños pliegues, como zona inframamarias, axilas, interglúteos e interdigitales. Su desarrollo se basa en una lesión humedad, eritematoescamoso a veces de color blanquecino y bordes irregulares (Rodríguez, 1998, p.237).

Paroniquia

Inflamación periungueal, que procede normalmente de la infección ungueal, presenta un exudado inflamatorio agudo (Rodríguez, 1998, p.237).

Onicomycosis

En este caso el hongo invade la uña, produciendo un cambio en la estética de esta con engrosamiento, formación de estrías y cambio en la coloración. (Rodríguez, 1998, p.237).

Lesiones mucocutáneas

Candidiasis oral

También conocida como algodoncillo, con manifestación clínica más común presente en edades extremas e individuos inmunocomprometidos, se da una formación de placa mucosa, cremosa y blanquecina muy adheridas en su base las cuales al ser desprendidas deja una superficie eritematosa y brillante. (Rodríguez, 1998, p.237).

Vaginitis

El embarazo y la diabetes son los principales factores predisponentes, se caracteriza por presentar una secreción espesa en grumos, blanco amarillento, la mucosa vaginal puede presentar placas similares a la candidiasis oral. (Rodríguez, 1998, p.238).

Candidiasis generalizada

Se genera como última etapa de algunos procesos primarios debilitantes en enfermos que constantemente están recibiendo inóculos masivos del hongo procedentes de alguna fuente primaria endógena o exógena, facilitando la generalización de la patología individuos extremadamente susceptibles. (Rodríguez, 1998, p.238).

Cultivo

Los autores describen que la *C.Albicans* crece de manera in vitro en medios de cultivo con agar, peptona, maltosa, sacarosa y dextrosa. En el agar sabouraud aparecen colonias muy pequeñas al término de 24 a 36 horas y pueden llegar a medir entre 1.5 a 2 mm de diámetro después de una semana. Las colonias de Cándida crecen “in vitro” en condiciones de aerobiosis en medios de cultivo a pH con rango entre 2,5 y 7,5 y temperatura que oscila entre 20°C y 38°C.(Murray *et al*, 2008, pp. 738-740)

Las características que presentan estas colonias en medios como el agar sabouraud o medios similares son un crecimiento liso, suave, húmedo y de color y aspecto cremoso; de igual manera al término de 4 o 5 días se percibe un olor semejante a levadura. (Murray *et al*, 2008, pp. 738-740)

Diagnóstico de laboratorio

Este dependerá de la manifestación clínica de la patología, el material clínico por estudiar es variado. Debido a que el microorganismo forma parte del micro flora natural del organismo es imprescindible la cuantificación del mismo, así como su presentación morfológica en el tejido afectado. Por lo tanto, si se encuentra en bajas cantidades, con predominio de formas levaduriformes es una colonización, pero sí, está presente en abundancia con predominio de formas filamentosas es indicativo de enfermedad. (Rodríguez, 1998, p.240).

El diagnóstico se realiza mediante raspado de lesiones ungueales, cutáneas y mucocutáneas, secreciones vaginales, esputo entre otras materiales los cuales son tratados con hidróxido de potasio al 10% o 20% para visualizar los elementos fúngicos. (Rodríguez, 1998, p.240).

Generalidades de las Plantas en estudio

***Thymus vulgaris* (Tomillo)**

Se reconoce con el nombre científico de *Thymus vulgaris*, comúnmente como Tomillo. Agregando la forma comercial de llamarle como tomillo rojo y tomillo blanco, hierba de tomillo, hoja y flor de tomillo.El *T. vulgaris* L popularmente conocido como tomillo es una pequeña

planta, con un aproximado 20-30cm, perteneciente a la familia Lamiaceae, que es una de las más grandes familias y plantas con flores que va de color blanco hasta morado con distintos aromas, con alrededor de 220 géneros y, prácticamente, 4000 especies alrededor del mundo (Javed *et al.*, 2013, p.975).

Taxonomía

De acuerdo en Prasanth, Ravi, Varsha y Satyam (2014), su taxonomía se describe en pertenecer al reino Plantae, en la clase de Magnoliopsida en el orden de Lamiales, de la familia Lamiaceae y subfamilia Nepetoideae, del género *Thymus L* y especie *T. vulgaris L.*(p.2)

Descripción

Es un arbusto aromático con intenso olor a timol de unos 20- 30 centímetros de altura, aspecto grisáceo y tallos leñosos, muy poblado de hojas lineares, opuestas, entre ovoides y lanceoladas, diminutas de a lo sumo, 1 cm, aunque pueden parecer más estrechas porque sus bordes se enrollan cuando hay sequía, el envés que es blanquecino por los muchos pelillos blancos que lo recubren; las flores son bilabiadas, de color púrpura o blancas, muy pequeñas, agrupadas en una especie de cabezuela en el extremo de las ramitas (Gimeno, 2001, p.173). El sabor es fuerte, algo amargo, como alcanfor (Centro de Información de Medicamentos, 2002, p.97).

Figura 3.*Thymus Vulgaris*



Fuente: Google imágenes

Hábitat y distribución geográfica

Esta pequeña hierba aromática es de origen mediterráneo (Asia Occidental, Europa Central y el norte de África), pero es posible aislarlo en diferentes lugares del planeta a manera de cultivo como en laderas y ciertos terrenos montañosos. Sin embargo prefiere los terrenos secos, soleados y calcáreos. Existen una variedad de especies. El clima más favorable para su cultivo es el templado, templado-cálido y de montaña. Resiste muy bien a las sequías y heladas, pero no al encharcamiento con exceso de humedad. Su reproducción se puede efectuar mediante semillas o vegetativamente por medio de pies o esquejes (Inlago, 2014, p.10).

Partes medicinales de la planta y acción farmacológica

Según el (CIMED, 2002), el producto medicinal es el aceite extraído en fresco, de la hierba florecida, las hojas secas, el rayado y la parte etérea fresca de la planta. La esencia del tomillo presenta atributos tonificantes, estimulantes del apetito, eupépticos, espasmolíticos, expectorantes, antisépticos, antihelmínticos y anti fúngicos, también una de las propiedades más atractivas de la hierba es su potencial antibacteriano (p.97).

Importancia en la medicina tradicional de *Thymus vulgaris L*

El uso del tomillo en la medicina tradicional conlleva una larga historia ha sido utilizado en el tratamiento de diversas patologías, por ejemplo, de tipo respiratorio (tosferina, bronquitis y asma), en forma de té, pomada, tintura, jarabe o por inhalación de vapor (Javed *et al.*, 2013, p.976).

También, se utiliza para evitar el endurecimiento de las arterias, el dolor de muelas, la infección del trato urinario y la dispepsia. Posee la capacidad de aumentar el apetito, debido a su importante constituyente el Timol, cuyo potencial es capaz de matar bacterias y parásitos (Javed *et al.*, 2013, p.976).

El tomillo ha cambiado de ser una simple hierba tradicional a una droga vegetal de fitoterapia racional. Es fuente de hierro, calcio, manganeso, vitamina K y de igual manera, actualiza el flujo sanguíneo y genera un impacto estimulante en todo el sistema. La actividad vigorizante de esta hierba en un marco de ansiedad hizo que funcionara como una cura para la

debilidad física y mental y, adicionalmente, para disminuir el insomnio (Monira y Naima, 2010, p.467).

El potencial curativo de *Thymus vulgaris L.* se debe a la presencia de flavonoides, timol, carvacrol, eugenol, fenoles, luteolina y tetrametoxilado. Sus numerosos efectos como: antibacteriana, anti fúngica, antiviral, antiparasitaria, espasmolítico y antioxidante lo hacen recomendable como agente de prevención del cáncer (CIMED, 2002, p.98).

Constituyentes del aceite esencial de *Thymus vulgaris L*

López, (2006), citado por Inlago, (2014), el aceite constituye del 1 al 2.5% aproximadamente de los componentes totales de la planta de tomillo, resaltando como elementos principales del aceite, a los fenoles monoterpenos (56.53%) y, en menor cantidad, hidrocarburos monoterpenos (28.69%), hidrocarburos sesquiterpenos (5.04%) y sesquiterpenos oxigenados (1.84%). Entre los componentes de aceite esencial el compuesto predominante es el timol y carvacrol hasta un 64 % del aceite, mientras que la cantidad de todos los demás componentes es menos de 19% (Prasanth *et al.* (2014,p.71).

También contiene flavonoides como la apigenina y luteolina, numerosas flavonas metoxiladas, flavonas, flavonoles y heterósidos. Se deben tomar en cuenta aspectos como la altura en la que se encuentra el cultivo, la composición del suelo, la época de cosecha entre otros factores que influyen en la composición del aceite (Inlago, 2014, p.11).

Análisis del aceite de tomillo

Shabnum y Wagay (2011) pudieron identificar 30 compuestos por la destilación hidráulica de las partes aéreas de *Thymus vulgaris L.* Los principales aceites esenciales son los siguientes: timol y-terpineno, p-cimeno, mirceno, alfa-pineno, eugenol, carvacrol y alfa- thujene (p.85).

Hudaib, Speroni, Di Pietra y Cavrini (2002), pudieron identificar los distintos grupos funcionales del aceite esencial de tomillo, utilizando sus índices de retención obtenidos a partir de dos columnas cromatografías (no polar y polar) diferentes en combinación con sus datos sobre el espectro de masas por captación de iones. El análisis GC/MS de los aceites

generó la separación de 46 componentes, de los cuales 45 estructuralmente fueron bien identificados, usando sus datos de espectros de masa y de índices de retención (p.694).

Generalmente, el aceite vegetal se caracteriza por el alto porcentaje de fenoles monoterpenos (carvacrol y timol). El aceite también muestra niveles relativamente abundantes del contenido fenólico, particular de timol, sustancia a la cual se le atribuye la actividad biológica de la planta o su aceite (Hudaib *et al.*, 2002, p.694).

Actividad anti fúngica y antimicrobiana del tomillo

Muchos de los aceites esenciales conservan efectos inhibidores que son estudiados por su posible uso como antimicrobiano, anti fúngico, antiviral, por lo tanto, ha permitido su uso en preparaciones farmacéuticas, ya sea como conservantes o como fitofármacos. Entre ellos se encuentran el aceite de canela, clavo de olor ajo, orégano y tomillo (Labib y Aldawsari, 2015, p.3350).

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios producidos por las hierbas como fuente de defensa para su supervivencia, son mezclas de compuestos volátiles, principalmente los terpenos y sus derivados oxigenados, producidos en pequeñas cantidades, y con un gran potencial biológico ya que poseen un efecto sinérgico. (Manou, Bouillard, Devleeschouwer y Barel, 1998, p.368).

Otros usos y actividad biológica del tomillo

La utilidad principal que le ha proporcionado la humanidad es como condimento de uso culinario (aperitivo y digestivo), favorece la conservación de los alimentos y útil en los procesos de elaboración de licores .Se usa también en infecciones y faríngeas, cuidado de las encías y dientes, siendo de uso externo, empleando infusiones de tomillo. (Inlago, 2014, p.13).

Según Prasanth *et al.*, 2014, los extractos de tomillo tienen actividad antiviral contra el virus del herpes simple (HSV), tipo 1 (HSV-1), tipo 2 (HSV-2). Por su actividad diurética está indicado para personas con retención urinaria, reumatismo, gota y distintos problemas con la vejiga o el riñón.

Efectos secundarios

Resulta no viable el uso del aceite de tomillo por vía oral, en especial mención durante la etapa de embarazo, lactancia, además en infantes menores de 6 años, por otra parte no se recomienda en pacientes con insuficiencia renal o cardíaca. Se debe tener precaución con las esencias ya que pueden presentar alergias (CIMED, 2002, p.100).

Toxicidad

Se establece en Prasanth *et al.*, 2014, p.14 que está contraindicado en caso de hipersensibilidad a alguno de los componentes de los preparados a partir del tomillo.

Orégano (*Origanum vulgare L*)

Origanum vulgare L es cultivado en Tarata en gran escala, cosechado, desecado y distribuido a los mercados nacionales y al exterior. Muy utilizado como especie aromática en la preparación de alimentos. Las hojas y sumidades floridas se aplican en el campo farmacéutico debido a las propiedades tónicas, amargo excitante, antiséptico, diurético y antiespasmódico que posee debido a sus diversos componentes. Sobre el poder antiséptico de los aceites esenciales de plantas pertenecientes especialmente a las familias Labiadas hay amplia información (Plaus, Flores y Ataucusi, 2001, p.15).

Esta droga vegetal comprende más de dos docenas de diferentes especies de plantas, con flores y hojas que presentan un olor característico a "especioso". Las hojas secas del *O. vulgare L*, nativo de Europa y del *Lippia graveolens*, planta nativa de México son de uso culinario común y las más útiles en la medicina (Lozano, Piña, Uribe y González, 2004, p.8).

Taxonomía

Se viene a mencionar con nombre botánico *Lippia graveolens*, conocida con nombre común Orégano. El nombre original del orégano se da en Europa a una Labiada clasificada como *Oreganum vulgare*, pertenece a la familia Verbenaceae. (Muñoz, 2002).

Descripción

Planta herbácea los tallos son erectos, de unos 90 cm o más, generalmente ramificados en la parte superior, pubescentes, hirsutos o vellosos, raramente glabros. Las hojas, de 10-40 mm, son ovaladas, enteras o ligeramente crenacio-serradas, glabras o pilosas, punteadoglandulosas y pecioladas. Flores dispuestas en espiga de verticilastros de 5-30 mm, generalmente de color púrpura violáceo o grisáceo. El cáliz, punteado de glándulas amarillas, con 5 dientes iguales, es piloso o glabro. La corola de 4-7 mm, es bilabiada, con el labio superior entero o escotado y el inferior trilobulado, blanco o rojo-púrpura. Androceo formado por 4 estambres fértiles, con los filamentos divergentes, didínamos. Florece desde julio hasta septiembre (Muñoz, 2002).

Figura 4. *Oreganun Vulgare L*



Fuente: Google imágenes

Partes medicinales

Del orégano se utilizan las hojas y los ápices florales recolectados en verano en plena floración (partes aéreas de la planta). Las hojas y los ápices florales pueden ser secados en lugares oscuros y ventilados, pero se recomienda efectuarlo muy rápidamente después de la recolección porque los aceites esenciales son muy volátiles, por lo tanto, podría perder parte de sus propiedades (Muñoz, 2002).

Distribución y hábitat

El género *Lippia* (Verbenaceae) incluye aproximadamente 200 especies de hierbas, arbustos y árboles pequeños. Las especies están distribuidas principalmente a lo largo de los países de América del Sur, Centroamérica y en los territorios de África tropical. El orégano es una planta fuertemente aromática nativa del sur de Norteamérica, México, Guatemala, Nicaragua, Honduras, Panamá, Guatemala y Colombia. Esta planta por lo general se encuentra en los suelos someros con profundidades que van de 7 a 15 cm, pobres en materia orgánica, de tipo basáltico, calizo-arcilloso o rocoso de textura francos arenosos y francos arcillosos, con pH ligeramente ácido. (Muñoz, 2002).

Constituyentes

Contiene aceite esencial, cuya composición puede variar según su procedencia. Generalmente contiene fenoles (timol y carvacrol); hidrocarburos monoterpénicos (limoneno, α y β -pineno, pcimeno); sesquiterpénicos (β -cariofileno y β bisaboleno); linalol y terpinen-4-ol. El orégano procedente del centro de Europa, produce un aceite esencial pobre, o incluso privado de fenoles. También se pueden encontrar ácidos fenólicos (cafeico, rosmarínico y clorogénico), taninos, principios amargos, flavonoides (luteolol, kaempferol, diosmetol y derivados del apigenol), triterpenos derivados de los ácidos ursólico y oleánico (Arcila, 2004).

Usos medicinales

En Costa Rica se aprovecha para problemas broncopulmonares. Es común recomendar para la tos, el orégano hervido en leche; este es un ejemplo del mal uso de las plantas, pues el orégano no se hierve, contiene un aceite volátil y se perdería, luego la leche es un medio de cultivo para los microorganismos, por lo tanto, no hay compatibilidad. Lo correcto es el uso en infusión para infecciones de las amígdalas, tos y gripe (Rodríguez, 2006).

La decocción de hojas y ramas con sal sirve como antiinflamatoria, dolores estomacales; las hojas pueden ser masticadas y tienen un efecto antiasmático, diurético, emenagogo, en casos de atonía intestinal y estreñimiento. Funciona como antibiótico natural, sudorífico, antiespasmódico, contra la flatulencia vermífugo y tónico, la dosis que se recomienda es de 15 a 20 g. de hojas y flores por litro de agua, se toman dos tazas al día (Rodríguez, 2006).

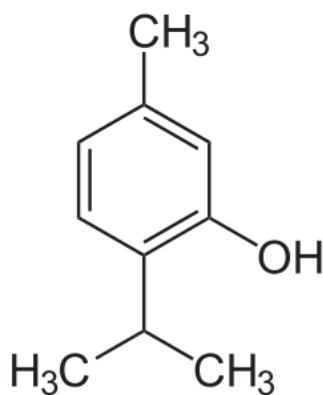
La esencia sirve para masajes musculares y para dolor de muelas. Científicamente solo se han comprobado los efectos digestivo, diurético y carminativo. La decocción se usa tópicamente en heridas, como antiséptica y cicatrizante, para llagas, prurito, sarna, resolutiva y baños para problemas dérmicos. Es un excelente antioxidante (evita el envejecimiento). El jarabe de las hojas secas es apto para los diabéticos, disentería, catarros y resfríos. En homeopatía se aprovecha para tranquilizar el histerismo (Rodríguez, 2006).

Principales componentes químicos de los aceites

Timol

El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es un fenol monoterpeneo, principal componente en el *T. vulgaris L.* y en diferentes plantas de la familia Lamiceaceae. Es un compuesto cristalino de color blanco que posee olor aromático y contiene fuertes propiedades antisépticas, antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas. Javed *at al.* (2013, p.976).

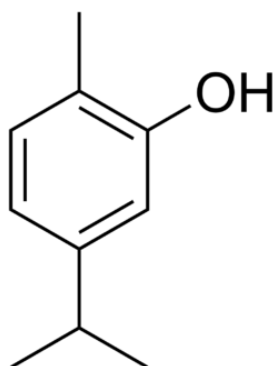
Figura 5. Estructura Química del Timol



Fuente: Google imágenes

Carvacrol

El carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol) también es un fenol monoterpeneo presente en el aceite esencial de *T. vulgaris L.* y de muchas otras hierbas y especies aromáticas.

Figura 6. Estructura Química del Carvacrol

Fuente: Google imágenes

Métodos de extracción de los aceites esenciales

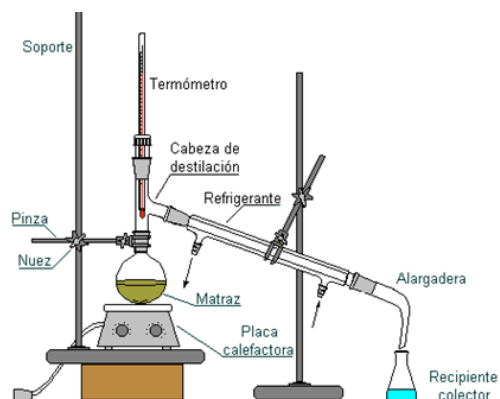
Los métodos por utilizar en el presente trabajo son: arrastre por vapor, método por Soxhlet y Trampa de Dean-stark los cuales son los más apropiados según el tipo de drogas vegetales y se hará referencia a una principal fuente (Lamarque *et al.* 2000, pp.48-51)

Hidrodestilación

Es uno de los métodos más sencillos donde se aprovecha la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado de vapor de asociarse con moléculas de aceite esencial a partir del material vegetal lo más fresco posible (Lamarque *et al.* 2008, pp.49-50).

Si un líquido orgánico es insoluble en agua y tiene una presión de vapor apreciable a la temperatura de ebullición de aquella, puede destilarse arrastrándolo con vapor de agua. Este método permite la máxima difusión del vapor a través del material vegetal, reduciendo los daños que pudiesen sufrir los componentes de las esencias extraídos por otros métodos. Los aceites esenciales son sustancias volátiles e insolubles en agua por lo que pueden ser arrastradas por una corriente de vapor de agua (Lamarque *et al.* 2008, pp.49-50).

Figura 7. Equipo de Hidrodestilacion Simple

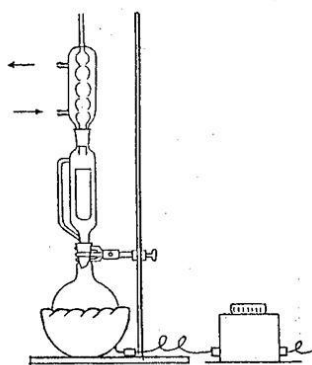


Fuente: Google imágenes

Extracción con Soxhlet

Este método se utiliza para materiales sólidos, va de una matriz sólida a una matriz líquida. El matraz inferior se calienta y evapora el disolvente, que posteriormente pasa al condensador y cae gota a gota. Así, se realiza la extracción a la planta. Cuando se acumula gran cantidad del disolvente en el receptáculo del condensador. Este sale por una válvula y vuelve a caer al matraz inferior y se repite el proceso durante el tiempo que se requiera para extraer la mayor cantidad de planta. (Lamarque *et al.*2008, p.51)

Figura 8. Equipo de Extracción Soxhlet

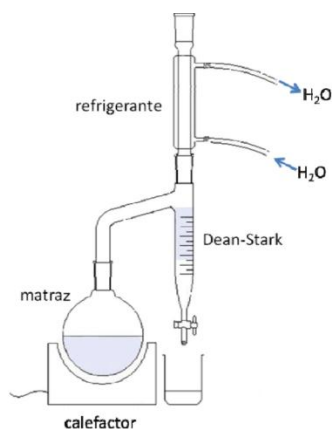


Fuente: Google imágenes

Método Dean Stark

Se define como método por aparato Dean-Stark o colector Dean-Stark o trampa Dean-Stark es una técnica con el mismo principio de la técnica de hidrodestilación que adapta su equipo una pieza de vidrio utilizada en química orgánica para recolectar o eliminar agua o cualquier otro líquido del medio de interés. Se utiliza en combinación con un condensador de reflujo y un matraz colector para eliminar de manera continua el agua que se produce durante una reacción química que tiene lugar a la temperatura de reflujo. Fue inventado por E. W. Dean y D. D. Stark en 1920 para determinar el contenido de agua en el petróleo (Lamarque *et al.*2008, p.51).

Figura 9. Equipo de Hidrodestilacion Acoplada a Trampa Dean-Stark



Fuente: Google imágenes

Identificación de compuestos

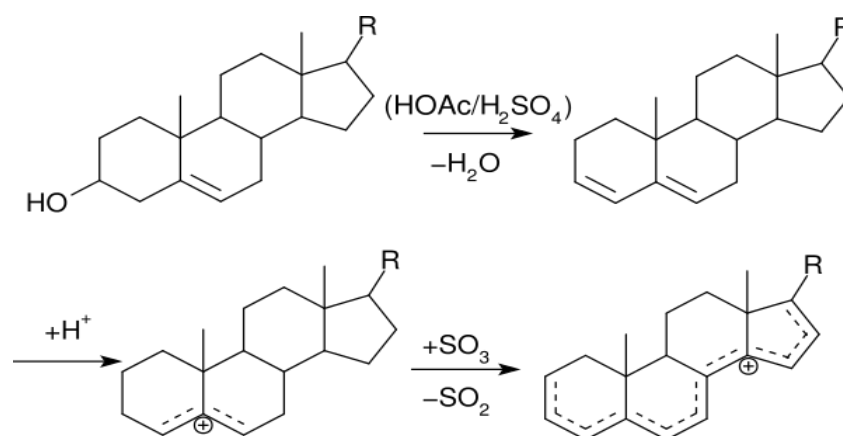
Al obtener los aceites esenciales por medio de los métodos citados se debe proceder a realizar una serie de pruebas de identificación, como por ejemplo, la prueba cualitativa de Liebermann-Buchard, cromatografía de gases acoplado a masas y espectroscopia Infrarrojo para las cuales se realizó una revisión de los conceptos fundamentales, utilizando como principal referencia a la Universidad de México, específicamente la facultad de Química (2007, p.1-4).

Prueba de Liebermann-Buchard

La prueba de Liebermann-Buchard se define como un reactivo utilizado en un ensayo colorimétrico para detectar el colesterol y triterpenos es una prueba general para ello, lo que da

un color verde intenso a rojizos. Este color comienza como un color rosa violáceo y progresa a través de un verde claro y luego de color verde muy oscuro. El color es debido al grupo hidroxilo (-OH) de colesterol reaccionar con los reactivos y el aumento de la conjugación de la insaturación en el anillo fusionado adyacente. Es importante hacer mención de que para este ensayo es necesario utilizar anhídrido acético y ácido sulfúrico como reactivos. (Atinafu y Bedemo, 2011).

Figura 10. Reacción de Lieberman-Buchard



Fuente: Google imágenes

Cromatografía

Es un método físico de separación, su principio es la diferencia de polaridades entre las sustancias de una mezcla. La cual va a tener una fase estacionaria y una móvil, los compuestos dependiendo de su polaridad van a quedar en la parte estacionaria y otros van a moverse junto a la fase móvil.

Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es una de las técnicas más útiles a nivel analítico, debido a su capacidad de separación y sensibilidad al momento de analizar compuestos volátiles y dependerá de la estabilidad térmica de los componentes de la mezcla. Generalmente compuestos no mayores a 1000g/mol y temperaturas máximas de trabajo de 400 °C.

En este caso la fase móvil es un gas inerte (helio o nitrógeno) y la fase estacionaria es un sólido (cromatografía gas-sólido) o un líquido “sostenido” por un sólido inerte (cromatografía gas-líquido). Este tipo de cromatografía siempre es en columna ya que constituye la única manera de que la fase móvil gaseosa se mantenga fluyendo, confinada dentro del sistema. La columna puede estar rellena con la fase estacionaria, en forma semejante a la cromatografía líquida, o bien, la fase estacionaria puede depositarse sobre las paredes de un tubo muy delgado (0.25mm de diámetro) y largo (hasta 100m). Este tipo de columnas se conocen como columnas capilares y proporcionan la mayor capacidad de separación. (Facultad de Química 2007, pp. 3-4).

La espectrometría de masas (MS)

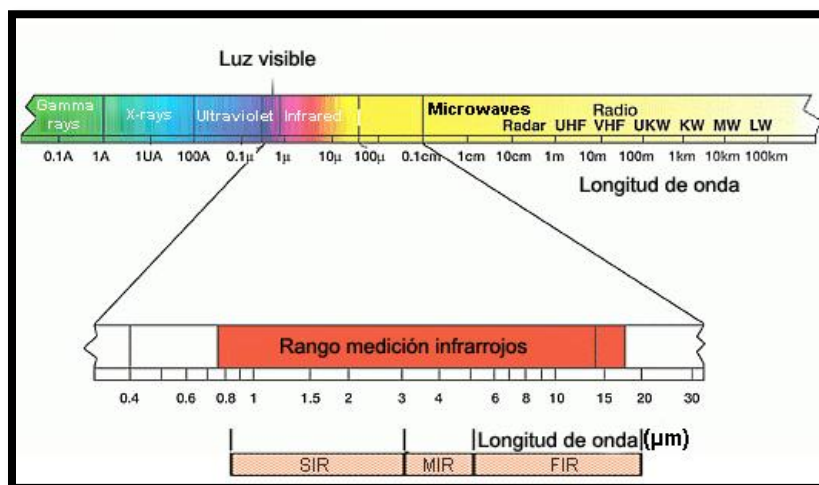
Como lo menciona Gutiérrez y Droguet (2002), la espectrometría de masas es una de las técnicas más precisas para realizar análisis, la cual bombardea moléculas con electrones y rompe las moléculas en fragmentos. El método permite medir la concentración de las sustancias con una gran sensibilidad, también proporciona información estructural sobre la molécula analizada y la masa molecular (pp.36-38).

Espectroscopia Infrarrojo (IR)

Cuando se obtiene un compuesto de interés de una fuente natural, debe de determinarse por completo sus estructuras, de ahí la importancia de la química orgánica. Uno de los métodos más utilizados a lo largo del tiempo es la espectroscopia, según Skoog (2011) la describe como una ciencia que estudia la absorción y emisión de la radiación electromagnética, en otras palabras consisten en medir la cantidad de radiación producida o absorbida por las especies atómicas o moleculares que se analizan. Y son clasificados según la región del espectro electromagnético en la que se utiliza para hacer la medición, la cual se extiende de la radiación de menor longitud de onda hasta la de mayor longitud, estos son: Rayos Gamma, Rayos X, Ultravioleta (UV), Visible, Infrarrojo (IR), microondas y radiofrecuencias (RF) (p.567).

La región infrarroja del espectro corresponde a las frecuencias que se encuentra entre las frecuencias del visible y las más altas de microonda.

Figura 11. Espectroscopia Infrarrojo



Fuente: Google imágenes

La espectrometría de infrarrojos es un tipo de espectrometría de absorción que utiliza la región infrarroja del espectro electromagnético y se basa en la vibración de los enlaces y proporciona evidencia de los grupos funcionales presentes, pues los átomos de una molécula no ocupan posiciones fijas, sino que vibran dentro de un determinado espacio, determinados por los niveles de energía.

La frecuencia de la vibración de la molécula dependerá de la masa atómica y de la rigidez del enlace, los átomos más pesados vibran de forma más lenta que los ligeros, por ejemplo, los enlaces más resistentes son más rígidos y requieren mayor esfuerzo para estirarse o comprimirse por tanto, los enlaces más fuertes generalmente vibran más rápido que los débiles (Skoog, 2011, pp.570-574).

Según L.G.Wade (2012), es muy poco probable que dos espectros de IR de dos compuestos diferentes muestren las mismas frecuencias para todas sus vibraciones, el autor menciona que el espectro infrarrojo proporciona una huella digital, está en la región que va desde 600 a 1400cm^{-1} , donde pequeños cambios en la molécula da variaciones importantes en el espectro y para grupos funcionales comunes corresponde entre los 3600cm^{-1} a 1250cm^{-1} (p.515)

Tabla1.Frecuencia Aproximada a la que se Encuentra Algunos Grupos Funcionales**Absorción IR**

Grupo funcionales	Absorción(cm^{-1})	Intensidad
Alcano C-H	2850-2960	Media
Alqueno =C-H	3020-3100	Media
C=C	1640-1680	
Alquino \equivC-H	3300	Fuerte
C\equivC	2100-2260	Media
Haluro de alquilo C-Cl	600-800	Fuerte
C-Br	500-600	Fuerte
Alcohol O-H	3400-3650	Fuerte amplia
C-O	1050-1150	Fuerte
Areno C-H	3030	Débil
Anillo aromático	1660-2000	Débil
	1450-1600	Media
Amina N-H	3300-3500	Media
C-N	1030-1230	media
Compuesto carboxilo C=O	1670-1780	Fuerte
Ácido carboxílico O-H	2500-3100	Fuerte, amplia
Nitrilo C=N	2210-2260	Media
Nitro NO₂	1540	Fuerte

Fuente: McMurry (2008)

Solubilidad de compuestos

La solubilidad de compuestos en palabras simples de definir es la capacidad que posee una sustancia en disolverse en otra con propiedades similares, polar con polar y no polar con no polar (igual disuelve a igual). Thornton y Neilson (1998, p.32).

Microbiología

Método del antibiograma disco-placa

Como menciona los autores García *et al* (2000), el antibiograma disco-placa se basa en colocar en la superficie de la placa de Petri preliminarmente inoculada, con el microorganismo seleccionado un disco de papel impregnar con las diferentes sustancias antimicrobianas, en seguida mediante el contacto con la superficie húmeda del agar, la sustancia antimicrobiana se propaga ahí (p.123).

El antibiótico propaga través del espesor del agar a partir del disco, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interface entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se arrima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. (García *et al*, 2000, p.123-125).

Concentración mínima efectiva

Concierno a la concentración mínima del antimicrobiana capaz de inhibir el crecimiento bacteriano en un periodo de incubación de 18-24h. Ministerio de Salud del Perú. (2002, p.12)

Clasificación de la respuesta antimicrobiana

Resistente (R): Se refiere a la categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Las cepas bacterianas incluidas en esta categoría no son inhibidas por las concentraciones séricas del antibiótico, habitualmente obtenidas con las dosis usuales del mismo, poseen con frecuencia mecanismos específicos de resistencia bacteriana o la eficacia clínica del antibiótico frente a la bacteria no ha sido comprobada.

Sensible (S): Es una categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada pertinentemente con la dosis de antibiótico encargada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones. Ministerio de Salud del Perú. (2002, p.12)

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

Enfoque de la investigación

Este proyecto se desarrolla por medio de una investigación cuantitativa, la cual tiene como fin probar la hipótesis planteada mediante la recolección de datos, análisis y comprobación.

La recolección de los datos se establece en la medición (se miden las variables o conceptos contenidos en las hipótesis). Esta recolección se formula al utilizar procedimientos estandarizados y aceptados por una comunidad científica. Para que una investigación sea creíble y aceptada por otros investigadores, debe demostrarse que se siguieron tales procedimientos. Como en este enfoque se pretende medir, los fenómenos estudiados deben poder observarse o referirse al “mundo real”. (Hernández, Fernández y Baptista, 2014, p.5).

Diseño de la investigación

Según Hernández *et al.* (2014) el diseño es la planificación o estrategia que se lleva a cabo para obtener la información o fundamentos necesarios que responderá a la hipótesis inicialmente de la investigación, en este caso el estudio de la investigación presenta un diseño experimental ya que se fundamenta en hipótesis preestablecidas, miden variables y su aplicación debe sujetarse al diseño concebido con antelación; al desarrollarse, el investigador está centrado en la validez, el rigor y el control de la situación de investigación (p.150).

Objetos de estudio

Los objetos de estudio para este trabajo investigativo, son los aceites esenciales de las partes aéreas de las plantas por utilizar *T. vulgaris L* y *O. Vulgare L* obtenidos de los métodos de extracción como hidrodestilación, soxhlet y Dean-Stark y su posible actividad anti fúngicas contra el hongo *C. albicans*.

Variables o Unidades de análisis de la investigación

Hernández (2014), detalla que la unidad de análisis o variable es una propiedad que puede variar y es susceptible de medirse u observarse.

Tabla 2. Variables, Definición, Operacionalización e Instrumentalización

Objetivo	Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Instrumentalización
1. Determinar la mejor técnica para la obtención del aceite esencial a partir de las partes aéreas de las dos drogas vegetales tomillo (<i>T. vulgaris L</i>) y Orégano (<i>O. vulgare L</i>).	1. Métodos para la obtención de los aceites esenciales de tomillo y orégano.	Son métodos mediante los cuales se obtiene el aceite esencial de las partes vegetales de las plantas.	Extraer el aceite esencial de las partes aéreas del orégano y tomillo mediante tres métodos distintos y determinar cuál presenta un mayor porcentaje de rendimiento.	Mediante materiales y equipos para realizar las técnicas de hidrodestilación, Dean-Stark y soxhlet.
	1.1 Hidrodestilación	Es uno de los métodos más sencillos donde aprovecha la propiedad que tienen las moléculas de agua en estado de vapor de asociarse con moléculas de aceite esencial a partir del material vegetal lo más fresco posible. (Lamarque <i>et al.</i> 2008, pp.49-50).	Extraer el aceite esencial presente en las partes aéreas de orégano y tomillo, determinar su porcentaje de rendimiento.	Mediante materiales y equipos para realizar la técnica de hidrodestilación.

	1.2 Trampa Dean-Stark	Método con el mismo principio de la técnica de hidrodestilación que adapta su equipo una pieza de vidrio utilizada para recolectar o eliminar agua u cualquier otro líquido del medio de interés. Se utiliza en combinación con un condensador de reflujo y un matraz colector para eliminar de manera continua el agua que se produce durante una reacción. (Lamarque <i>et al</i> , 2008, p.51)	Extraer el aceite esencial presente en las partes aéreas de orégano y tomillo determinar su porcentaje de rendimiento.	Mediante materiales y equipos para realizar la destilación adaptando el aparato de Dean-Sark
	1.3 Soxhlet	La extracción por este método consiste en hervir un disolvente en el cual sea soluble el extracto vegetal que se va a	Extraer el aceite esencial presente en las partes aéreas de orégano y tomillo determinar su porcentaje de rendimiento.	Mediante materiales y equipos para realizar la técnica de soxhlet.

		condensar gota por gota que por medio del efecto sifón devuelve al balón el solvente más el extracto. (Lamarque et al, 2008, p.51)		
2. Evidenciar la presencia de los componentes principales reportados para los extractos mediante análisis instrumental y pruebas de química líquida.	2. Pruebas para designar presencia de grupos químicos con posible efecto anti fúngico en los aceites esenciales.	Pruebas que designan grupos funcionales presentes en los extractos de estudio.	Identificación de moléculas activas en los aceites esenciales de las dos plantas en estudio, mediante los métodos de espectroscopia IR, cromatografía de gases acoplada a masa y prueba de Libermann-Buchard.	Espectrofotómetro de infrarrojo, cromatógrafo de gases acoplada a masas. Tubos de ensayo, goteros y reactivos para prueba cualitativa.
3. Evaluar el efecto anti fúngico <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>T. vulgaris L</i> y <i>O. vulgare L</i> frente a la <i>C. albicans</i> , mediante la medición de los halos de inhibición	Enjuague bucal	Solución bucal que se considera vehículo para que principios activos entren en contacto con la mucosa bucal, lengua y dientes.	Técnica de elaboración del enjuague bucal detallada a continuación en la fase V, formulación del producto.	Balanza electrónica digital, beakers de 80 y 600 mL, probeta 25 y 100mL, agitador de vidrio, espátula.

formados en el cultivo				
3. Evaluar el efecto anti fúngico <i>in vitro</i> del aceite esencial de <i>T. vulgare L</i> y <i>O. vulgare L</i> frente a la <i>C. albicans</i> , mediante la medición de los halos de inhibición formados en el cultivo	Prueba de sensibilidad anti fúngico(análisis microbiológico)	Prueba mediante un antibiograma, mide la sensibilidad del microorganismo (levadura) a uno o distintas sustancias antimicrobianas (García <i>et al</i> , 2000).	Medir los posibles halos de inhibición que produce los aceites esenciales diluidos con la base de la formulación en 75%,50%,25%,12.5 % y 7.5%.	Placas de agar, Regla

Método de análisis

Este consiste en la ejecución y observación de los procedimientos y técnicas realizadas en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas. Donde mediante las técnicas y conocimiento de métodos químicos se aplica para la extracción e identificación de las sustancias en análisis, también como para la preparación de la fórmula fito farmacéutica. Además del análisis microbiológico para demostrar el posible efecto anti fúngico y lograr cumplir los objetivos de estudio.

Instrumentos y Técnicas de recolección

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

Fase I. Adquisición de la materia vegetal:

Esta fue obtenida en la industria la Casa del Condimento con las especificaciones necesarias de pureza del material, se excluye cualquier otro tipo de planta y las partes que sean distintas a las hojas del orégano y tomillo (se utilizan únicamente las partes aéreas secas de la droga vegetal).

Fase II. Extracción de los Aceites Esenciales:

Esto se realiza mediante tres métodos: hidrodestilación, Dean-Stark, y soxhlet los cuales se ejecutan en el mismo día, hora, temperatura y tiempo del proceso, con el fin de comparar y determinar el mejor método de extracción de aceites esenciales. Se procede a describir el equipo utilizado y el método empleado para el desarrollo experimental del presente trabajo de investigación.

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

- Tomillo 100 gramos
- Soportes
- Prensas
- Mangueras
- Calentador eléctrico
- Balón de 1L
- Condensador
- Beaker 600mL
- Pastilla de agitación
- Balanza electrónica digital
- Agua destilada
- Pizeta
- Termómetro

- Espátula
- Embudo separador
- Kitasato

Procedimiento del método de hidrodestilación

Se pesó en una balanza granetaria el material vegetal aproximadamente 100 gramos de tomillo en un beaker de 200mL se coloca en un balón defondo plano de 1L, seguido de la adición de 500mL de agua destilada medidos en una probeta de 500ml.

Se procedió a colocar el equipo de destilación, se ensambló el balón y se aseguró que las mangueras de entrada y salida estén donde corresponden y se revisó que las prensas aseguren bien.

Se gradúa la temperatura 300 °C y a 100 revoluciones por minuto, hasta que inicie el proceso de ebullición y en sí el proceso de destilación. A partir del momento cuando se observó la primera destilación se bajó la temperatura a 250 °C y se dejó que continuara por un tiempo de 3horas.

Se recogió el destilado en un beaker de 600mL, al transcurrir el tiempo se apagó el equipo.

Figura 12. Proceso de Hidrodestilación



Fuente: Autor.

Método por soxhlet

Material y equipo

- Tomillo 100mg
- Balanza electrónica
- Agitador calentador magnético
- Agua destilada
- Balanza electrónica digital
- Aparato de extracción continua Soxhlet
- Condensador
- Balón de 500 mL
- Pizeta
- Pastilla de agitación
- Soporte
- Prensas

Procedimiento del método por soxhlet

En balanza granataria, se pesaron dos muestras de 50 gramos del material vegetal y se colocaron cada una en un aparato de extracción continua Soxhlet, desde una probeta de 100 mL se adicionaron 250 mL en balones de fondo plano con capacidad de 500 mL.

Se ensambló el soxhlet y se asegura que las mangueras de entrada y salida estén donde corresponden y se revisó que las prensas aseguren bien el equipo.

Se graduó la temperatura del calentador al máximo 300°C, hasta que el disolvente alcanzó la temperatura adecuada, para iniciar la extracción. A partir del momento cuando se observó la primera recirculación, se bajó la temperatura y se dejó que continuara la extracción por un tiempo de 3 horas.

Transcurrido ese tiempo se apagó el calentador y se dejó enfriar el sistema a temperatura ambiente.

Figura 13. Equipo Soxhlet para la Extracción Continua



Fuente: Autor

Concentración y obtención del aceite esencial

Se colocó el embudo separador en la base.

Al destilado o extracto se le realizó 3 lavados con cloroformo, para esto se colocó aproximadamente 300mL del destilado o extracto en el embudo separador de 500mL con 15mL de cloroformo.

Se agitó el contenido suavemente y se deja reposar por 10 minutos hasta observar cómo se separa el agua del cloroformo por diferencia de densidades el cual la fase orgánica se sitúa en la parte inferior.

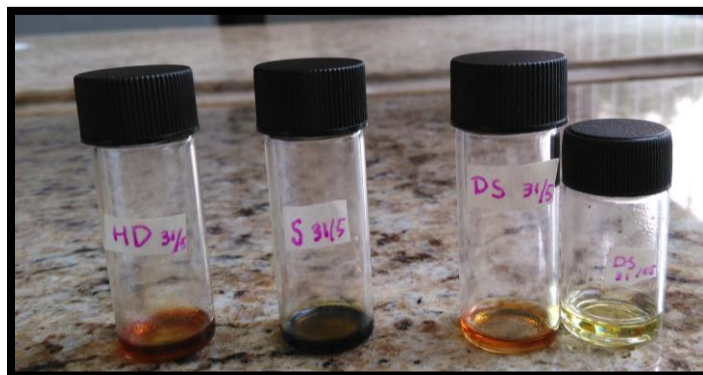
Se recogió el cloroformo con el aceite esencial ya que el aceite es miscible con la sustancia orgánica.

Se procedió a concentrar el aceite, mediante baño maría y disminuyendo la presión de vapor del disolvente utilizado, en este caso cloroformo, hasta observar un residuo oleoso y de color característico del aceite.

Se recogió la muestra de aceite esencial en viales de 11mL, posteriormente pesado.

Se procede a calcular el porcentaje de rendimiento.

Figura 14. Apariencia de los Aceites Esenciales Extraídos a Través de los Métodos Empleados



Fuente: Autor

Método Dean-Stark

Material y equipo

- Tomillo 100 gramos
- Soportes
- Prensas
- Mangueras
- Agitador calentador magnético
- Balón de 1L
- Condensador
- Beaker 600mL
- Pastilla de agitación
- Agua destilada
- Pizeta
- Termómetro
- Espátula

- Trampa (Dean Stark)

Procedimiento del método Dean Stark

Se pesó el material vegetal aproximadamente 100gramos de tomillo en un beaker 600mL se colocón un balón de 1L con 500mL de agua destilada.

Se procedió a colocar el equipo de destilación, se ensambló el balón y se asegura que las mangueras de entrada y salida estén donde corresponden y se revisó que las prensas aseguren bien.

Se gradúo la temperatura a 300°C máximo y a 100 revoluciones por minuto, hasta que empiece el proceso de ebullición y en sí el arrastre por vapor. A partir del momento cuando se observó la primera destilación se bajó la temperatura a 250°C y se dejó que continuara por un tiempo de 3horas.

Se recolectó el aceite y el agua en la trampa que por diferencia de densidad el aceite queda en la parte superior y se va eliminando el agua.

Se recogió la muestra de aceite esencial en viales de 11mL, posteriormente pesado y se procedió a calcular el porcentaje de rendimiento.

Figura 15. Equipo Utilizado para la Hidrodestilación Adaptado con un Aparato Dean-Stark



Fuente: Autor

Fase III. Pruebas de Identificación de Compuestos

Son necesarias para determinar la presencia de grupos químicos con posible actividad anti fúngica presentes en los aceites esenciales o extractos. Esto se realizó mediante espectroscopia infrarrojo, cromatografía de gases acoplada a masas y la prueba cualitativa de Liebermann-Buchard.

Espectroscopia IR

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

Figura 16. Espectrofotómetro Infrarrojo Empleado en la Caracterización de las Muestras de Aceite Esencial de Óregano y Tomillo



Fuente: Autor

Cromatografía de gases acoplada a masas

Se hicieron correr las muestras del aceite esencial del orégano y tomillo por el cromatograma de gases acoplado a masas en las condiciones especificadas en la figura 13.

Figura 17. Condiciones Cromatográficas Extractos Naturales Flash

Parámetro	Especificación	Parámetro	Especificación
<i>Método</i>	Extractos Naturales Flash	<i>Split</i>	10:1
<i>Tipo de columna</i>	HP-5MS	<i>Flujo del split</i>	10,1 mL/min
<i>Fase móvil</i>	Helio UAP (He)	<i>Tiempo de corrida</i>	29.33 min
<i>Flujo de fase móvil</i>	1 mL/min	<i>Temperatura del detector</i>	280 °C
<i>Temperatura puerto de inyección</i>	270 °C	<i>Flujo total del puesto de inyección</i>	13,9 mL/min
<i>Presión del puerto de inyección</i>	0,637 bar		

2.1.2. Programa del horno

Razón (°C/ min)	Temperatura Final (°C)	Tiempo en espera (min)
0	75	2
15	200	3
20	280	3
5	300	5

Fuente: Autor

Prueba de Liebermann-Buchard

Materiales, equipo y reactivos utilizados en la identificación de triterpenos y esteroides

- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Goteros
- Beaker
- Alcohol etílico
- Ácido sulfúrico concentrado
- Anhídrido acético
- Aceite esencial de tomillo

Figura 18. Materiales y Reactivos Utilizados para la Prueba de Liebermann-Buchard



Fuente: Autor

Método de Liebermann-Buchard

En un tubo de ensayo se colocó 5gotas de aceite esencial con un 1mL de alcohol etílico.

Se agregó 3gotas de anhídrido acético y 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

Se agitó suavemente y se anotó el cambio de color.

Este procedimiento se realizó para cada muestra de tomillo obtenido por los tres diferentes métodos aplicados.

Fase IV. Pruebas Microbiológicas

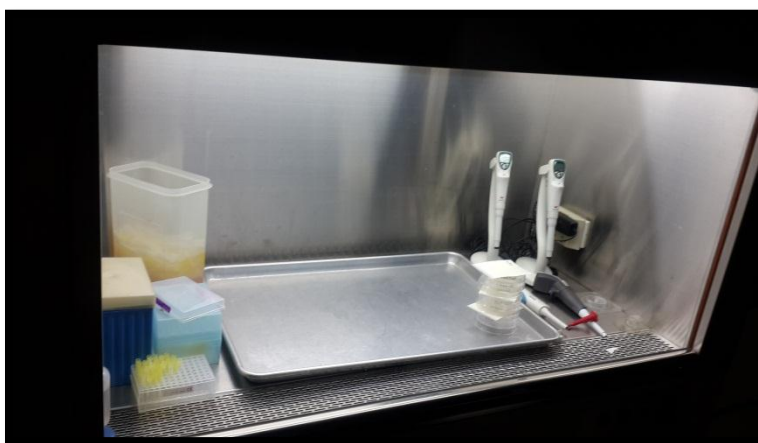
En este caso se efectuaron pruebas del microorganismo de estudio en el laboratorio microbiológico Microlabs, encontrado a 125 metros sur de la escuela Pilar Jiménez, en Guadalupe.

Materiales, equipo y reactivos utilizados en la prueba microbiológica

- Medio de cultivo con la Cepa *C. albicans*
- 10 placas Mueller Hinton
- Hisopos
- Micropipeta 10-100 µl

- Micropipeta de 5 -10 μ l
- Diluciones del aceite de tomillo y oregano a 75 %, 50 %, 25 %, 12.5 % y 7.5 %
- Base de la formulación elaborada
- Tubos de ensayo
- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Regla

Figura 19. Cámara de Flujo Laminar



Fuente: Autor

Procedimiento de la prueba microbiológica

Con ayuda de una micropipeta de 100 μ l, se realizan las diluciones tanto de aceite de orégano como tomillo a concentraciones de 75 %, 50 %, 25 %, 12.5 % y 7.5 %, en tubos de ensayo, utilizando como diluyente la base de la formulación del enjuague bucal.

En cada placa de Mueller Hinton se realizó un pequeño hoyo y se procedió a inocular con un hisopo toda la placa con el medio de cultivo que contenía el microorganismo.

Con la micropipeta se recogió una muestra aproximadamente de 5 μ l de cada una de las concentraciones y se procedió a colocarlas en cada uno de los hoyos.

Se selló la placa y se colocó en la incubadora por un periodo aproximado de 24h.

Con una regla se midieron los halos formados de inhibición.

Fase V. Formulación del Producto

Es la última fase experimental de la investigación se procedió a elaborar un enjuague bucal anti fúngico.

Material y equipo utilizado para la preparación de un enjuague bucal anti fúngico.

- Balanza electrónica digital
- Beakers de 80 y 600 mL
- Probeta 25 y 100mL
- Agitador de vidrio
- Espátula
- Tween 80
- Mentol
- Salicilato de metilo
- Sacarina sódica
- Alcohol etílico 95%
- Agua tridestilada
- Extracto de tomillo y orégano

Figura 20. Equipo Empleado para la Elaboración del Enjuague Bucal Anti Fúngico



Fuente: Autor

Figura 21. Material para la Formulación del Enjuague Bucal Anti Fúngico



Fuente: Autor.

Procedimiento de la formulación

Se pesó 0.1g de salicilato de metilo y mentol en un beaker de 80mL se agregó 10mL de alcohol etílico al 95%, se agitó suavemente con el extracto del aceite.

Se pesó 0.30g de sacarina sódica y 0.50g de tween 80 en un beaker de 80mL se adicionó una cantidad de 20mL de agua tridestilada.

Se mezcla ambas soluciones con agitación, se lleva a una capacidad de 200mL.

Figura 22. Apariencia de la Forma Farmacéutica Desarrollada Enjuague Bucal



Fuente: Autor

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

Extracción del aceite esencial de tomillo

Una vez culminado los procesos de extracción del aceite esencial de tomillo mediante las técnicas de hidrodestilación, trampa Dean-Stark y soxhlet se obtienen los resultados mostrados en el Tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de Rendimiento Obtenido Mediante Hidrodestilación, Trampa Dean-Stark y Soxhlet

Método de extracción	Promedio %de rendimiento
Hidrodestilación	0.27%
Trampa Dean-Star	0.71%
Soxleht	0.12%

Fuente: Autor

En la literatura consultada los autores reportan distintos rangos de rendimiento teórico para el aceite esencial, el cual generalmente ronda entre 1% a 2.5%. Estos valores dependerán de muchos factores, como: el origen, la especie, las condiciones ambientales, climáticas y del crecimiento de la planta también como la técnica de extracción empleada.

Los rendimientos obtenidos mediante las tres técnicas aplicadas se encuentran fuera del rango teórico, sin embargo, se puede observar que el método de la trampa Dean-Stark el porcentaje de rendimiento es mayor que los obtenidos por los dos otros métodos y el más cercano al valor teórico reportado en la literatura. Esto se puede deber a que en este método la obtención del aceite es inmediato y no se realiza extracciones con solventes orgánicos para su obtención, el proceso de recolección es más corto, así se disminuye la pérdida de la muestra. Es importante enfatizar que en este método se obtiene el aceite puro con un color amarillo y olor característico.

Por otra parte el fundamento de la técnica de hidrodestilación es similar a la de la trampa Dean-Stark, a pesar de esto el rendimiento es notoriamente más bajo ya que al realizar más

procedimientos como la extracción con solvente orgánico y la ebullición al vacío, se pierde cantidad de la muestra.

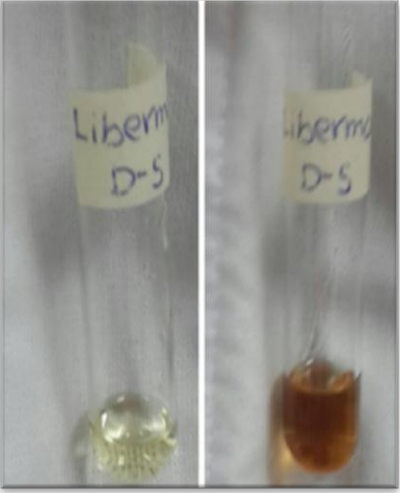
Además, el rendimiento que presenta el tomillo mediante el método de Soxhlet fue el más bajo, de apenas un 0,12%, observándose que la muestra presenta un color verde oscuro no característico, por razón que este método no solo extrae compuestos volátiles presentes en el aceite esencial, sino que también pigmentos de coloración verde del material vegetal.



Prueba cualitativa Liebermann-Buchard

Esta prueba se realiza para el aceite esencial de tomillo obtenido de los tres métodos empleados para su extracción. De acuerdo con la literatura se menciona que la muestra manifestará tonalidades verdes o azul cuando están presente esteroides y rojizos en presencia de terpenos.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Resultados Obtenidos al Realizar la Prueba de Liebermann-Buchard Utilizando el Aceite Esencial de Tomillo

Método	Color inicial	Cambio de color con prueba	Imagen
Dean-Stark	Amarillo pálido	Rojizo	

Hidrodestilación	Amarillo oscuro	Rojizo	
Soxhlet	Amarrillo	Verde oscuro	

Fuente: Autor

Con respecto a los resultados obtenidos en el laboratorio y con la literatura consultada se observa que la reacción de Liebermann-Bucher da positiva para la presencia de triterpenos en los métodos de hidrodestilación y Dean-Stark y Soxhlet.

Análisis cualitativo por espectroscopia infrarrojo de los aceites del tomillo y orégano

Figura 23. Espectro IR Obtenido de una Muestra del Extracto de Tomillo

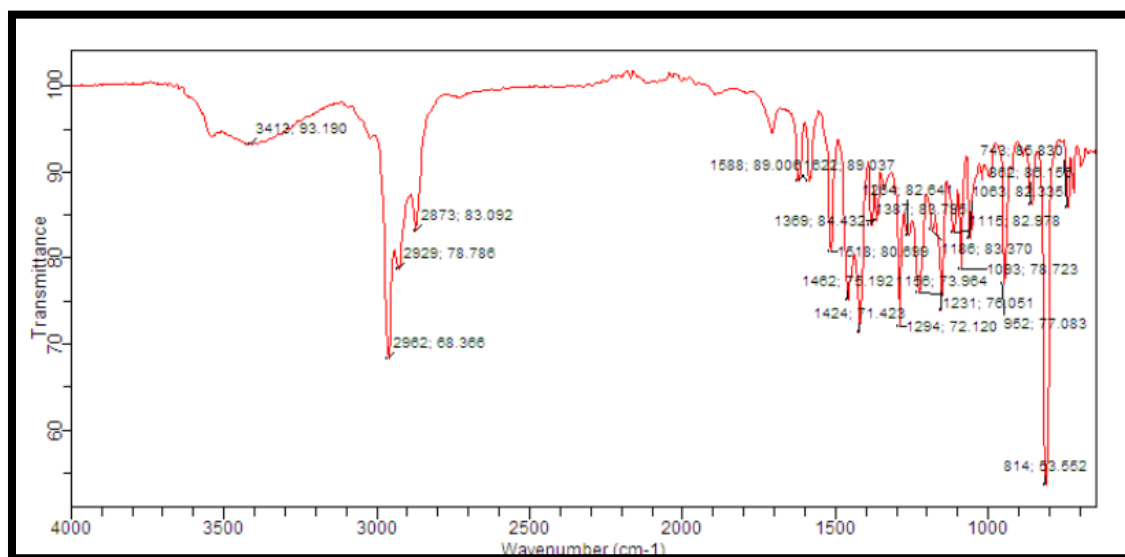
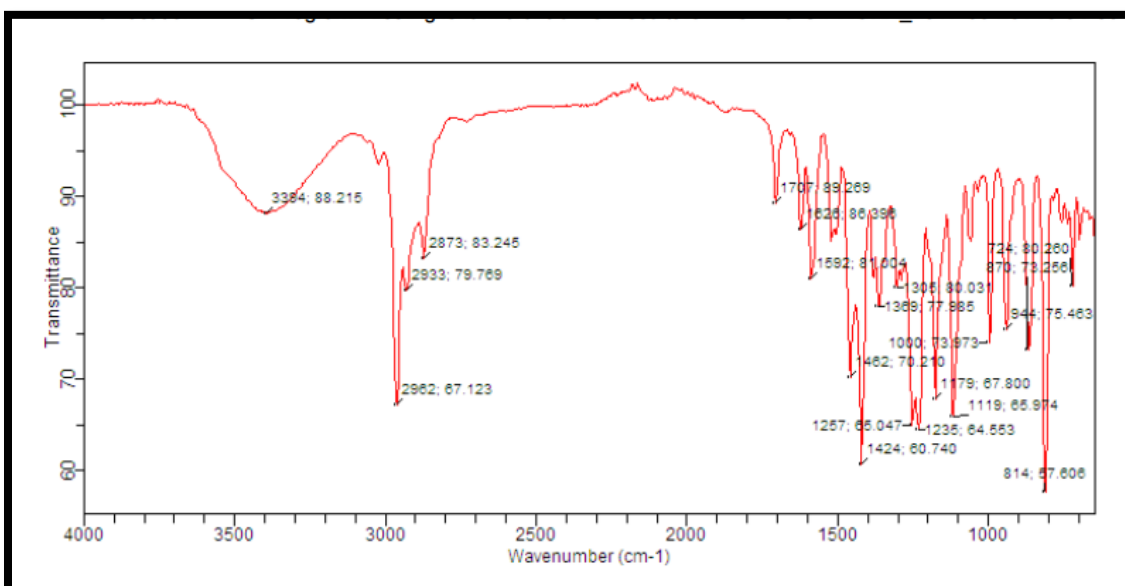


Figura: Autor

Figura 24. Espectro IR Obtenido de una Muestra del Extracto de Orégano



Fuente: Autor

De las señales obtenidas en el espectro infrarrojo FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometer), expuestas en las figuras, se procede a enlistar las señales más representativas en el caso del tomillo y orégano, según el grupo funcional al que corresponda.

Tabla 5. Señales Obtenidas en el Espectro IR de los Extractos de Tomillo, como los Grupos Funcionales Responsables de las Mismas, Así como la Región de Absorción Teórica Correspondiente de Cada Señal

Tipo de muestra	Señal detectada cm^{-1}	Grupo funcionales	Región de absorción cm^{-1}
Extracto de tomillo	3413	Alcoholes OH	3400-3650
	2873	Alcano C-H	2850-2960
	1588	Alqueno C=C	1640-1680
	1424	Aromático	1660-2000 1450-1600

Fuente: Autor

Tabla 6. Señales Obtenidas en el Espectro IR de los Extractos de Orégano, como los Grupos Funcionales Responsables de las Mismas, Así como la Región de Absorción Teórica Correspondiente de Cada Señal

Tipo de muestra	Señal detectada cm^{-1}	Grupo funcionales	Región de absorción cm^{-1}
Extracto de orégano	3388	Alcoholes OH	3400-3650
	2929	Alcano C-H	2850-2960
	1626	Alqueno C=C	1640-1680
	1424	Aromático	1660-2000 1450-1600

Fuente: Autor

Con base en los resultados obtenidos en el espectro de infrarrojo de la muestra de aceite esencial del tomillo y orégano, se observa la primer señal de importancia en el caso del tomillo en 3413cm^{-1} y del orégano en 3388cm^{-1} , la cual según la tabla 5 corresponde a un hidroxilo (O-H) característico de grupo fenol presente en las moléculas ya sea de carvacrol o timol encontrado en las dos plantas. La región comprende aproximadamente entre $3400\text{-}3650\text{ cm}^{-1}$ y se caracteriza por mostrar una señal amplia.

Otra señal que claramente se puede establecer en el rango de $2850\text{-}2960\text{ cm}^{-1}$ es la tensión del alcano C-H sp^3 , donde ambos aceites revelan la señal en 2873cm^{-1} para el tomillo y 2929 cm^{-1} para el orégano.

Se detecta además una señal del tomillo en 1588 cm^{-1} y del orégano en 1626 cm^{-1} , correspondiente de un C=C aromático . La región característica de este es al alrededor de los $1640\text{-}1680\text{ cm}^{-1}$.

Por último y una de las señales más útiles que se obtuvieron fue la del grupo isopropilo presentes en ambas aceites, dieron una señal en 1424 cm^{-1} , debido a que la región característica para este grupo funcional es cerca de $1450\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$.

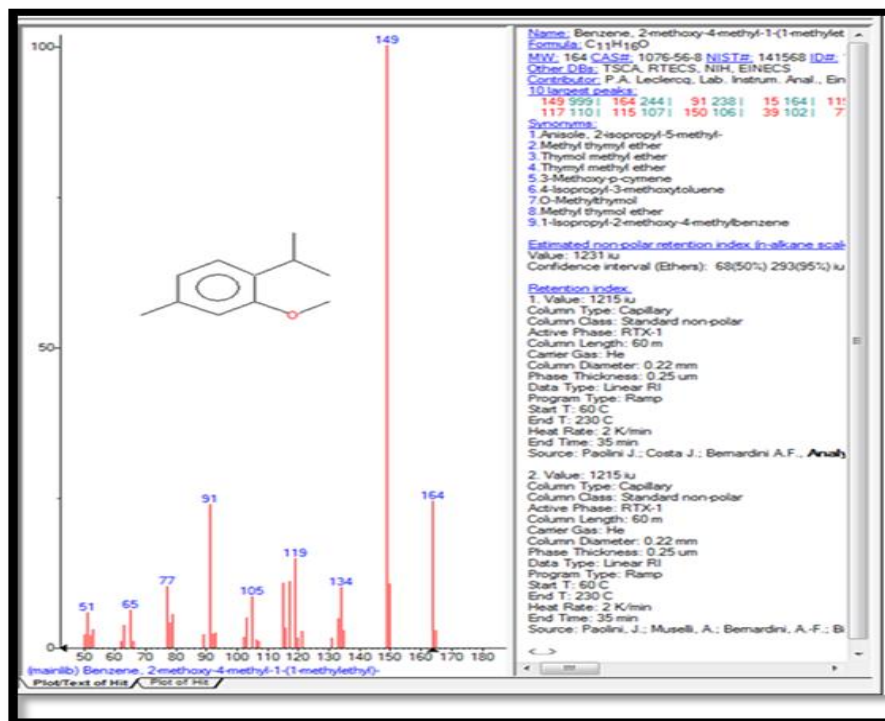
Tratar de interpretar por completo el espectro del infrarrojo es difícil debido a que casi todas las moléculas orgánicas tienen distintos movimientos de vibración de enlace y movimientos de doblamiento, por lo tanto, múltiple cantidad de absorciones.

Sin embargo, no es necesario interpretar todos las señales mostradas en un espectro, para obtener la información necesaria basta con identificar los grupos funcionales más representativos de la molécula para establecer la presencia de los compuestos de interés.

En este caso los componentes que se necesitaba identificar son el carvacrol y el timol. Dichas estructuras concuerdan con los resultados obtenidos en el espectro de infrarrojo, al existir compuestos aromáticos y alcoholes.

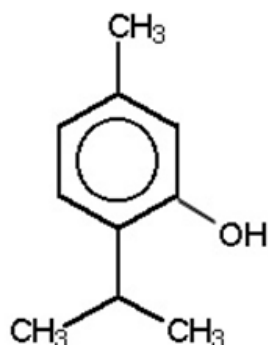
Análisis de cromatografía de gases acoplada a masas

Figura 25. Cromatograma de Gases Molécula de Timol Metil Éter

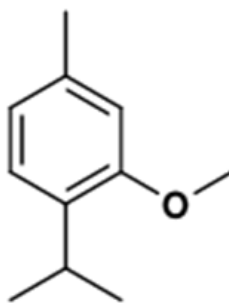


Fuente: Autor

Mediante los espectros de gases obtenidos en el análisis aplicado a las muestras de los aceites esenciales adquiridos por las distintas técnicas de extracción en el laboratorio y basándose en una estructura la cual presenta gran similitud con el timol, y tomando en cuenta el pico de masa, se encuentra que su peso molecular es de 164g/mol y refiere su nombre a (timol metil éter), presentando correlación con la base de datos en un 74.5%, por lo tanto, se puede deducir la presencia de timol en el aceite y que el posible efecto antimicrobiano es atribuido a éste como lo menciona el autor Labib *et al*, (2015, p.3350).

Figura 26 . Estructura Química Timol

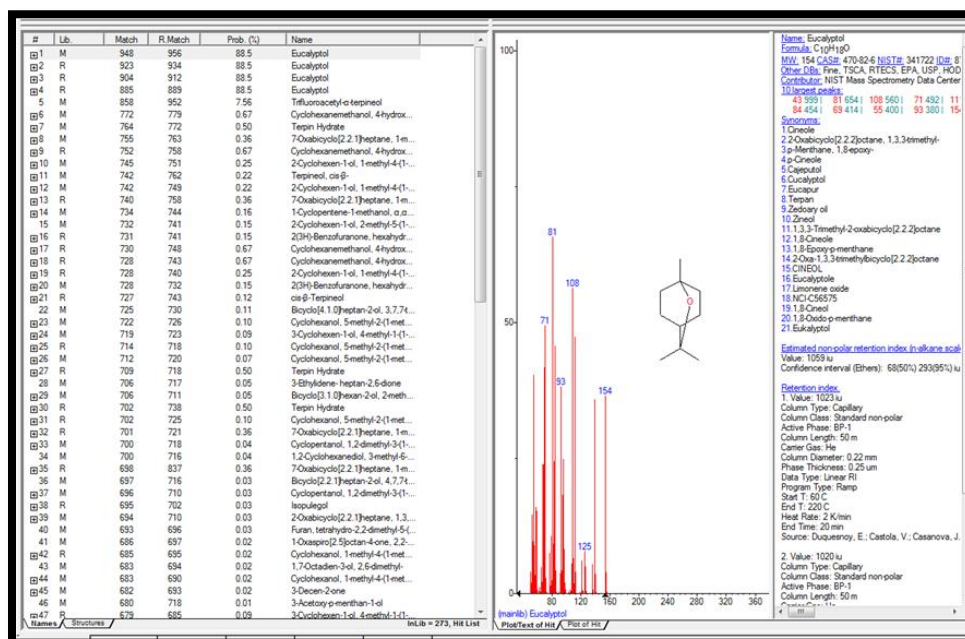
Fuente: Google imágenes

Figura 27. . Estructura Química del Éter de Metilo del Timol

Fuente: Google imágenes

Por otra parte es importante mencionar que la estructura (timol metil éter), la cual presenta la gran similitud con el timol se encontró en la muestra adquirida utilizando el aparato Dean-Stark, lo que evidencia que esta técnica por elección es la más conveniente ya que en la hidrodestilación se encuentran algunos triterpenos, derivados del aceite esencial, pero no evidencia de timol o carvacrol que son las estructuras de interés en el estudio.

Figura 28. Cromatograma de Gases Presencia de la Molécula de Eucaplitol



Fuente: Autor

Un dato importante o de interés que se observa también en el cromatograma es la estructura de eucaliptol con un 88.5% similitud con la base de datos del equipo, esta estructura generalmente no forma parte del aceite de tomillo, sin embargo y según literatura consultada, las plantas son capaces de sintetizar y variar su composición dependiendo del medio y del estrés al que son sometidas, esto explica la posible presencia del eucaliptol en el aceite.

Prueba de sensibilidad anti fúngica de los aceites esenciales de tomillo y orégano frente a *C. albicans*

Para evaluar el potencial anti fúngico de los aceites esenciales de tomillo y orégano, se diluyeron estos en la base de la formulación elaborada a distintas concentraciones expresadas en porcentajes y mediante un antibiograma y luego de 24 horas de almacenamiento se observaron los siguientes resultados.

Figura 29. Halos de Inhibición Obtenidos con Diluciones al 75 % y 50 % del Aceite Esencial de Tomillo



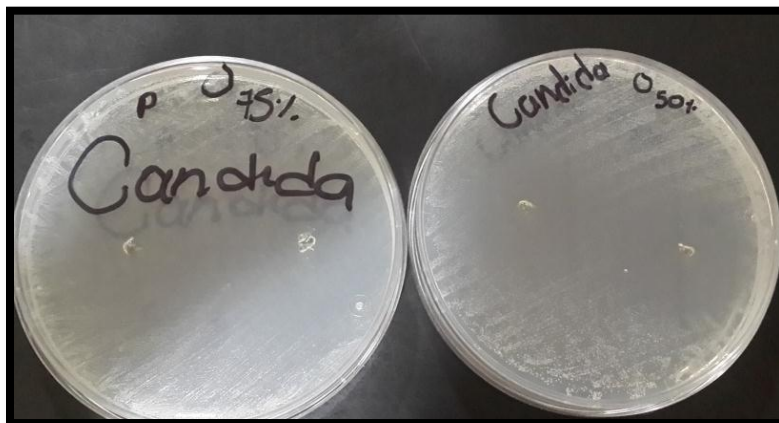
Fuente: Autor

Figura 30. Halos de Inhibición Obtenidos con Diluciones al 25 % ,12.5 % y 7.5 % del Aceite Esencial de Tomillo



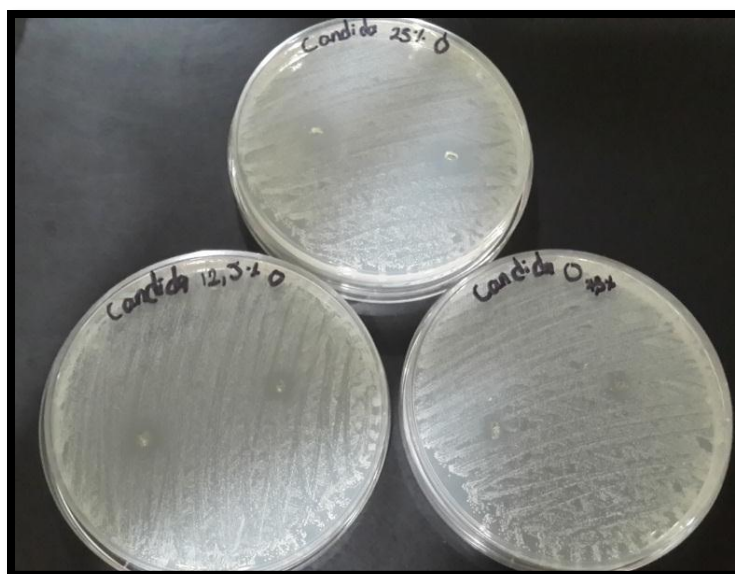
Fuente: Autor.

Figura 31. Halos de Inhibición Obtenidos con Diluciones al 75 % y 50 % del Aceite Esencial de Orégano



Fuente: Autor

Figura 32. Halos de Inhibición Obtenidos con Diluciones al 25 %,12.5 % y 7.5 % del Aceite Esencial de Orégano



Fuente: Autor

A partir de las figuras 29, 30, 31 y 32 se logró demostrar la potente actividad anti fúngica de los aceites esenciales de tomillo y órgano frente a la *C.albicans*, el cual se muestra como flora normal en el ser humano, se puede observar y medir la formación de los halos de inhibición presentes en la placa de Müller Hinton.

Tabla 7. Medidas Obtenidas de los Halos de Inhibición Formados por las Diluciones de los Aceites de Orégano y Tomillo a Diferentes Proporciones

Porcentaje de los aceites	Halos de inhibición debido a la dilución del aceite de orégano/mm	Halos de inhibición debido a la dilución del aceite de tomillo/mm
75%	40	28
50%	24	14
25%	12	4
12.5%	4	No presentó
7.5%	No presentó	No presentó

Fuente: Autor

Los resultados descritos en la tabla 6, revelan que la *C. albicans* es sensible a la esencia del orégano como también a la del tomillo. El potencial anti fúngico varía de acuerdo a las diluciones realizadas de los aceites, donde halos de inhibición con diámetros menores a 8mm según la escala de Duraffourd mencionado por el autor Quintanilla (2016), se interpreta como una cepa de levadura resistente.

Por lo tanto, se puede determinar que el valor aproximado de la concentración mínima inhibitoria del orégano es de 25% y la del tomillo es de 50%, ya que ambas disoluciones presentaron un halo de inhibición que superó los 8mm.

Por otra parte al comparar el potencial anti fúngico de los dos aceites en estudio frente a la *C. albicans* es notoriamente mayor el orégano que el tomillo pues a la misma concentración (75%) el orégano forma halos de 40mm y el tomillo halos de 28mm.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Después de realizar las técnicas de extracción del aceite esencial de tomillo mediante hidrodestilación, trampa Dean-Stark y Soxhlet, se determina que el mejor método para la obtención del aceite esencial es la trampa Dean-Stark al mostrar un porcentaje de rendimiento mayor que los otros dos métodos empleados.

El método por soxhlet es el menos apropiado para la obtención del aceite esencial por la razón de que en el proceso no solo extrae compuestos volátiles presentes en el aceite esencial, sino que también pigmentos de coloración verde del material vegetal, como por ejemplo clorofila.

De acuerdo con la prueba cualitativa, Liebermann-Buchard aplicada en las muestras del aceite esencial de tomillo obtenido mediante los tres métodos realizados, indica la presencia de triterpenos y esteroides.

El análisis de Infrarrojo demostró la presencia de grupos funcionales como anillos aromáticos, grupos O-H, lo que concuerda con la estructura de las moléculas de interés, como lo son el carvacrol y timol de los aceites esenciales en estudio.

Con base en los resultados obtenidos en la cromatografía de gases acoplado a masas, se detecta la estructura (timol metil éter), presentando correlación con la base de datos en un 74.5%, la cual presenta gran similitud con el timol molécula de interés.

Los aceites esenciales son una mezcla de compuestos y su composición varía según agentes externos del ambiente y estrés al que se allá sometido las plantas, por tanto, se explicaría la posible presencia de eucaliptol encontrado en el cromatogramas de gases.

De acuerdo con los resultados microbiológicos en general se concluyó que *C. albicans* se presenta sensible a los extractos de orégano y tomillo y que tiene mayor potencial antimicótico el aceite esencial de orégano comparado con el de tomillo.

Recomendaciones

Investigador:

Adquirir el material vegetal un establecimiento en donde certifiquen el origen y pureza de la misma.

Mejorar las características organolépticas para darle un aspecto atractivo a la formulación por ejemplo mejorar el sabor con enmascaradores.

Además es recomendable realizar pruebas de control de estabilidad y para observan cambios físicos de la formulación al pasar el tiempo.

Realizar estudios microbiológicos para determinar la capacidad antifúngica de estos aceites esenciales frente a otras especies de *Cándida* y bacterias patógenas, como por ejemplo: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, entre otras.

Otorgar relevancia a la medicina tradicional, enfocando estudios en productos fitofarmacéuticos con su adecuada posología, indicaciones y reacciones adversas.

Referencias

Albado E., Saez G., y Grabiél S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Médica Herediana*, 12(1), 16-19.

Arcila,C., Loarca,G., Lecona,S y González E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111.

Atinafu, D, y Bedemo, B. (2011). Estimación del contenido total de ácidos grasos libres y colesterol en algunos aceites comestibles comerciales en Etiopía, Bahir DAR. *Journal of Cereals and Oilseeds* recuperado: <http://www.academicjournals.org/journal/JCO/article-abstract/55D751E313>

Centro Nacional de Información de Medicamentos. (2002) Instituto de Investigaciones Farmacológicas, Facultad de Farmacia. Universidad de Costa Rica. Serie de Actualización Profesional 2002.

García, B., Rojo, M., García, V y Hernández, M. (2002). Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(3), 214-216.

García, C., Martínez, A., Ortega, J., y Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Revista Química Viva*, 2(9), 86-96.

García, J., Cantón, R., García, E., Gómez, L., Martínez, L., Rodríguez, C., Vila, J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicos_SensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf

Gutiérrez, M y Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor: boletín intexter (U.P.C.) N° 122. Recuperado de <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2014). Metodología de la Investigación. México: McGraw-Hill Interamericana S.A. pp. 21, 151, 152, 176.

Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. y Cavrini V. (2002). GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 691-700. Recuperado <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12093498>

Imelouane, B., Amhamdi, H., Wathelet, J. P., Ankit, M., Khedid, K., & El Bachiri, A. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. Int. J. Agric. Biol, 11(2), 205-208. Recuperado de [https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0,5&q=chemical+composition+of+the+essential+oil+of+thyme+\(thymus+vulgaris\)+from+eastern](https://scholar.google.es/scholar?hl=es&as_sdt=0,5&q=chemical+composition+of+the+essential+oil+of+thyme+(thymus+vulgaris)+from+eastern).

Inlago, M. (2014). Determinación de la actividad antimicótica in vitro del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) en comparación con la nistatina y el gluconato de clorhexidina al 0, 2% sobre cepas de *Candida albicans*. (Tesis de grado, Universidad central de Ecuador, Facultad de Odontología. Quito, Ecuador). Recuperada de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/2801/3/T-UCE-0015-85.pdf>

Javed, H., Erum, S., Tabassum, S., & Ameen, F. (2013). An overview on medicinal importance of *thymus vulgaris*. Journal of Asian Scientific Research, 3(10), 974. Recuperado de <http://www.aessweb.com/pdf-files/jasr-3%2810%29-974-982.pdf>

Lamarque, A. Zygadlo, J. Labuckas, D. López, L. Torres, M. Maestri, D. (2008). Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica. (Editorial Brujas). Recuperado de <https://books.google.co.cr/books?isbn=9871432097>.

López, K., Dzul, R., Lugo, C., Arias, J., y Zavala, E. (2016). [Una revisión. Rev Biomed]. Mecanismos de resistencia anti fúngica de los azoles en *Cándida albicans*.

Manou II, Bouillard L, Devleeschouwer MJ, Barel AO (1998). Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *Journal of Applied Microbiology* 271-278. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721641>

Martini, F., Timmons, M y Tallitsch, R. (2009). Anatomía Humana (sexta edición). Madrid, España.

Ministerio de Salud del Perú. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicobiana por el método de disco de difusión. Recuperado de http://190.102.152.73/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua_l%20sensibilidad.pdf

Monira, A y Naima, M. (2012). Evaluation of protective and antioxidant activity of thyme (*Thymus vulgaris*) extract on paracetamol-induced toxicity in rats. *Aust J Basic Appl Sci*, 6, 467-74. Recuperado de <http://ajbasweb.com/old/ajbas/2012/july/467-474pdf>

McMurry, J. (2008). Química Orgánica, 7ª edición. México, D.F.

Muñoz Centeno, L. M. (2002). Plantas medicinales españolas: *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) (orégano).

Murray, P., Rosenthal, K y Pfaller, M. (2008). Microbiología Médica. España: Elsevier. pp.556

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

Quintanilla, J. (2016). Efecto antibacteriano in vitro del carvacrol (aceite de orégano) sobre *Candida albicans*. *Revista de Investigación*, (5), 33.

Rodríguez, H. (2006). La utilidad de las plantas medicinales en Costa Rica. Heredia, Costa Rica. Editorial Universidad Nacional.

Rodríguez, J. (1998). *Micología médica*. Editorial de la Universidad de Costa Rica.

Rodríguez, J., Miranda, J., Morejón, H., y Santana, J. (2002). [Revisión bibliográfica. *Revista Cubana de Estomatología*]. *Candidiasis de la mucosa bucal*.

Shabnum, S y Wagay, M. (2011). Essential oil composition of *Thymus vulgaris* L. and their uses. *Journal of Research & Development*, 11, 83-94.

Skoog. (2011). *Principios de análisis instrumental* (novena edición). México DF. Pp.

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

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

Wade, Jr (2012). *Química Orgánica* (séptima edición). México D.F.