

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica**

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL ACEITE  
ESENCIAL *Thymus vulgaris* L. “Tomillo” FRENTE A *Porphyromonas*  
*gingivalis* ATCC 33277 CAUSANTE DE GINGIVITIS**

**TESIS**

**Presentada por:**

**Bach. EDUARDO RENÉ LAGOS LA ROSA**

**Para optar el Título Profesional de:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**TACNA – PERÚ**

**2012**

**UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN-TACNA**

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL ACEITE ESENCIAL  
*Thymus vulgaris* L. "Tomillo" FRENTE A *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 CAUSANTE  
DE GINGIVITIS**

TESIS

Presentado por:

Bach. EDUARDO RENÉ LAGOS LA ROSA


Para optar el Título Profesional de:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO**

Aprobado por: Unanimidad. ante el siguiente jurado.

  
Mgr. MARÍA DALILA SALAS DE CORNEJO

Presidenta

  
Mgr. JOSÉ CALLE MUNARRIZ

Miembro

  
Q.F. JUAN CARLOS CERVANTES ZEGARRA

Miembro

  
Q.F. ORLANDO RIVERA BENAVENTE

Asesor

## **DEDICATORIA**

A Dios, por guiarme en cada paso de mi vida, demostrándome su mano obradora en mí y por bendecirme siempre.

A mis padres, Dominga y Teodoro, que siempre me apoyaron y guiaron enseñándome a no rendirme jamás.

A mis hermanas Edith y Estrella, que con su ayuda incondicional me ayudaron a lograr mi meta.

A mi novia Milagros, sin su apoyo y comprensión no habría logrado esta meta a tí dedico mis alegrías.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por darme la vida.

Al Ing. Hipólito Limache Yufra, por brindarme su apoyo incondicional en la obtención de mi planta en estudio.

A mi asesor el Q.F. Orlando Rivera Benavente, por su apoyo, valiosa asesoría y consejos brindados en la realización del presente trabajo.

Al Blgo. Mblgo. Edwin Obando Velarde, por su tiempo brindado, paciencia, dedicación y su valiosa asesoría.

Unas vez más a mis padres, hermanas, novia y amigo (Porfirio) que me apoyaron incondicionalmente en lograr mis objetivos.

## CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I: EL PROBLEMA</b>	<b>5</b>
1.1 Planteamiento del Problema	5
1.2 Formulación del Problema	6
1.3 Justificación del Problema	6
1.4 Objetivos	7
1.4.1 Objetivo General	7
1.4.2 Objetivos Específicos	8
1.5 Hipótesis	8
1.6 Determinación de Variables	8
1.7 Operacionalización de Variables e Indicadores	9
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b>	<b>10</b>
2.1 Antecedentes	10
2.2 Bases Teóricas	14
2.2.1 Aceites Esenciales	14
2.2.1.1 Definición	14

2.2.1.2 Propiedades de los Aceites Esenciales	18
2.2.1.3 Localización y Distribución	18
2.2.1.4 Función en el vegetal	20
2.2.1.5 Composición química de los aceites esenciales	20
2.2.1.6 Extracción de los aceites esenciales	22
2.2.1.7 Destilación por arrastre de vapor	23
2.2.1.8 Usos de los aceites esenciales	24
2.2.2 <i>Thymus vulgaris</i> L. (Tomillo)	26
2.2.2.1 Hábitat y distribución geográfica	26
2.2.2.2 Descripción general	26
2.2.2.3 Clasificación taxonómica	28
2.2.2.4 Composición química del aceite esencial	28
2.2.2.5 Propiedades medicinales	31
2.2.2.6 Otros usos	34
2.2.3 Gingivitis	36
2.2.3.1 Definición	36
2.2.3.2 Factores locales	36
2.2.3.3 Factores sistémicos	37
2.2.3.4 Aspecto clínico	37
2.2.3.5 Cuadros clínicos	37
2.2.4 Descripción de la bacteria en estudio	38
2.2.4.1 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	38

a) Descripción	38
b) Clasificación científica	39
c) Factores de virulencia	40
d) Fisiopatología	42
e) Cuadros clínicos	42
<b>CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>44</b>
3.1 Lugar de estudio	44
3.2 Tipo de estudio	44
3.3 Unidades de estudio	44
3.3.1 Biológico	44
3.3.2 Microbiano	44
3.4 Material de laboratorio	44
3.5 Metodología	47
3.5.1 <i>Thymus vulgaris</i> L.	47
3.5.1.1 Recolección	47
3.5.1.2 Secado	47
3.5.1.3 Extracción y rendimiento del aceite esencial	47
3.5.2 Cepas	50
3.5.2.1 Recolección	50
3.5.2.2 Identificación del germen patógeno	50
3.6 Diseño experimental	51
3.6.1 Evaluación de la actividad del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L.	51

a) Preparación de los discos	52
b) Preparación del medio para la prueba de sensibilidad	54
c) Inoculación	54
d) Incubación	54
e) Lectura	55
3.6.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	55
A) Preparación de las diluciones del aceite esencial	55
B) Preparación del CMI (concentración mínima inhibitoria)	57
C) Preparación de inóculo bacteriano	60
D) Lectura	60
3.6.3 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)	60
3.7 Procesamiento y análisis estadístico	61
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b>	<b>62</b>
<b>CAPITULO V: DISCUSIÓN</b>	<b>71</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>78</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>80</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>89</b>

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. “Tomillo” frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causante de gingivitis. **Metodología:** Mediante el método de difusión en disco (Kirby Bauer), se conoció el grado de sensibilidad en función al tamaño del halo de inhibición; por el método de dilución en medio líquido se encontró la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y por difusión en agar se encontró la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial. **Resultados:** Se determinó que *Porphyromonas gingivalis* mostró ser muy sensible al aceite esencial. La CMI para *Porphyromonas gingivalis* es 0,31 mg/ml y CMB es 0,37 mg/ml. **Conclusión:** El aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. “Tomillo” presenta actividad antibacteriana sobre *Porphyromonas gingivalis* causante de gingivitis.

**Palabras clave:** *Thymus vulgaris*, aceite esencial, *Porphyromonas gingivalis*, halo de inhibición, CMI, CMB.

## ABSTRACT

**Objective:** Determination of the *in vitro* antibacterial activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. "Thyme" against *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causante of gingivitis. **Methodology:** Using the disk diffusion method (Kirby Bauer), it was learned the sensitivity according to the size of the zone of inhibition, by the dilution method in liquid medium was found the minimum inhibitory concentration (MIC) and broadcast agar met the minimum bactericidal concentration (MBC) of the essential oil. **Results:** It was found that *Porphyromonas gingivalis* was shown to be very sensitive to the essential oil. The MIC *Porphyromonas gingivalis* is 0.31 mg / ml and MBC is 0.37 mg / ml. **Conclusion:** The essential oil of *Thymus vulgaris* L. "Thyme" exhibits antibacterial activity of *Porphyromonas gingivalis* causing gingivitis.

**Keywords:** *Thymus vulgaris*, essential oil, *Porphyromonas gingivalis*, inhibition zone, MIC, MBC.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales, como parte del legado de la Medicina Tradicional Peruana, herencia de tiempos precolombinos, sigue siendo la primera instancia de consulta y tratamiento en nuestro país. Presenta una flora variada calculada aproximadamente en 80, 000 especies, ya que contamos con 28 climas de los 32 existentes en el planeta, y 84 de las 103 zonas de vida reconocidas en la tierra.<sup>(6)</sup>

En el Perú, en 1989 se logró por Resolución Ministerial aprobar el listado de recursos terapéuticos vegetales para ser usado en los centros asistenciales del antes Instituto Peruano de Seguridad Social (IPSS), hoy Seguro Social de Salud (EsSALUD), sin embargo no logró el impacto necesario en los profesionales de la salud para su utilización debido, entre muchas causas, al desconocimiento de la acción terapéutica acompañada de una experiencia clínica confiable con un soporte de control toxicológico de las plantas medicinales mencionadas que generó mucha desconfianza entre los galenos.<sup>(38)</sup>

El uso de las plantas medicinales y la medicina tradicional ha sido reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que reconoce su importancia en los sistemas de salud en muchos países en vías de desarrollo, instando a los estados y miembros a hacer estudios de las plantas medicinales utilizadas por los curanderos tradicionales y la población para determinar aquellos que tengan un efecto satisfactorio, de manera de incluirlas en la Farmacopea Nacional.<sup>(45)</sup>

La medicina tradicional tiene importancia por sus grandes aportes a la medicina moderna, los pobladores dan solución a muchos de los problemas de subsistencia y conservación de la salud física y mental, aplicando conocimientos adquiridos de sus antepasados acerca de las plantas con actividad terapéutica. La abundancia y gran diversidad de estas plantas en forma silvestre y su fácil comercialización por los bajos costos que tienen, posibilitan su adquisición por las personas más necesitadas y para sustituir a los medicamentos de síntesis de altos costos. Actualmente es material básico para la formulación de nuevas drogas o para formular modelos de compuestos farmacológicamente activos.<sup>(12)</sup>

Las plantas medicinales han sido consideradas a través de los años como el origen o punto de partida del desarrollo de los medicamentos, ya que han contribuido grandemente al descubrimiento de nuevas sustancias con actividad biológica y a la producción de fitofármacos siendo muy peculiar su uso en forma de droga seca, extracto acuoso o decocción. Es la fuente de medicamentos más económica y de mayor disponibilidad para la mayoría de los países.

Reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que el 80 % de la población mundial conoce de las ventajas y uso de la utilización de medicamentos sobre plantas medicinales en la atención primaria de salud, pero también indican que los estudios existentes sobre dichas plantas son insuficientes para aceptar su uso de forma masiva, por lo cual ha orientado protocolos científicos para el desarrollo de fitofármacos, de manera que los ensayos farmacodinámicos y toxicológicos siempre antecedan a la experimentación clínica.<sup>(54)</sup>

Una de estas plantas empleada con fines medicinales cuya siembra y cosecha están en proceso de estudio por parte de la Dirección Regional Sectorial de Agricultura Tacna en la provincia de Tarata es el "Tomillo", tradicionalmente utilizado en la medicina popular como astringente, expectorante, digestivo, antihelmíntico, antiespasmódico, antitusígeno, antiséptico y antifúngico. Propiedades farmacológicas de los diferentes extractos y aceites esenciales de tomillo fueron estudiados en detalle y trajo importantes contribuciones a la industria (principalmente como aditivo para los alimentos) y los usos medicinales de la planta. <sup>(36)</sup>

De hecho, en el siglo XIX y primera mitad del XX, cuando todavía no se conocían los antibióticos, el tomillo era considerado como un eficaz desinfectante. Tiene actividad antibacteriana frente a gérmenes gran positivos y gran negativos. Por su actividad antiséptica, el tomillo también tiene interés como antiséptico de la cavidad bucofaríngea, así como para el lavado de heridas. <sup>(43)</sup>

El término aceite esencial, o esencia, presenta muchas dificultades cuando se busca una definición que generalice este concepto. Existen definiciones desde el punto de vista químico, botánico y desde una perspectiva industrial. Todas coinciden en aspectos como su insolubilidad en agua, que pertenecen al metabolismo secundario de las plantas, que están formadas por varios compuestos químicos de estructura diferente y que en su composición poseen algún terpenoide. <sup>(56)</sup>

La mayoría de los compuestos con actividad antibacteriana encontrados en especies vegetales, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides; los cuales en su mayoría son identificados como metabolitos secundarios, enzimas hidrolíticas (glucanasas, citinasas) y proteínas. <sup>(28)</sup>

Las enfermedades gingivales son una amplia familia de patologías diferentes y complejas, que se encuentran confinadas a la encía y son el resultado de diferentes etiologías. El interés por las alteraciones gingivales se basa no tanto en su gravedad, sino en su enorme prevalencia entre la población. Las enfermedades gingivales forman un grupo heterogéneo, en el que se pueden ver problemas de índole exclusivamente inflamatoria, pero también alteraciones de origen genético, traumático o asociadas a alteraciones sistémicas. La gingivitis es la primera forma de enfermedad periodontal y se define como una condición inflamatoria de los tejidos gingivales que están alrededor del diente.<sup>(32)</sup>

Uno de los métodos preventivos del control de patologías dentales está dirigido al control de la formación de la placa dental, para así lograr reducir la presencia del agente patógeno, por lo que se está realizando estudios sobre sustancias naturales que posean propiedades farmacológicas antibacterianas.<sup>(14)</sup>

El uso de plantas con fines terapéuticos es de gran utilidad, ya que de ellas se pueden obtener innumerables sustancias químicas con propiedades específicas que puedan ayudarnos a prevenir o tratar enfermedades, a partir de una fuente de materia prima más económica y natural y con pocos efectos adversos, que puedan ser más fácilmente aceptados por la población.<sup>(38)</sup>

La finalidad en la presente investigación es conocer y demostrar científicamente el efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* frente a la bacteria patógena *Porphyromonas gingivalis*, contribuyendo a que se tenga referencia para proyectos en el campo farmacéutico para el uso adecuado de plantas medicinales.

# **CAPÍTULO I**

## **EL PROBLEMA**

### **1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los cuadros de inflamación gingival sin alteración del periodonto subyacente se detectan con elevada frecuencia entre la gente. Se establece que es visible en un rango de 20-50%, variando según la edad de los individuos, su sexo y su raza. La gingivitis puede detectarse en un 50% de los individuos mayores de 19 años, valor que va disminuyendo conforme aumenta la edad. La presentan el 54% de los individuos entre 19 y 44 años, el 44% de los sujetos entre 45 y 64 años y el 36% de las personas de más de 65 años.

Sólo el 15% de la población de más de 19 años no presenta ningún tipo de alteración ni gingival ni periodontal, lo cual pone de manifiesto la trascendencia del problema ante el que nos hallamos. <sup>(27)(19)</sup>

En nuestro medio es importante la realización del estudio etnomedicinal ya que forma parte del acervo cultural de nuestra región, es decir, de conocimientos y prácticas que se han heredado de generación a generación. Dentro de las prioridades en investigación en salud en el Perú está el encontrar alternativas que promuevan o faciliten el acceso a la salud para todos en la costa, sierra y selva del Perú. <sup>(1)</sup>

El tema de las plantas medicinales es un tema multidisciplinar, siendo necesaria la actuación conjunta de Químicos, Médicos, Farmacéuticos, Biólogos, Ingenieros Agrónomos y Agrícolas, Botánicos y Agricultores, los cuales son los profesionales responsables de la seguridad, desde la producción de la materia prima hasta su consumo final para que los principios activos, producidos a partir de estas plantas puedan ser usados con eficacia y sin riesgos de los consumidores. <sup>(46)</sup>

Con el fin de intentar paliar esta problemática, se consideró en el presente trabajo el uso del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* como un tratamiento alternativo por su bajo costo y su eficacia demostrada en el presente trabajo.

## 1.2 FORMULACION DEL PROBLEMA

¿El aceite esencial *Thymus vulgaris L.* “Tomillo” tendrá actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277* causante de la gingivitis?

## 1.3 JUSTIFICACION DEL PROBLEMA

En la actualidad se está dando una expansión muy grande de las plantas medicinales por diferentes razones o factores, como el alto coste de los medicamentos sintéticos o la falta de acceso a los agentes quimioterapéuticos para una gran parte de la población. Es por ello que los consumidores prefieren consumir cada vez más productos de origen natural, principalmente por la falta de indicaciones de los efectos colaterales que pueden producir los medicamentos sintéticos. <sup>(34)</sup>

A nivel mundial cerca del 80% aún depende de la medicina herbolaria para atenuar sus dolencias y enfermedades. El Perú no es ajeno a esta situación, ya que cuenta con una gran diversidad en su flora, donde habría alrededor de 80 mil especies vegetales (20 % de las existentes en la tierra), y de las cuales solamente 2,000 se vienen empleando con fines curativos. Siendo necesario evaluar las propiedades medicinales de estas plantas. <sup>(54)</sup>

El interés por las alteraciones gingivales se basa no tanto en su gravedad, sino en su enorme prevalencia entre la población. *Porphyromonas gingivalis* es el patógeno que está presente en diversas formas de patologías periodontales. Sus múltiples factores de virulencia la hacen sumamente agresiva. La presentan el 54% de los individuos entre 19 y 44 años, el 44% de los sujetos entre 45 y 64 años y el 36% de las personas de más de 65 años. Los índices de gingivitis en hombres son un 10% mayor que en mujeres, independientemente de la edad. <sup>(32)(49)</sup>

El *Thymus vulgaris L.* "tomillo" se constituye en una de las especies vegetales útiles del sector altoandino; pero debido al desconocimiento de la población sobre los beneficios de esta planta medicinal es necesario investigar este recurso, para apreciar su utilización con fines terapéuticos para beneficio de nuestra población.

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial *Thymus vulgaris L. (Tomillo)* frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

#### 1.4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Extraer aceite esencial de hojas, tallos y flores de *Thymus vulgaris L.* por arrastre a vapor.
- Evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* “tomillo”, por la técnica del antibiograma de Kirby-Bauer.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* frente a *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277.*
- Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* frente a *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277.*
- Relacionar el efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* frente a la bacteria de prueba con su composición fitoquímica.

#### 1.5 HIPOTESIS

El aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* “Tomillo” tiene actividad antibacteriana in vitro frente a *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277* causante de gingivitis.

#### 1.6 DETERMINACION DE VARIABLES

##### 1.6.1 Tipos de variables

**Variable independiente:** Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* “Tomillo”.

**Variable dependiente:** Bacteria patógena (cepa de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277).

### 1.7 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES E INDICADORES

VARIABLE	DEFINICION	DIMENSION	INDICADOR	ESCALA
<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>  Actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. "Tomillo"	Capacidad del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> L. "Tomillo" de inhibir el crecimiento bacteriano que se desarrolla en un medio dado.	Cuantitativa	Diámetro de halo de inhibición	Medido en mm.
		Cualitativa	Diámetro de halo de inhibición (Según las pautas de Duraffourd)	Nula (-) Sensible (+) Muy Sensible (++) Sumamente sensible (+++)
<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b>  <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	Especie bacteriana que desempeña un papel preponderante en el desarrollo de infecciones bucales.	Cepa ATCC 33277  <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	Crecimiento bacteriano de la cepa.	Turbidez  UFC

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 ANTECEDENTES

Es ampliamente conocida la utilización empírica de las plantas como agentes de la salud en múltiples culturas del mundo transmitidas a través de generaciones. Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, tamizado por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos que busca los principios activos para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permite además la vigencia de su empleo. <sup>(44)</sup>

La fitoterapia es el nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas. A principio de este siglo, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica desembocaron en la puesta en marcha, por parte de la industria farmacéutica, de una nueva producción de medicamentos. Para la fabricación de muchos de ellos utilizaron los principios activos de determinadas plantas medicinales. <sup>(20)</sup>

En diversas investigaciones a nivel mundial se han establecido que muchas plantas aromáticas poseen actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e inclusive con efectos insecticidas sobre ciertos mosquitos.

Se evaluó el efecto bactericida de extractos acuosos de canela, clavo, laurel y tomillo, sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. El extracto de canela mostro un amplio espectro de acción, al detener el crecimiento de todas las

bacterias ensayadas. Los demás extractos, demostraron acción inhibitoria sobre algunas cepas bacterianas. En este estudio, también se observó la diferencia en la sensibilidad frente a los extractos, entre las cepas gram negativas y gram positivas.<sup>(29)</sup>

Se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de una mezcla de dos aceites esenciales y timol frente a ***Paenibacillus larvae***, agente causal de la enfermedad Loque americana, que afecta a las abejas. Los aceites esenciales utilizados fueron canela (***Cinnamomum zeylanicum***) y tomillo (***Thymus vulgaris***), con el agregado de timol, componente mayoritario del tomillo presente en un 39,9%. Los parámetros medidos fueron la concentración inhibitoria mínima (CIM) en caldo Muller-Hinton, mediante dilución seriada, y la concentración bactericida mínima (CBM) en agar MYPGP. El aceite esencial de tomillo registró valores de CIM entre 150 y 250 mg/ml, y de CBM entre 200 y 300 mg/ml, mientras que para el aceite esencial de canela los valores de CIM y de CBM obtenidos fueron 50 a 100 mg/ml y 100 a 125 mg/ml, respectivamente. El timol presentó valores de CIM y de CBM similares, de 100 a 150 mg/ml. No se detectaron diferencias significativas entre las cepas bacterianas estudiadas, pero sí entre la actividad de los aceites esenciales y la del timol ( $P < 0,01$ ). Un efecto inhibitorio sinérgico frente a Lo que americana, evidenciado en la reducción de la CIM y de la CBM, fue obtenido mediante la utilización de una mezcla de 62,5% de aceite esencial de tomillo, 12,5% de aceite esencial de canela y 25% de timol.<sup>(22)</sup>

Se evaluó la actividad antibacteriana frente a ***Clostridium perfringens*** (cepa ATCC: 13124) por el método de Kirby Bauer en agar SPS de los aceites esenciales o extractos vegetales obtenidos con solventes orgánicos de diferente polaridad a

partir de *Allium sativum* (ajo), *Coriandrum sativum* (cilantro), *Eugenia Caryophyllata* (clavo de olor), *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Thymus vulgaris* (tomillo), utilizando la vancomicina como control. Los extractos obtenidos por el método de lixiviación de *O. vulgare* y *T. vulgaris* no presentaron inhibición para este microorganismo; los demás extractos vegetales sí la presentaron, obteniéndose concentraciones bacteriostáticas mínimas que oscilaron entre 16 y 63 µl/ml. El extracto etanólico y el aceite esencial de *E. caryophyllata* fueron los que presentaron una menor concentración inhibitoria mínima (250 µl/ml). Se observan variaciones importantes en la capacidad de inhibición de dichos extractos con respecto a estudios realizados por otros grupos de investigación en el mundo, pocos de ellos utilizaron a *Clostridium perfringens*.<sup>(4)</sup>

La investigación de la actividad antibacteriana “in vitro” de los extractos de Romero y Tomillo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se realizó en los laboratorios de Fitoquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Politécnica Superior de Chimborazo-Ecuador. Para el efecto se obtuvo los extractos por maceración de las hojas y tallos en un balón aforado con hexano y alcohol – agua luego se realizó el control de calidad y se evaporó el solvente a baño maría. Posteriormente se usó tres concentraciones diferentes y la mezcla de los extractos blandos frente a las distintas bacterias y se comprobó sus propiedades antimicrobianas utilizando el método de Mitscher el cual consiste en la determinación del crecimiento de los microorganismos en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano en este caso los extractos, que se

encuentran diluidos en el medio de cultivo. Luego de 24 y 48 horas de incubación; se observó que los extractos de ambas plantas presentan actividad antibacteriana destacándose la mezcla de los extractos hexánicos a concentraciones de 10000 y 1000 ug/ml frente a ***Staphylococcus aureus***, ***Candida albicans*** y ***Pseudomonas aeruginosa*** debido a los componentes fenólicos como el timol, carvacrol y cineol presentes en el aceite esencial por lo que se recomienda la utilización de la mezcla de los extractos de Romero y Tomillo en infecciones causadas por bacterias y hongos.<sup>(18)</sup>

La antracnosis del tomate de árbol, ocasionada por el hongo ***Colletotrichum acutatum***, es la enfermedad más importante de este cultivo en Colombia por su amplia distribución y las pérdidas que ocasiona. En el presente trabajo se evalúa la actividad antifúngica contra la especie ***C. acutatum*** de los aceites esenciales (AE) de tomillo (***Thymus vulgaris***), limoncillo (***Cymbopogon citratus***), y sus componentes mayoritarios, timol y citral. Los resultados demuestran que el timol a 125 mg/L y el citral a 300 mg/L inhiben el crecimiento micelial completamente durante once días de incubación. La germinación de las esporas se evita en un 100% con el AE de limoncillo a 350 y 400 mg/L, timol a 100 y 125 mg/L, y citral a 250 y 300 mg/L, después de un período de doce horas. Adicionalmente, el timol a 125 mg/L y el citral a 300 mg/L inhiben completamente la esporulación y el AE de tomillo a 350 mg/L la permite en baja extensión. Las evaluaciones de fitotoxicidad revelan que la aplicación de gotas localizadas sobre la superficie foliar de ***Solanum betacea***, a concentraciones entre 150 y 5000 mg/L, no ocasionan ningún daño aparente. Asimismo, la aspersión foliar completa y sistemática cada 2 días, durante 2 meses continuos con concentraciones de 1500 mg/L de los materiales, no

produce ningún síntoma de marchitamiento, deterioro del crecimiento o alteración del desarrollo general de las plantas. <sup>(2)</sup>

El Instituto de Odontología determinó el efecto antibacteriano del aceite esencial de *O. vulgare* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 con un CMI de 3 mg/ml y *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 con CMI de 5 mg/ml. <sup>(31)</sup>

Villareal, trabajó determinando el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Croton lechleri* "sangre de grado" encontrando que la concentración mínima bactericida (CMB) fue de 4 mg/ml para *E. faecalis* ATCC 29212 y de 7 mg/ml para *P. gingivalis*. <sup>(58)</sup>

Araujo, trabajó con el aceite esencial de *Schinus molle* "molle" demostrando que ejerce un efecto inhibitorio del crecimiento tanto para *P. gingivalis* ATCC 33277 (MIC de 4 mg/ml) y como de *E. faecalis* ATCC 29212 (MIC de 2 mg/ml). <sup>(3)</sup>

## 2.2 BASES TEORICAS

### 2.2.1 ACEITES ESENCIALES

#### 2.2.1.1 DEFINICION

Los aceites esenciales son compuestos vegetales que debido a su consistencia son muy volátiles y de olor intenso. Se incluyen dentro de este grupo solamente aquellas especies de plantas medicinales que las contienen en concentraciones elevadas, entre 0,1 y 10 %. <sup>(47)</sup>

Los aceites esenciales son mezclas de varias sustancias químicas biosintetizadas por las plantas, que dan el aroma característico a algunas flores, árboles, semillas y a ciertos extractos de origen animal (almizcle, civeta, ámbar gris). Se trata de productos químicos intensamente aromáticos,

no grasos (por lo que no se enrancian), volátiles (se evaporan rápidamente) y livianos (poco densos). Son insolubles en agua, levemente solubles en vinagre, y solubles en alcohol, grasas, ceras y aceites vegetales. Se oxidan por exposición al aire. El término aceite esencial se aplica también a las sustancias sintéticas similares preparadas a partir del alquitrán de hulla, y a las sustancias semisintéticas preparadas a partir de los aceites naturales esenciales.<sup>(52)</sup>

Los aceites esenciales son llamados así por ser constituyentes odoríferos o aceites de una planta, la palabra esencial deriva del latín “quinta essentia”, que significa quinto elemento, propuesto por Paracelso, quien pensaba que esta era el elemento efectivo en una preparación médica.<sup>(24)</sup>

Son ligeramente volátiles y la mayoría de ellos tienen un olor característico, a veces aromático. Son apenas solubles en el agua, pero se volatilizan fácilmente con vapor de agua. Proporcionan efectos estimulantes en la piel y mucosas, son expectorantes y laxantes, así pues todas las plantas que contienen aceites esenciales suelen utilizarse en las enfermedades de boca y garganta, aunque también sirven de tónicos digestivos y estimulantes del apetito, y se emplea también como condimento.<sup>(11) (48)</sup>

### **Concepto moderno de aceites esenciales**

Los aceites esenciales son los aditivos naturales que más interés han generado en los últimos años en la industria de los alimentos ya que ofrecen una alternativa antimicrobiana y antioxidante que puede garantizar la seguridad e inocuidad de los alimentos en donde se adicionen sin riesgo de

contaminar el entorno. Los estudio *in vitro* e *in situ* reportados en frutas, hortalizas, productos carnicol y lácticos indican que se requieren muy bajas concentraciones para lograr un efecto bioconservador. <sup>(7)</sup>

Los aceites esenciales son mezclas de lípidos o grasas de bajo peso molecular muy hidrofóbicas, con excepción de los nitrogenados y azufrados; generalmente son menos densas que el agua, y confieren las notas características de sabor y aroma de la fuente vegetal o cultivo celular de donde provienen. Normalmente se extraen de diversas partes de las plantas (flores, frutas, yemas, hojas, raíces, bulbos, semillas, cortezas, hierbas y madera), son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica. En condiciones ambientales, son líquidos menos densos que el agua, pero más viscosos que ella, no solidifican a -20°C. Son poco solubles en etanol; son muy solubles en cloroformo y en aceites fijos o no volátiles como el aceite de oliva, e insolubles en agua, se pueden clasificar químicamente en cuatro grupos: los terpenos o hidratos de carbono de fórmula general  $(C_5H_8)_n$  como el limoneno (I); derivados oxigenados de los terpenos como el citral (II); compuestos aromáticos que contienen una estructura benzoica como el eugenol (III) y compuestos que contienen azufre y/o nitrógeno como los isotiocianatos y sólo azufre como el dialil disulfuro (IV) <sup>(48)</sup>

En un aceite esencial pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados; alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, sustancias azufradas y nitrogenadas. Los compuestos más frecuentes derivan biológicamente del ácido mevalónico; se les catalogan

como monoterpenoides y sesquiterpenoides. Las propiedades fisico-químicas de los aceites esenciales o esencias son muy diversas, puesto que el grupo engloba muchas sustancias muy heterogéneas, de las que en la esencia de una planta, prácticamente puede encontrarse sólo una o más de 30 compuestos.<sup>(24)</sup>

Debido a su aspecto oleoso y a la capacidad de evaporarse cuando se exponen al aire a temperatura ambiente, se denominan también aceites volátiles. Por lo general, reciben el nombre de la especie de la que proceden, como aceite esencial de tomillo, aceite esencial de salvia, aceite esencial de muña, aceite esencial de orégano, aceite esencial de eucalipto, etc.

Pese a las diferencias de composición entre los distintos aceites esenciales se pueden afirmar que presentan una serie de propiedades físicas comunes: son líquidas a temperatura ambiente, volátiles y arrastrables en corrientes de vapor de agua y prácticamente inmiscibles con la misma. Los aceites esenciales son lipofílicos y solubles en disolvente orgánicos apolares (hexano, éter etílico, etc). Presentan índices de refracción elevados y muchos de ellos son óptimamente activos. Los valores del poder rotatorio pueden ser considerados como elementos de alto valor diagnóstico.

Se oxidan con facilidad y polimerizan dando productos resinosos. La densidad de los aceites esenciales suele ser inferior a la del agua, constituyendo una excepción los obtenidos a partir de la "canela", el "clavo de olor" y el "sasafrás", cuya densidad es superior a la unidad.

Todos ellos poseen olor característico, raramente son coloreados, salvo algunas excepciones, como el aceite esencial de "manzanilla", de intenso color azul, debido a su contenido en camazuelo. <sup>(57)</sup>.

### **2.2.1.2 PROPIEDADES DE LOS ACEITES ESENCIALES**

**Color:** Casi todos los aceites esenciales son incoloros en estado puro y frescos; ante la exposición al aire adquieren diversos colores.

**Olor:** El olor de los aceites volátiles es muy variable es su propiedad más característica. El olor de un aceite es muy sensible ante la exposición al aire.

**Sabor:** Son tan variables como sus olores. Algunos tan dulces, otros tienen sabores suaves, picantes, ácidos, cáusticos o ardientes.

**Densidad:** La densidad de los aceites esenciales varía (entre 0.842 y 1.172 g/ml); casi todos son más livianos que el agua.

**Deterioro:** La exposición a la luz y al aire deteriora la calidad y destruyen la fragancia de los aceites esenciales. Se deben conservar en botellas de color ámbar bien llenas, tapadas y colocadas en lugar fresco.

**Solubilidad:** Son solubles a solventes orgánicos como alcohol, el éter, el cloroformo, el benceno y muchos otros. <sup>(25)</sup>

### **2.2.1.3 LOCALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN**

El aceite esencial se encuentra almacenado en glándulas aceitosas, venas, sacos de aceite, o cabellos glandulares de diferentes partes en la plantas. <sup>(6)</sup>

Tras su producción, los aceites se almacenan en distintos órganos de la planta. Así, en la raíz y rizomas encontramos el aceite de cúrcuma y jengibre: del fruto se obtiene el aceite de anís, hinojo y enebro y de la semilla la mostaza. Los aceites esenciales se caracterizan por ser una mezcla compleja de varios compuestos de aromas volátiles pertenecientes a diferentes clases de la química orgánica: hidrocarburos (compuestos terpenicos), alcoholes, aldehídos, cetonas, esterés, éteres y fenoles. Obteniéndose de la canela (cinamaldehído), clavo (eugenol), orégano (carvacrol), eucalipto (cineol) y tomillo (timol) entre otros. <sup>(59)</sup>

Aunque todos los órganos de una misma especie vegetal, pueden contener aceite esencial, la cantidad de éste puede variar según su localización, se encuentran en las flores, en hojas y en menor proporción en raíces, rizoma, leños, cortezas, frutos o semillas. <sup>(9)</sup>

Los aceites esenciales suelen encontrarse en estructuras secretoras especializadas tales como pelos glandulosos (Lamináceas), canales secretores (Asteráceas), canales isógenos o esquizogénicos (Rutáceas), células modificadas del parénquima (piperáceas) que en términos generales se localizan en la superficie del vegetal o cerca de la misma. <sup>(53)</sup>

La fisiología vegetal, por el contrario, los considera metabolitos secundarios, no imprescindibles para el desarrollo de las funciones vitales de la planta. Químicamente consisten en mezclas de pequeñas moléculas orgánicas de ahí su volatilidad del grupo de los terpenoides, cuya molécula unitaria con cinco átomos de carbono es el isopropeno. Sólo se unen dos,

tres, o raramente más, pero al estar modificadas en sus funciones químicas las combinaciones son numerosas. Un aceite esencial suele poseer de diez a quince componentes principales y otros tantos muy escasos o trazas. El número y tipo de componentes, así como sus proporciones, pueden experimentar importantes cambios dentro de una misma especie botánica, sea por razones ecológicas (luz, temperatura, altitud), agronómicas (época de siega, abonado) o puramente genéticas. <sup>(24)</sup>

#### **2.2.1.4 FUNCION EN EL VEGETAL**

Su función en la planta sigue en estudio pero se le atribuyen algunos de los siguientes beneficios: para regular su temperatura, liberándolos como vapores; como atractivo para los insectos colaboradores de la polinización; o como repelente para los insectos dañinos. <sup>(33)</sup>

#### **2.2.1.5 COMPOSICIÓN QUIMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Los constituyentes de los aceites esenciales principalmente son terpenoides. Los compuestos terpénicos proceden de la condensación del isopropeno y pueden o no tener oxígeno. Los que carecen de oxígeno son hidrocarburos: monoterpenos y sesquiterpenos. Que pueden ser aromáticos y alifáticos. Está estimado que hay más de 1000 estructuras de monoterpenos y 3000 sesquiterpenos. Compuestos oxigenados derivados de estos hidrocarburos son terpenos funcionalizados con función alcohol, fenol, aldehído, cetona, éter o peróxido. Otros componentes pocos frecuentes en los aceites esenciales: compuestos alifáticos y aromáticos no terpenoides, como fenil propanoides, compuestos nitrogenados y azufrados. <sup>(59)</sup>

La volatilidad y el marcado olor de los aceites esenciales, constituyen los elementos de la comunicación química en la polinización y en la dispersión de las diásporas. A menudo, constituyen un medio de defensa frente a depredadores (microorganismos, hongos, insectos, herbívoros); estas acciones se facilitan por la localización periférica de los efectos secretores. <sup>(9)</sup>

Los monoterpenos y sesquiterpenos de 10 y 15 átomos de carbonos derivados de geranilpírofosfato (GPP) y farnesilpírofosfato (FPP) respectivamente. De acuerdo con su estructura se les clasifica según el número de ciclos como acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, etc. <sup>(39)</sup>

#### **a) Monoterpenos**

Los terpenos de función aldehídos se hallan distribuidos ampliamente en las plantas especialmente valiosas por sus propiedades aromáticas y considerándose un índice de calidad en el valor de los aceites esenciales, muchos de los monoterpenos experimentan cierre de anillo produciendo ácidos cíclicos insaturados. Los principales monoterpenos responsables del aroma son alcoholes y aldehídos.

#### **b) Sesquiterpenos**

Los sesquiterpenos tienen propiedades débiles y son menos volátiles, tienen una densidad aproximada de 0.9 g/ml, su viscosidad es mayor que la de los monoterpenos.

## **Serie aromática**

### **a) Fenilpropanos**

Los fenilpropanos son sustancias naturales ampliamente distribuidas en los vegetales caracterizados por un anillo aromático unido a una cadena de 3 carbonos y derivados biosintéticamente del ácido shikímico. <sup>(37)</sup>

#### **2.2.1.6 EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES**

**Expresión del pericarpio:** Una bandeja con pinchos, en cuya parte inferior hay un canal para recoger el aceite esencial. Se emplea para cítricos sobre todo.

**Disolución en grasa (*enfleurage*):** Los aceites son solubles en grasas y alcoholes de alto %. Sobre una capa de vidrio se coloca una fina película de grasa y sobre ella los pétalos de flores extendidas. La esencia pasa a la grasa, así hasta saturación de la grasa. Posteriormente con alcohol de 70°, se extrae el aceite esencial. Se emplea para flores con bajo contenido en esencias pero muy preciadas (azahar, rosa, violeta, jazmín).

**Extracción con disolventes orgánicos:** Que penetran en la materia vegetal y disuelven las sustancias, que son evaporadas y concentradas a baja temperatura. Después, se elimina el disolvente, obteniendo la fracción deseada. La selección del disolvente pretende que sea capaz de disolver rápidamente todos los principios y la menor cantidad de materia inerte, que tenga un punto de ebullición bajo y uniforme que permita eliminarlo

rápidamente, pero evitando pérdidas por evaporación, químicamente inerte, para no reaccionar con los componentes de los aceites, no inflamable y barato. Este disolvente ideal no existe, y los más empleados son el éter de petróleo, con punto de ebullición de 30 a 70 °C, que se evapora fácilmente y es inflamable, benceno, que disuelve también ceras y pigmentos, y alcohol, que es soluble en agua. Se emplea cuando hay componentes de peso molecular elevado que no son lo suficientemente volátiles.

**Extracción con gases en condiciones supercríticas:** Se emplean gases, principalmente CO<sub>2</sub>, a presión y temperatura superiores a su punto crítico. En esas condiciones se obtienen buenos rendimientos y se evitan alteraciones de los componentes de la esencia. La infraestructura necesaria es cara, pero tiene sus ventajas, como la fácil y rápida eliminación del gas extractor por descompresión, la ausencia de residuos de disolventes y que los gases no resultan caros. <sup>(56)</sup>

#### **2.2.1.7 DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR**

Las plantas se colocan sobre un fondo perforado o criba ubicado a cierta distancia del fondo de un tanque llamado alambique. La parte más baja de esta contiene agua hasta una altura algo menor que el nivel de la criba. El calentamiento se produce con vapor saturado que se provee de una fuente de calor que compone el equipo, fluye mojado y a presión baja, penetrando a través del material vegetal. Los componentes se volatilizan, y condensan en un refrigerante, siendo recogidos en un vaso florentino, donde se separa el agua del aceite por diferencia de densidad. <sup>(9)</sup>

### **2.2.1.8 USOS DE LOS ACEITES ESENCIALES**

La diversidad de componentes terpenoides dotados de actividad antimicrobiana que forma parte de los aceites esenciales contribuye a que se muestren activos frente a bacterias patógenas variadas e incluso frente a distintos hongos responsables de la aparición de micosis, presentando en conjunto un amplio espectro de actuación. Se ha sugerido la posibilidad de que los aceites esenciales inhiban con más facilidad a los microorganismos Gram positivos que a los Gram negativos.

Los aceites esenciales destacan debido a sus propiedades antimicrobianas, que determinan su empleo al exterior en el tratamiento de llagas, ulceraciones, abscesos, infecciones, etc. Entre los aceites esenciales más utilizados con esta finalidad se encuentran el "tomillo", "laurel", "lavanda", "romero". Especialmente merece mencionar la esencia de clavo de olor, y del orégano. Los aceites esenciales también son ampliamente usados, en el tratamiento de procesos infecciosos respiratorios y urinarios. Ello se debe a que un número elevado de aceites esenciales, cualquiera sea su vía de administración (oral, rectal, cutánea) es eliminado por vía pulmonar, así como renal.<sup>(57)</sup>

Los aceites esenciales se utilizan por vía interna con fines terapéuticos: actúan sobre afecciones virales, destruyen los microbios, los hongos, las toxinas infecciosas; y, por vía externa para un tratamiento de belleza integral (cara, cuerpo, cabello). Pasan muy fácilmente a través de la piel, atraviesan las diferentes capas para reunir el flujo sanguíneo, en unos veinte minutos

aproximadamente, y actúan en profundidad en el organismo. Penetran también por la vía respiratoria: inhalar su perfume proporciona un bienestar profundo.

Su potencia es tal que no se utilizan puros sobre la piel; algunos pueden provocar quemaduras. Ricos en vitaminas y en ácidos grasos insaturados, hidratan y nutren la piel en profundidad, y permiten la penetración de los activos benéficos de los aceites esenciales en la epidermis y la dermis.

**Industria alimentaria:** Se emplean para condimentar carnes preparadas, embutidos, etc. También son utilizados en la preparación de alcohólicas y no alcohólicas especialmente refrescos.

**Desodorantes industriales:** Para disminuir el olor desagradable de algunos productos industriales como el caucho, los plásticos y las pinturas. En papelería para impregnar fragancias a cuadernos, tarjetas, papel higiénicos, toallas faciales.

**Industria de cosméticos:** En la producción de cosméticos, colonias, jabones, perfumes y maquillaje.

**Industria Tabacalera:** Demanda mentol para los cigarrillos mentolados.

**Industria Farmacéutica:** Se usan en cremas dentales, inhalantes para descongestionar las vías respiratorias. Son utilizados en neutralizantes de sabor desagradable de muchos medicamentos.<sup>(25)</sup>

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

### **2.2.2.1 HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA**

Es originario del Mediterráneo. Crece desde el norte de África a Asia menor, zona meridional de Europa. Es muy abundante en España. Es uno de los condimentos de la cocina europea y del Medio Oriente. Crece tanto en zonas frías como áridas. Existen cientos de variedades. <sup>(26)</sup>

El tomillo se multiplica a partir de las semillas sembradas a comienzos de abril; estas semillas tardan 2 a 4 semanas en germinar. Se encuentra en laderas expuestas al sol, en suelos calcáreos cubiertos de matorral, en tierras arcillosas, terrenos pedregosos, etc. Vive desde el nivel del mar hasta los 2000 m.s.n.m. <sup>(43)</sup>

El tomillo crece en la península ibérica, colonizan el sur centro y este. Los tomillares aparecen formando grandes matorrales en la parte occidental de Cataluña y bajo Aragón. Por sus propiedades medicinales en el Siglo XVI su cultivo se extendió por Alemania. <sup>(55)</sup>

Además de las zonas colonizadas espontáneamente por este género, se han introducido poblaciones, que ahora crecen en estado silvestre, en Estados Unidos, Canadá, Chile, Australia o Nueva Zelanda, lo que amplía su área de distribución. <sup>(40)</sup>

### **2.2.2.2 DESCRIPCIÓN GENERAL**

El género *Thymus* pertenece a la familia de las labiadas, es de clima templado y originario de los países de la cuenca mediterránea occidental. Crece sobre suelos secos y soleados y resiste bien las heladas y sequías.

Presenta una gran diversificación en subespecies y la Península Ibérica es una de las zonas más ricas en cuanto al número y de mayor endemidad.

Se trata de una planta aromática (su nombre genérico proviene del verbo griego **Thym**, en alusión a su intenso y agradable aroma), vivaz, leñosa, de 10-40 cm de altura y muy ramificada. Las hojas, de 3-8 mm, son lineares, oblongas, sentadas o brevemente pediculadas, opuestas, tomentosas, sin cilios, con el pecíolo o sus márgenes revueltos hacia abajo y blanquecinas por su envés. Las flores son axilares y están agrupadas en la extremidad de las ramas, formando una especie de capítulo terminal, a veces con inflorescencia interrumpida. Las brácteas son verde-grisáceas, el cáliz, algo giboso, con pelos duros, con tres dientes en el labio superior, cortos, casi iguales y dos en el inferior, muy agudos, más largos, con pelos en sus bordes y de color rojizo. La corola, un poco más larga que el cáliz, con el labio superior erguido y el inferior trilobulado y de color blanquecino o rosado. Los 4 estambres sobresalen de la corola y el fruto es un tetraquenio, lampiño, de color marrón.

Es una especie muy variable, tanto en su fenología como en la composición química de su aceite esencial, en el que ya se han detectado 7 quimiotipos. Esto ha dado lugar a confusiones taxonómicas en este género, ya que se han considerado como especies distintas a sus variedades o ecotipos.<sup>(35)</sup>

### **2.2.2.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Nepetoideae

Tribu: Mentheae

Género: *Thymus*

Especie: *Thymus vulgaris* L.

Nombres populares: Tomillo, Tomillo común, Tomello, Tremoncillo, Estremoncillo.<sup>(21)</sup>

### **2.2.2.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *THYMUS VULGARIS* L.**

Estudios fotoquímicos investigaron la composición del aceite esencial del tomillo (Figura 01) (ECHEVERRIGARAY et al., 2001; HUDAIB et al., 2002). El timol es el compuesto mayoritario en la composición química del aceite esencial del tomillo, seguido por el carvacrol, según lo descrito por varios autores (OZCAN & CHALCHAT, 2004; PORTE & GODOY, 2008; HAJIMEHDIPOOR et al., 2010; LISI et al., 2011).

Por su relación con la actividad de la droga, destacan el aceite esencial y los polifenoles, particularmente los flavonoides. El aceite esencial (1,0-2,5%) está constituido principalmente por fenoles monoterpénicos, como timol (hasta un 70%), carvacrol (hasta un 65%), p-cimeno, gammaterpineno, limoneno, borneol y linalol. No obstante, se ha de tener en cuenta que la composición del aceite esencial es variable según la época y lugar de la cosecha, además de la bien conocida existencia de diferentes quimiótipos, de ***T. vulgaris***.

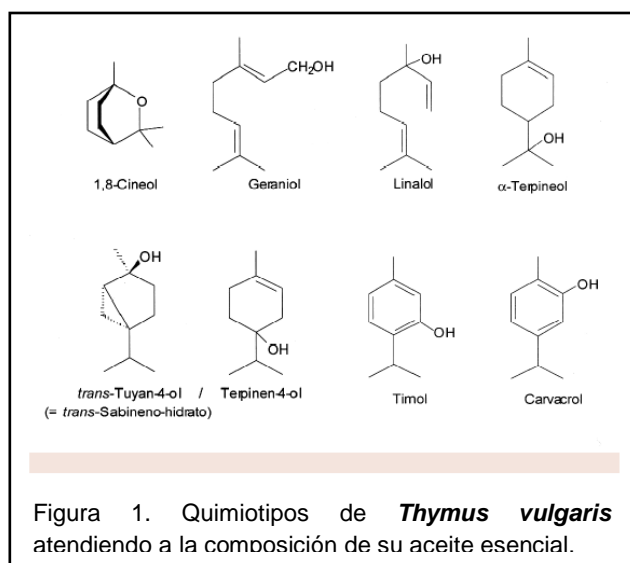
La droga contiene también heterósidos monoterpénicos, ya que una pequeña parte del timol y carvacrol se halla en forma de glucósidos o galactósidos. Por este motivo, la Farmacopea Francesa exige que la esencia tenga un mínimo del 30% de fenoles totales. Entre ellos, los principales son el timol y el carvacrol.

El fármaco también contiene flavonoides, como luteolina, apigenina, naringenina, eriodictol, cirsilineol, salvigenina, cirsimaritina, timonina y timusina, entre otros.

Otros componentes también destacables son los ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico (ácidos cafeico y rosmarínico), triterpenos (ácidos ursólico y oleanólico), saponinas, taninos y un principio amargo (serpilina).<sup>(50)</sup>

<p><b>Determinación Cuantitativa de metabolitos secundarios (%)</b></p> <p>Cromatografía gaseosa con detección de masas, método de cuantificación, por normalización interna (área)</p>	(+) -4-Carene (2,88 %)
	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)- (24,87 %)
	1,4 -Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (25,96 %)
	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)- (1,69 %)
	Linalool, methyl ether (2,87 %)
	Thymol (36,50 %)
	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)-Karvacrol (1,55 %)
	Caryophyllene (3,69 %)

Fuente: Informe de ensayo N° ANA12J12.000614B-Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Universidad Católica de Santa María.



Espasmolítico (timol y carvacrol del aceite esencial), que inhiben la disponibilidad del calcio; Antitusígeno; Antiséptico; Antibacteriano, antifúngico, antivírico; antihelmíntico, especialmente activo frente al *Ancilostoma* duodenal; carminativo y eupéptico (aceite esencial, principio amargo); colagogo (aceite esencial); Antirradicales (flavonoides, ácidos fenólicos); Digestivo, estimulante del apetito, cicatrizante, expectorante, mucolítico, astringente suave, diaforético, tónico, vulnerario, alivia laringitis, gastritis, diarrea, urinarios, hepáticos. Contra ataques de tos, trastornos de garganta e infecciones bucales (antiséptico); regulariza y alivia trastornos menstruales, se lo emplea contra la sarna y los piojos, es repelente de insectos. <sup>(35)</sup>

#### **2.2.2.5 PROPIEDADES MEDICINALES**

##### **Actividad antiespasmódica y expectorante**

El tomillo presenta actividad espasmolítica en las vías respiratorias y ejerce un efecto relajante del músculo liso bronquial que justifica su uso como antitusivo. La acción antiespasmódica se debe al timol y al carvacrol del aceite esencial, que se cree tienen la capacidad de inhibir la disponibilidad del calcio, con lo que podrían bloquear la conducción nerviosa. Por otro lado, se ha comprobado que la acción de los flavonoides derivados del luteolol potencia la acción espasmolítica de los fenoles, actuando sobre todo en la tráquea, gracias a una inhibición de la fosfodiesterasa, seguida de un incremento del nivel intracelular del AMPc. De hecho, estos flavonoides serían los principales causantes de la actividad de los extractos fluidos de tomillo, cuyo contenido en timol y carvacrol suele ser muy bajo.

El tomillo presenta además una actividad expectorante, gracias a que su aceite esencial aumenta la actividad de los cilios bronquiales, a la vez que por un efecto irritante aumenta la producción de secreción bronquioalveolar.

Esto causa una fluidificación de las secreciones bronquiales y favorece su eliminación.

### **Actividad antiséptica**

La esencia de tomillo tiene un efecto antiséptico superior al del fenol y al del agua oxigenada. De hecho, en el siglo XIX y primera mitad del XX, cuando todavía no se conocían los antibióticos, el tomillo era considerado como un eficaz desinfectante. Actualmente, está comprobado que sus componentes fenólicos, timol y carvacrol, tienen actividad antibacteriana frente a gérmenes grampositivos y gramnegativos. Este efecto se debe a su acción sobre la membrana bacteriana. Además, también tienen acción antifúngica (eficaz contra *Candida albicans*) y antivírica. Al eliminarse por vía respiratoria y renal, el tomillo produce efecto antiséptico en el árbol respiratorio y en las vías urinarias. Por su actividad antiséptica, el tomillo también tiene interés como antiséptico de la cavidad bucofaríngea, así como para el lavado de heridas.

La acción antibacteriana del tomillo se ve potenciada por la capacidad que tiene de producir una estimulación de la leucopoyesis y una elevación de los valores de trombocitos en la sangre, por lo que también se considera que puede ser interesante su uso como potenciador de la acción de otros inmuoestimulantes.

### **Actividad béquica**

El tomillo actúa como un eficaz y seguro antitusígeno, limpia las vías respiratorias, inhibe el crecimiento bacteriano y ejerce un efecto antiespasmódico sobre éstas, debido a la suma de sus acciones expectorante, espasmolítica y antiséptica.

### **Antihelmíntico**

Es especialmente activo frente a *Ankylostoma duodenale*.

### **Actividad antiinflamatoria**

En aplicación tópica, el aceite esencial es rubefaciente. Además, especialmente el carvacrol tiene una acción inhibidora de la biosíntesis de prostaglandinas. Ello justifica la inclusión de la esencia de tomillo en linimentos y otros preparados para el tratamiento de dolores musculares y osteoarticulares.

El ácido rosmarínico, presente en el fármaco, también tiene acción antiinflamatoria, debido a su capacidad de inhibir la activación del complemento.

### **Actividad eupéptica**

Popularmente, al igual que otros fármacos con aceite esencial, el tomillo se emplea como aperitivo, digestivo y carminativo, ya que abre el apetito, favorece la digestión e impide la formación de gases.

### **Actividad antioxidante**

Tiene acción antirradicales, en la que se consideran implicados el timol y el carvacrol de la esencia, así como los flavonoides y otros polifenoles.

### **Actividad estrogénica**

Tiene un efecto débilmente estrogénico, ya que compite con el estradiol en los receptores intracelulares.

Por esta acción algunos autores sugieren su posible interés en la prevención de enfermedades producidas por un exceso de xenoestrógenos, como es el caso del cáncer de mama.

### **Anti envejecimiento**

Estudios realizados en Escocia en 1990 sugieren que el tomillo y su aceite volátil tienen un marcado efecto tónico que apoya el normal funcionamiento del organismo y contrarresta los efectos del envejecimiento.<sup>(16)</sup>

## **2.2.2.6 OTROS USOS**

### **Uso culinario**

El tomillo se utiliza habitualmente como condimento de uso culinario y en la elaboración de encurtidos. Favorece la conservación de los alimentos que se aliñan con él, gracias a las propiedades antimicrobianas y a las antioxidantes, en las que intervendrían timol, carvacrol, los flavonoides y los polifenoles del fármaco. En licorería se utiliza para la elaboración del licor *Chartreuse* y un aguardiente italiano llamado grapa, entre otros.<sup>(10)</sup>

También sirve para la activación de la circulación y el sistema nervioso, es tónico y energizante en el nivel físico, mental y emocional. Mejora la memoria, la astenia nerviosa, despierta las funciones digestivas y evita los espasmos gástricos e intestinales. Estimula la circulación capilar, alivia el dolor de cabeza de origen nervioso y jaquecas, coadyuva a la mejoría de las afecciones del aparato respiratorio como resfriados, catarros y bronquitis, por favorecer la expectoración y moderar los espasmos de la tos. Se ha empleado contra la tos ferina, excelente mucolítico en procesos catarrales, buen aliado contra el asma, combate las infecciones respiratorias y digestivas, alivia la sinusitis con inhalaciones. En infusiones y baños de asiento para la cistitis, uretritis, vaginitis y prostatitis, halitosis. Aplicado en gargarismos es muy eficaz en casos de laringitis, faringitis y amigdalitis; calmando el dolor de garganta, la ronquera y la tos irritativa. Es de uso externo y no debe ingerirse.<sup>(23)</sup>

Se usa también en infecciones de la boca, aftas, cuidado de los dientes y encías (Uso externo); indicado en el tratamiento de la diarrea infantil y la enuresis, regulador de ciclos menstruales irregulares, acaba con las lombrices intestinales y en forma de lavativa expulsa los oxiuros o lombrices diminutas que sufren los niños.<sup>(30)</sup>

La infusión del Tomillo se puede utilizar como loción sobre heridas infectadas, infecciones de piel causadas por hongos y dermatosis, en tratamiento de forúnculos y herpes. En algunas del Mediterráneo se utiliza como repelente de los mosquitos y para tratar picaduras de insectos. Hay

constancia de que los antiguos egipcios utilizaron ya el tomillo en la conservación de sus momias debido a sus propiedades bactericidas. <sup>(43)</sup>

### **2.2.3 GINGIVITIS**

#### **2.2.3.1 DEFINICION**

La gingivitis es la inflamación de la región marginal de la encía debido a la infección bacteriana inespecífica de ésta. La presencia de placa bacteriana a nivel supra y subgingival es un fenómeno constante e inevitable en la mayoría de los individuos y, aunque no debe considerarse un hecho patológico, sí que explica la gran incidencia de esta enfermedad en la población. Sin embargo, es posible el mantenimiento sano de la encía y del periodonto cuando la cantidad de placa es pequeña, la virulencia de las bacterias reducida y los sistemas defensivos del huésped positivos.

A pesar de que el tipo más frecuente de enfermedad gingival es la afección inflamatoria simple llamada, en ocasiones, gingivitis marginal crónica o gingivitis simple, la encía puede presentar síntomas de otras enfermedades o de cambios sistémicos, que determinarán la clasificación de la gingivitis. <sup>(13)</sup>

#### **2.2.3.2 FACTORES LOCALES**

- Microorganismos
- Sarro
- Impactación de alimentos y descuido de la cavidad bucal
- Restauraciones o aparatos mal contruidos o irritantes
- Respiración bucal

- Malposición dental
- Aplicación química o de fármacos

### **2.2.3.3 FACTORES SISTEMICOS**

- Alteraciones nutricionales
- Embarazo
- Diabetes sacarina
- Fenómenos psiquiátricos <sup>(5)</sup>

### **2.2.3.4 ASPECTO CLINICO**

1. Cambio de coloración de la encía, de rosa coral a rojo o rojo azulado.
2. Cambio en la forma de la encía, que en condiciones normales es delgada y con un borde afilado, a edematosa e, incluso, con las papilas interdetales abultadas.
3. Cambios en la posición gingival. El margen gingival puede invadir el espacio de la corona.
4. Cambios en la textura superficial: se puede evidenciar una superficie satinada con la pérdida o reducción del puntilleo gingival.
5. Hemorragia espontánea o bajo, casi nunca causa dolor, aunque con frecuencia el paciente esta consiente de la tumefacción, enrojecimiento y hemorragia de la encía. <sup>(42)</sup>

### **2.2.3.5 CUADROS CLINICOS**

- Gingivitis asociada a placa bacteriana.

- Gingivitis ulcero necrótica aguda (GUNA).
- Gingivitis influida por hormonas esteroidales.
- Agrandamiento gingival influido por medicamentos.
- Gingivitis asociada a: alteraciones sanguíneas, deficiencias nutricionales, tumores, factores genéticos, virales.
- Gingivitis descamativa. <sup>(27)</sup>

## 2.2.4 DESCRIPCIÓN DE LA BACTERIA EN ESTUDIO

### 2.2.4.1 PORPHYROMONAS GINGIVALIS

#### A) DESCRIPCIÓN

*Porphyromonas gingivalis* es un bacilo Gran negativo pequeño (cocobacilos), no móvil, anaerobio estricto, asacarolítico, que forma colonias uniformes de coloración verdosas, pardas o negras debido a la hemina que almacena en la superficie celular. Las células de *Porphyromonas gingivalis* tienen un diámetro de 0,5 - 0,8 um por 1,0 -3,5 um de largo.

Entre la especie de mayor importancia en las infecciones primarias de los conductos radiculares está *Porphyromonas gingivalis*, coloniza en forma tardía o secundaria la cavidad bucal, proceso que es facilitado por la presencia de otras especies bacterianas, colonizadores primarios, que proporcionan sitios de unión y nutrientes, y que contribuyen a reducir la tensión de oxígeno a niveles óptimos para su crecimiento.

Algunas especies de **Porphyromonas** poseen actividad proteolítica, como por ejemplo, **Porphyromonas gingivalis** y **Porphyromonas macacae**, Cuando crecen en complejos carbohidratados (excepto **Porphyromonas gingivalis asacrolítica**) y proteínas, los principales productos de fermentación son n-butilato, propionato y acetato, y en menor cantidad iso-valerato, iso-butilato, succinato y fenilacetato. Estos productos finales explicarían muchos de los malos olores asociados con infecciones orales.

**Porphyromonas gingivalis** es un importante miembro de la microbiota periodontal, involucrado tanto en la progresión de la periodontitis, como en los procesos de destrucción de hueso y tejido. También, puede producir severas infecciones extraorales, incluyendo mediastinales, de planos faciales, cerebro y abscesos pulmonares, enfermedades cardíacas, parto prematuro y bajo peso al nacer.

**Porphyromonas gingivalis** es comúnmente detectada en pacientes jóvenes con gingivitis, y pacientes adultos con periodontitis, usando métodos inmunológicos y de biología molecular (PCR). Esta especie también se ha encontrado en placas supragingivales maduras, de pacientes jóvenes con o sin destrucción periodontal, sugiriendo que es un patógeno de tipo oportunista, para el cual no está claro aún, si es de origen endógeno o exógeno. <sup>(15)</sup>

## **B) CLASIFICACIÓN CIENTIFICA**

El género Bacteroides, agrupó en su primera clasificación, un conjunto de bacterias heterogéneas, con características de ser

anaerobios obligados, gram negativo, no esporulados y de forma bacilar, con la aplicación de nuevas técnicas de identificación a base de biología molecular, como el ADN-ADN hibridación, y estudio de sus características bioquímicas, se pudo identificar un grupo homogéneo de especies a partir de los bacteroides, llamados ahora ***Porphyromonas***, que en sus inicios estuvo formando por 3 especies, ***P. gingivalis***, ***P. asaccharolyticus*** y ***P. endodontales***.

Estas especies presentaban la característica de ser no fermentadores, utilizar como sustrato el nitrógeno y obtener su energía a partir de tripticasa y peptona. Estudios posteriores a base de la secuencia de rRNA de 16S, han alejado más genealógicamente del género Bacteroides, conociéndose en la actualidad alrededor de 12 especies, habiendo una, ***P. Catoniae***, que es sacarolítica. <sup>(49)</sup>

### C) FACTORES DE VIRULENCIA

***Porphyromonas gingivalis*** produce un gran número de enzimas, proteinasas y productos finales de su metabolismo que son activos contra un amplio espectro de proteínas del hospedero, y está provista de mecanismos para evadir las defensas de éste. Dichos compuestos corresponden a inhibidores de proteinasas, inmunoglobulinas, proteinasas que contienen hierro, proteínas bactericidas, proteínas de matriz extracelular, y proteínas íntimamente envueltas en funciones fagocíticas, tales como fijación de complemento y coagulación. La mayoría de las actividades enzimáticas de ***Porphyromonas gingivalis*** son asociadas a la proteinasa cisteína, la cual le proporciona ventajas metabólicas, ya

que le otorga la capacidad de utilizar largas proteínas del hospedero para su crecimiento y desarrollo. Una de las características de virulencia significativas de ***Porphyromonas gingivalis*** es este gran número de enzimas hidrolíticas, proteolíticas y lipolíticas, que son producidas esencialmente por todos los tipos de ***Porphyromonas gingivalis*** conocidos. Varias de estas proteinasas asociadas a ***Porphyromonas gingivalis*** (capaces de hidrolizar péptidos unidos) parecen ser funcionalmente importantes en el medioambiente in vivo. Estos factores de virulencia in vivo, si actúan en el hospedero, pueden jugar un rol significativo en la progresión de la periodontitis.

Dentro de las proteinasas de ***Porphyromonas gingivalis*** se consideran a las colagenasas y a las aminopeptidasas como críticas en la patogénesis de la bacteria. Existen proteinasas específicas como arginina y lisina proteinasa, producidas por ***Porphyromonas gingivalis***.

Existen unas proteínas bacterianas que actúan como factor de virulencia llamada hemaglutininas. ***Porphyromonas gingivalis*** produce por lo menos cinco de ellas. Cuando se expresan en la superficie bacteriana, pueden promover la colonización mediante la unión de bacterias a receptores (usualmente oligosacáridos) en células humanas. Existe una relación entre la capacidad de hemaglutinación y la actividad proteolítica de ***Porphyromonas gingivalis***, lo que se ha dilucidado mediante análisis genéticos.<sup>(15)</sup>

## D) FISIOPATOLOGIA

*P. gingivalis* es considerado un colonizador secundario, comensal del surco gingival, que llega por contagio o transmisión por individuos infectados, por medio de la saliva principalmente. Su capacidad de adherirse principalmente por sus fimbrias peritricas tipo II así como por sus vesículas de membrana, hemaglutininas, cápsula, le permiten dar el primer paso en la colonización del surco, poder adaptarse e invadir las células epiteliales en un periodo aproximado de 20 minutos, pudiendo replicarse dentro de ellas y diseminarse a las células de alrededor. Esta característica de invadir la célula, le da la capacidad de evadir las defensas del huésped. Así también su capacidad de degradar diversas proteínas, componentes del surco gingival, ligamento periodontal y hueso alveolar, además de alterar la respuesta innata y específica del anfitrión.

A todo esto se suma un factor huésped, que ante la presencia de esta bacteria, activa una diversidad de respuestas que pueden incrementar el proceso inflamatorio, presente en el surco, haciendo crónico el proceso de destrucción del periodonto. <sup>(49)</sup>

## E) CUADROS CLINICOS

*P. gingivalis* es un importante miembro de la microbiota periodontal, involucrado tanto en la progresión de la periodontitis, como en los procesos de destrucción de hueso y tejido. También, puede producir severas infecciones extraorales, incluyendo

mediastinales, de planos faciales, cerebro y abscesos pulmonares, enfermedades cardiacas, parto prematuro y bajo peso al nacer. <sup>(27)</sup>

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 LUGAR DE ESTUDIO**

El trabajo se realizó en los ambientes del Laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann entre los meses de agosto a noviembre del 2012.

#### **3.2 TIPO DE ESTUDIO**

Es una investigación Cuasi Experimental prospectivo.

#### **3.3 UNIDADES DE ESTUDIO**

##### **3.3.1 BIOLÓGICO**

- Aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* "Tomillo".

##### **3.3.2 MICROBIANO**

- *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

#### **3.4 MATERIAL DE LABORATORIO**

##### **3.4.1 MATERIALES**

- Tubos de ensayo con tapa rosca de 15 x 125 mm
- Tubos de ensayo de 13 x100 mm y 40 de 15 x 125 mm
- Placas Petri de 10 x100 mm
- Matraces de 500 ml

- Matraces de 250 ml
- Matraces de 100 ml
- Pipetas de 1 ml
- Pipetas de 5 ml
- Pipetas de 10 ml
- Vasos precipitados de 200 ml
- Frasco de vidrio color ámbar de 100 ml capacidad
- Frascos de vidrio de 500 ml capacidad
- Probeta de 100 ml
- Mortero de porcelana

#### **3.4.2 EQUIPOS Y OTROS**

- Autoclave.
- Estufa.
- Incubadora.
- Balanza analítica.
- Equipo de destilación.
- Papel filtro Whatman N° 40.
- Nefelómetro de Mac Farland.

### **3.4.3 MEDIOS Y REACTIVOS**

- Agar Mueller Hinton (MH).
- Agar Base Sangre (BS)
- Caldo Mueller Hinton (MH).
- Dimetil Sulfóxido (DMSO).

### **3.4.4 REACTIVOS Y OTROS**

- Papel filtro Whatman N° 40
- 7 Papel Kraft
- 500 g Algodón
- 01 litro de alcohol de 70°
- 01 litro de ron de quemar
- 01 caja de guantes descartables N° 7 1/2
- 12 unidades de mascarilla simple
- 12 unidades de gorros descartables
- 12 pares de guantes estériles N° 7 1/2
- 1 rollo de pabilo
- Detergente
- Lejía

- Jabón

### **3.5 METODOLOGIA**

#### **3.5.1 THYMUS VULGARIS L.**

##### **3.5.1.1 RECOLECCIÓN**

La recolección de la planta fue en la provincia de Tarata, sector de Iscacahua, en la chacra perteneciente al Ing. Hipólito Limache Yufra del departamento de Tacna en los meses de agosto y setiembre del 2012. La recolección se realizó de la planta entera (tallos, hojas y flores), obteniéndose 3500 gr. de muestra de planta fresca verificando que no presenten síntomas de envejecimiento, ni se encuentren deterioradas por plagas. (Anexo Foto N° 01)

##### **3.5.1.2 SECADO**

El proceso de secado se llevó a cabo en una habitación con buena ventilación y a la sombra, para tal efecto se extendió de forma homogénea la planta sobre papeles kraff, siendo removidas constantemente para aumentar el contacto con el aire, cuyo propósito fue conseguir un secado homogéneo.

##### **3.5.1.3 EXTRACCION Y RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL**

**A) Extracción del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* “Tomillo”**

**Técnica: Arrastre de vapor** <sup>(34)</sup>

Luego de 5 días, de secado la muestra fue cortada y pesada en bolsas, la muestra fue transportada en bolsas de papel de primer

uso, se peso 3000 gramos de muestra. Para la extracción del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.*, se colocaron 500 gramos de muestra en un balón, de capacidad volumétrica de un 1 litro (balón de extracción) mientras se agregaba agua (volumen aproximado de 850 ml) en otro balón de extracción, de la misma capacidad del anterior, el cual fue sometió a calor directo (cocina eléctrica), mientras que en el segundo balón se recibirán los vapores de agua, para luego liberar el vapor mixto (agua – aceite esencial) hacia el condensador. El aceite esencial destilado se recibió en un depósito estéril y cerrado, aquí se pudo observar un estado difásico entre agua y aceite esencial, debido a las diferencias de densidad. Esto permitió separar el aceite esencial mediante el uso de pipetas Pasteur a un tubo de vidrio con tapa rosca cerrado herméticamente envolviéndolo en papel aluminio y almacenado a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su utilización.

El aceite esencial fue sometido a las siguientes pruebas:

- Características organolépticas:

Aspecto : Liquido cristalino

Color : Amarillo

Olor : Ligeramente teáceo

**B) Determinación de la concentración del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L.**

Probeta de 5 ml. vacía	=	16,2959 g.
Probeta de 5 ml. con aceite	=	17,0313 g.
Masa	=	17,0313
16,2959	=	0,7354
Volumen	=	0,8 mL.

D = densidad

M = masa

V = volumen

$$d = \frac{m}{V}$$

$$d = \frac{0,7354g}{0,8 \text{ ml.}}$$

$$d = 0,91925 \text{ g/ml}$$

$$\text{cc} = 1000\text{mg} \longrightarrow 1\text{g}$$

$$X \longrightarrow 0,91925\text{g}$$

$$X = 919,25 \text{ mg/mL}$$

$$\text{cc} = 919,25\text{mg} \longrightarrow 1000 \mu\text{l.}$$

$$X \longrightarrow 2,5 \mu\text{l.}$$

$$X = 2,298125 \text{ mg/ml}$$

### C) Rendimiento del aceite esencial (RAE)

Se determinó el % de RAE por el método gravimetría-volumétrico, para ello se realizó el método de arrastre por vapor de agua en un equipo de destilación de vidrio. Obteniéndose 6,5 ml de aceite esencial a partir de la destilación de 3000 gramos de planta entera, colocamos 500 gramos de la planta entera de *Thymus vulgaris L.*, obteniendo un determinado volumen, lográndose obtener un rendimiento del 0,22 %, aplicando la siguiente fórmula:

$$\%RAE = \frac{\text{Vol.}_{AE} \text{ (ml)}}{P_{\text{muestra}} \text{ (g)}} \times 100$$

Donde:

% RAE = Porcentaje de rendimiento del aceite esencial.

Vol. <sub>AE</sub> = Volumen del aceite esencial obtenido.

P<sub>muestra</sub> = Peso de la muestra a destilar.

$$\% RAE = \frac{1,08 \text{ ml} \times 100}{500 \text{ g}}$$

$$\% RAE = 0,216 \approx 0,22$$

## 3.5.2 CEPAS

### 3.5.2.1 RECOLECCIÓN

La bacteria fue comprada al laboratorio Medilab. (Anexo Foto N° 03)

### 3.5.2.2 IDENTIFICACIÓN DEL GÉRMEN PATÓGENO

#### A) *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* ATCC 33277

Las colonias de *P.gingivalis*, cuando crecen en una superficie de agar sangre o Mueller Hinton, son inicialmente blanquecinas para luego colorearse

crema. A los 4 a 8 días, estas colonias oscurecen tornándose de color rojo profundas, verdosas o negro, desde su borde hacia el centro, lo cual se correlaciona con la concentración de protoheme en la pared celular. Así de acuerdo a las características coloniales descritas para *P.gingivalis*, y mediante observación bajo lupa estereoscópica (Stemi 2000C, Zeiss), colonias negras, verdosas o pardas muy oscuras, redondas, convexas, brillantes y lisas, fueron resembradas con técnica de aislamiento en caldo Mueller Hinton.<sup>(49)</sup>

### 3.6 DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 3.6.1 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *THYMUS VULGARIS L.*

Para evaluar la actividad biológica del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* se llevó a cabo 3 procesos: la activación de la cepa bacteriana, la preparación del inóculo y las pruebas de efecto antibacteriano (Difusión en agar, Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida).

##### **Activación de *Porphyromonas gingivalis***

Para esta activación, se reconstituye la cepa al inocularla en medios de cultivo en los cuales se la inóculo hasta su total crecimiento. *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 se usó 3 placas de Agar Base Sangre y Agar Mueller Hinton, se envolvieron e incubaron en cámara de anaerobiosis a 37°C por 24 horas.

Se obtuvo crecimiento en 1 placa de Agar Mueller Hinton la cual utilizaremos para la preparación del inóculo. (ANEXO Foto N° 04)

### **Preparación del inóculo**

Se tomó con un asa de kolle, varias colonias de apariencia similar desarrolladas en el medio de cultivo, que se transfirieron a un tubo que contenía 10 ml de caldo Mueller Hinton se homogenizaron con uso de un vortex, dicho tubo se incubó a 37°C y en anaerobiosis. La incubación se mantuvo hasta que la turbidez coincidió con el estándar N° 0.5 de la escala de Mc Farland ( $1,5 \times 10^8$  microorganismos/ml). Esto se logró, generalmente en 2 a 6 horas.

Se empleó el método de difusión en disco, basado en el método de Kirby-Bauer. (Anexo Foto N° 05)

### **A) PREPARACION DE LOS DISCOS**

Para esta prueba se prepararon discos de sensibilidad con antibióticos de papel filtro (Wathman N° 42) de aproximadamente 6 mm de diámetro, que se colocaron en un beaker de 100 ml con agua destilada para su esterilización y desnaturalización del antibiótico en autoclave (121°C, 15 lb por 15 minutos).

Posteriormente, se vació el agua del beaker que contiene la solución desnaturalizada y el beaker conteniendo los discos se los llevo a estufa regulada a 170°C por 1 hora para su secado, y posteriormente ser usados.

La actividad antibacteriana del aceite esencial se evaluó por el método de difusión en disco. Se impregnaron los discos previamente esterilizados de 6 mm de diámetro con una cantidad determinada de aceite esencial puro. Se realizaron 8 repeticiones por cada tratamiento.

TABLA 1.- Concentraciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* en los discos.

Nº de tratamiento	Volumen (ul)	Concentración (mg/ml)
T1	0,5 ul	0,459625
T2	1,0 ul	0,91925
T3	1,5 ul	1,378875
T4	2,0 ul	1,8385
T5	2,5 ul	2,298125
T6	3,0 ul	2,75775
T7	3,5 ul	3,217375
T8	4,0 ul	3,677

Fuente: Elaboración propia

Nota: se realizó una primera siembra de discos con aceite esencial con las concentraciones de 2,5 µL, 5,0 µL, 7,5 µL, 10,0 µL, 12,5 µL, 15,0 µL, 17,5 µL y 20,0 µL., no habiendo crecimiento en ninguna de las placas disminuyendo las concentraciones a las mostradas en la Tabla 1.

Las pruebas también incluyen un control negativo:

- **Control negativo:** Que consiste en un disco de papel filtro impregnado con agua estéril para descartar la actividad antimicrobiana del mismo.

Con el fin de saber entre cuales de estas cantidades pudiese estar el MIC; incubándolo a 37°C por un espacio de 24 horas. Se anotó la presencia y el tamaño del halo zona de inhibición.

#### **B) PREPARACIÓN DEL MEDIO PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD:**

Se empleó el medio Mueller Hinton, Se preparó el medio como indica la casa comercial.

#### **C) INOCULACIÓN:**

Se inoculó la placa de agar Mueller Hinton, utilizando la suspensión estandarizada de bacterias a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  microorganismos/ml (UFC). Se depositó 100  $\mu$ l del inóculo bacteriano sobre la superficie del agar de cada placa correspondientemente, se homogenizo con un asa de drigalsky para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Se tapó la placa y se dejó secar durante 3 a 5 minutos a temperatura ambiente antes de colocar los discos con las respectivas concentraciones. Una vez absorbido el inóculo y con la ayuda de una pinza estéril se procedió a colocar 4 discos por cada placa de agar Mueller Hinton. A los discos se le añadió aceite esencial puro, los discos fueron embebidos con 0,5  $\mu$ l; 1,0  $\mu$ l; 1,5  $\mu$ l; 2,0  $\mu$ l; 2,5  $\mu$ l; 3,0  $\mu$ l; 3,5  $\mu$ l y 4,0  $\mu$ l . Se presionó suavemente para asegurar el contacto con el medio.

#### **D) INCUBACIÓN:**

Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 18 - 24 horas en cámara de anaerobiosis para ver los halos de inhibición.

## E) LECTURA:

La lectura se realizó midiendo los halos de inhibición con el vernier sobre el crecimiento del microorganismo alrededor del disco. El diámetro de esta zona de inhibición fue directamente proporcional a la actividad antibacteriana del aceite esencial sobre los microorganismos estudiados. Para interpretar los resultados se tomó como referencias las pautas por (DURAFFOURD y LAPRAZ, 1983) que considera la actividad de los aceites esenciales como:

- Nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm.
- Sensibilidad limite (sensible = +) de 9 a 14 mm.
- Sensibilidad media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm.
- Sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm. <sup>(17)</sup>

### 3.6.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) (Valdezate et al., 2001)

#### A) PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DEL ACEITE ESENCIAL

Se preparó una solución madre de 100  $\mu$ l de aceite esencial en 100  $\mu$ l de DMSO (Dimetilsulfóxido), para 9800  $\mu$ l de Caldo Mueller Hinton. La concentración final se obtuvo de la siguiente manera. Se determinó la densidad del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* (DURAFFOURD y LAPRAZ, 1983)

D = densidad

M = masa

V = volumen

$$d = \frac{m}{v}$$

$$d = \frac{0.7354g}{0.8 \text{ ml.}}$$

$$d = 0,91925 \text{ g/ml}$$

$$\begin{array}{ccc} \text{cc} = & 1000\text{mg} & \longrightarrow & 1\text{g} \\ & X & \longrightarrow & 0,91925\text{g} \end{array}$$

$$X = 919,25 \text{ mg/mL}$$

$$d = m/v \Rightarrow m = d \times v$$

$$m = 0,91925 \text{ g/ml} \times 1 \text{ ml}$$

$$m = 0,91925 \text{ g}$$

$$\Rightarrow 1 \text{ ml de aceite esencial} = 0,91925 \text{ g}$$

Pero sólo se trabajó con miligramos de aceite esencial de *Thymus vulgaris L.*

$$\begin{array}{ccc} 1\text{g} & \text{-----} & 1,000 \text{ mg} \\ 0,91925 \text{ g} & \text{-----} & x \end{array}$$

$$x = 919,25 \text{ mg}$$

Se determinó que en 1 mL o en 1000 µl existían 919,25 mg de aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* pero en la solución madre se llevó 0,1 ml o 100 µl en consecuencia se determinó lo siguiente:

$$\begin{array}{ccc} 1,000 \mu\text{l} & \longrightarrow & 919,25 \text{ mg de aceite esencial} \\ 100 \mu\text{l} & \longrightarrow & X \end{array}$$

$$X = 91,925 \text{ mg}$$

Esta concentración fue diluida en 10 000 µl de solución total por lo cual se consiguió una concentración final de:

91,925 mg ← 10,000 µl

X ← 1,000 µl

$$X = 9,1925 \text{ mg}$$

Esta cifra es la concentración final en la solución madre es decir que en 10,000 µl de solución madre está concentrada 9,1925 mg/ml de aceite esencial de *Thymus vulgaris L.*

**B) PREPARACIÓN DEL CMI (CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA) PARA *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.**

Se colocaron 13 tubos de 15 X 125 mm a los cuales se les agregó lo siguiente:

Tratamientos	Vol. Solución Madre	Caldo Mueller Hinton	Total de Vol.
T1	30 ul	2970 ul	3 000 µl
T2	40 ul	2960 ul	3 000 µl
T3	50 ul	2950 ul	3 000 µl
T4	60 ul	2940 ul	3 000 µl
T5	70 ul	2930 ul	3 000 µl
T6	80 ul	2920 ul	3 000 µl

T7	90 ul	2910 ul	3 000 µl
T8	100 ul	2900 ul	3 000 µl
T9	110 ul	2890 ul	3 000 µl
T10	120 ul	2880 ul	3 000 µl
T11	130 ul	2870 ul	3 000 µl
T12	140 ul	2860 ul	3 000 µl
T13	150 ul	2850 ul	3 000 µl

Aquí las concentraciones finales cambiaron ya que en el caso del primer tubo el cual se llevó 30 µl los cuales tendrían una concentración de 0,275775 mg/ml de la siguiente manera:

$$9,1925 \text{ mg} \longrightarrow 1,000 \text{ µl}$$

$$X \longrightarrow 30 \text{ µl}$$

$$X = 0,275775 \text{ mg}$$

Esta concentración se diluyó en 3,000 µl y tuvo una concentración final para el CMI de 0,091925 mg/ ml.

Los tubos quedaron con la siguiente concentración de aceite esencial de *Thymus vulgaris L.*, Luego se agregó 300 µl de solución bacteriana de *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277* a cada tubo (14) que incluye el control positivo.

Los diferentes tratamientos se comparó con los siguientes controles: tubo con 2900 ul de medio y 100 ul de DMSO (control negativo) y el otro con 100 ul de solución de bacterias (control positivo).

TABLA 4.- Preparación de la Concentración Mínima Inhibitoria para *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (Anexo Foto N° 07)

Nº de tubo	Volumen de solución Madre	Concentración en 1000 ul (S.M.) (mg/ml)	Vol. Caldo Mueller Hinton	Volumen total	concentración Final (mg/ml)
1	30 ul	0,275775	2970 ul	3000 ul	0,091925
2	40 ul	0,3677	2960 ul	3000 ul	0,122566666
3	50 ul	0,459625	2950 ul	3000 ul	0,153208333
4	60 ul	0,55155	2940 ul	3000 ul	0,18385
5	70 ul	0,643475	2930 ul	3000 ul	0,214491666
6	80 ul	0,7354	2920 ul	3000 ul	0,245133333
7	90 ul	0,827325	2910 ul	3000 ul	0,275775
8	100 ul	0,91925	2900 ul	3000 ul	0,306416666
9	110 ul	1,011175	2890 ul	3000 ul	0,337058333
10	120 ul	1,1031	2880 ul	3000 ul	0,3677
11	130 ul	1,195025	2870 ul	3000 ul	0,3983341666
12	140 ul	1,28695	2860 ul	3000 ul	0,428983333
13	150 ul	1,378875	2850 ul	3000 ul	0,459625

Se lleva a incubación en cámara de anaerobiosis por espacio de 24 horas a 37°C .

**C) PREPARACIÓN DE INOCULO BACTERIANO DE *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277**

La bacteria que se utilizó en el trabajo se cultivo en viales de agar Mueller Hinton para su mantenimiento, se transfieren las colonias a un tubo que contenga 5 ml de caldo Mueller Hinton siendo activadas y luego incubadas por el lapso de 6 a 8 horas hasta llegar a una concentración de  $1,5 \times 10^8$  microorganismos/ml (UFC) y comparada con el tubo 0,5 de la escala de Mac farland.

**D) LECTURA**

Al cabo de 24 horas se observa la turbidez de los tubos que indicara desarrollo bacteriano. La concentración del aceite esencial que presente ausencia de crecimiento, es detectada por falta de turbidez (igualando al control negativo), que se designa como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). (Anexo Foto N° 08)

**3.6.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) <sup>(11)</sup>**

Se tomaron a partir del primer tubo que no presento turbidez, tres tubos en total sin turbidez de cada uno de ellos se sembró 100 ul por diseminación en placas que contenían agar Mueller Hinton. Las placas se dejaron secar por 5 minutos para luego incubarlas a 37°C por 24 horas en cámara de anaerobiosis. Transcurrido este tiempo se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes

para cada concentración del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* (Anexo Foto N° 09)

### 3.7 PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La presente investigación estuvo basada en un estudio cuasi experimental, para la determinación de la sensibilidad de las bacterias patógenas al aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* mediante el método de difusión en disco se empleó el diseño Completamente Aleatorio <sup>(51)</sup>(Stell y Torrie, 1985). Todos los datos fueron procesados a través del software estadístico SPSS versión 18.0 para Windows. Se determinó el análisis de varianza (**ANDEVA**) y la prueba de significación de Tukey para evaluar el efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris L. (Tomillo)* por el método de difusión en disco (DURAFFOURD y LAPRAZ, 1983) sobre la bacteria en estudio. Todos los tratamientos a base de aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* se expresaron en mg/ml, mientras que los promedios de los halos de sensibilidad se expresaron en milímetros (mm).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

Se realizó el estudio in vitro en la especie bacteriana: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. (Tomillo), trabajándose seis tratamientos y ocho repeticiones. Comprobándose sensibilidad de la bacteria mencionada, frente al aceite esencial de *Thymus vulgaris* L.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas a la planta en estudio han sido agrupados en cuadros y figuras para la mejor interpretación de los resultados que se detallan a continuación. Se utilizó el diseño completamente aleatorio, debido a que este es un diseño de simple distribución al azar siendo útil para métodos y técnicas de laboratorio.

### CUADRO 01

Prueba de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* frente a *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277* por el método de difusión del disco (Kirby Bauer).

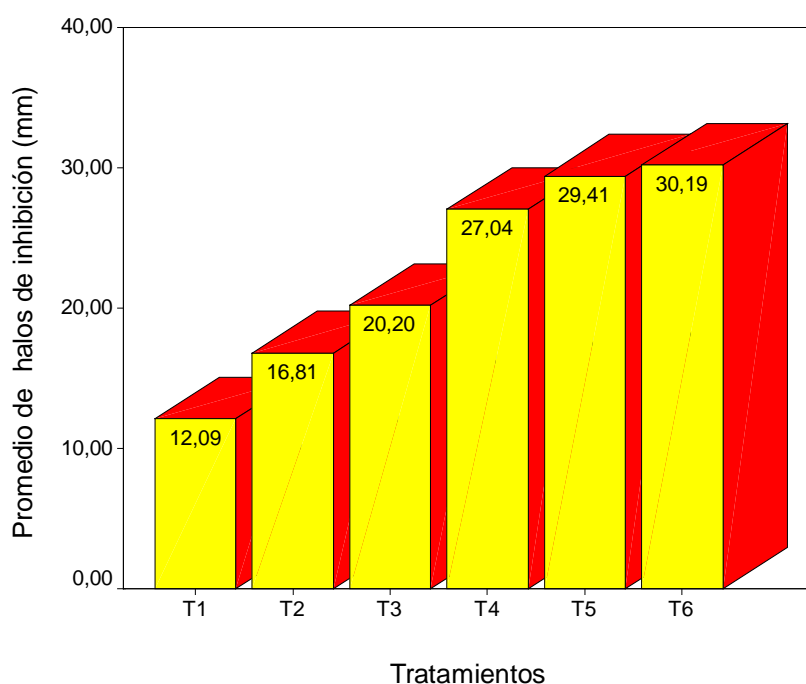
Tratamiento	Aceite esencial		Placa 1				Placa 2				Promedio
	Volumen (ul)	Concentración (mg/ml)	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	Halo 3 (mm)	Halo 4 (mm)	Halo 5 (mm)	Halo 6 (mm)	Halo 7 (mm)	Halo 8 (mm)	
T1	0,5	0,459625	13,5	12,4	12,1	13,8	13,3	12,9	13,0	12,2	<b>12,9</b>
T2	1,0	0,91925	14,7	14,9	17,8	18,0	17,6	17,2	17,4	16,9	<b>16,81</b>
T3	1,5	1,378875	20,3	19,6	20,7	19,3	18,4	21,3	20,4	21,6	<b>20,2</b>
T4	2,0	1,8385	27,3	27,1	28,4	28,4	26,3	25,2	28,9	24,7	<b>27,04</b>
T5	2,5	2,298125	29,1	29,3	29,7	29,4	29,7	29,6	29,1	29,4	<b>29,41</b>
T6	3,0	2,75775	30,1	30,2	30,4	30,4	32,0	31,3	29,8	27,3	<b>30,19</b>
T7	3,5	3,217375	<b>Ausencia de crecimiento bacteriano</b>								
T8	4,0	3,677	<b>Ausencia de crecimiento bacteriano</b>								

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 01, se presenta los promedios de halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris L. (Tomillo)* frente a *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277*, mediante el método de difusión del disco (Kirby Bauer). Los resultados obtenidos indican mayor promedio de halo de inhibición medible a la concentración de 2,76 mg/ml con 30,19 mm de diámetro entre las distintas concentraciones del aceite esencial, en los tratamientos 7 y 8 hay ausencia de crecimiento bacteriano.

### GRÁFICO 01

Distribución de promedios de halos de inhibición en base al efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris L. (Tomillo)* en disco frente a *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277*



Fuente: Gráfico obtenido del Cuadro 01

El gráfico 01, se muestra los promedios de halos de inhibición producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris L. (Tomillo)*. Se aprecia que el tratamiento t6 o concentración de 2,76 mg/ml obtuvo el mayor promedio (30,19 mm), seguido del tratamiento t5 en el segundo lugar, los de menor promedio fueron el t1 y t2 respectivamente.

## CUADRO 02

Determinación del grado de sensibilidad de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. (Duraffourd)

Aceite esencial			Grado de sensibilidad		
Nº	Vol. (ul)	Conc. (mg/ml)	Sensibilidad limite entre 9 a 14 mm (sensible = +)	Sensibilidad media entre 15 a 19 mm (muy sensible = ++)	Sumamente sensible de 20 mm a más (s.s. = +++)
T1	0,5ul	0,459625	12,9 mm		
T2	1,0ul	0,91925		16,81 mm	
T3	1,5ul	1,378875			20,2 mm
T4	2,0ul	1,8385			27,04 mm
T5	2,5ul	2,298125			29,41 mm
T6	3,0ul	2,75775			30,19 mm
T7	3,5ul	3,217375			s.s.
T8	4,0ul	3,677			s.s.

Fuente: Elaboración propia

En el cuadro 02, se determina el grado de sensibilidad de acuerdo a los promedios de los halos de inhibición según la escala de Duraffourd. Observando que a concentraciones de 0,46 mg/ml el grado de sensibilidad es limite (9 – 14 mm); a las concentraciones de 0,92 mg/ml el grado de sensibilidad es media (15 – 19 mm); a la concentración de 1,38 mg/ml; 1,84 mg/ml; 2,30 mg/ml y 2,76 mg/ml el grado de sensibilidad es sumamente sensible (20 mm a más).

### CUADRO 03

Análisis de varianza (ANDEVA) para comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris L. (Tomillo)* a través de la variación de promedios de halo de inhibición frente a *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277* entre las diferentes concentraciones o tratamientos empleados.

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular		
					Significación 0,05 0,01		
Tratamientos	5	2054,924	410,985	329,511	2,440	3,490	**
Error	42	52,385	1,247				
Total	47	2107,309					

CV. 4,907 %

\*\* Diferencias altamente significativas

ns no significativo

Fuente: Datos del Cuadro 1

En el cuadro 03, se observa los resultados del análisis de varianza (ANDEVA), de los promedios de los halos de inhibición producidas a diferentes concentraciones o tratamientos del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* a niveles de confiabilidad al 95 % y 99 % con 5 y 42 grados de libertad. Siendo F calculado de 329,511 mayores a los valores del F tabular que nos indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas entre los promedios de tratamientos, siendo el coeficiente de variabilidad de 4,907 % aceptable para las condiciones del ensayo, por lo tanto los datos son confiables.

#### CUADRO 04

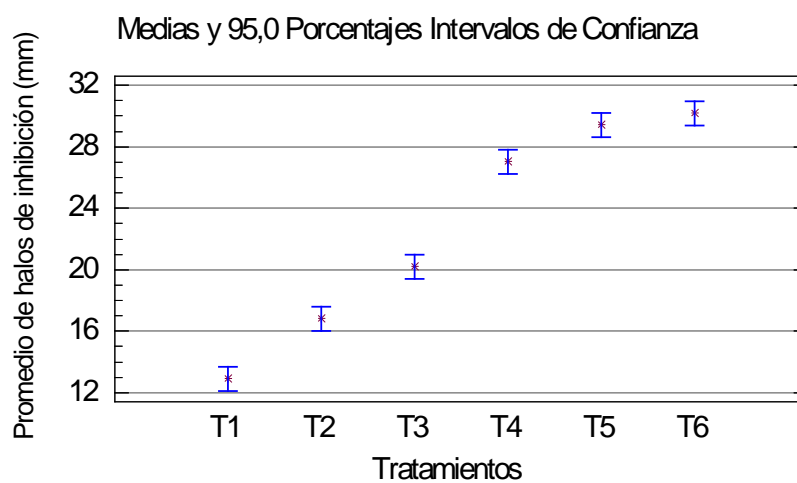
Prueba de significación de Tukey para actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* frente a *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277* por el método de difusión del disco (Kirby Bauer).

Orden de mérito	Tratamientos	(mm)	Significancia $\alpha$ 0,05
1	2,76	30,19	a
2	2,30	29,41	a
3	1,84	27,04	b
4	1,38	20,20	c
5	0,92	16,81	d
6	0,46	12,90	e

En el Cuadro 04, se expresa la prueba de significación de Tukey al 95% de confiabilidad se observa los promedios de los tratamientos o concentraciones, donde destacan con la mayor concentración 2,76 mg/ml con 30,19 mm y el 2,30 mg/ml con 29,41 mm siendo estadísticamente similares en sus promedios, en el tercer lugar se ubica el 1,84 mg/ml con 27,04 mm, las concentraciones que tuvieron el menor promedio fueron 0,92 mg/ml con 16,81 y 0,46 mg/ml con 12,90 mm respectivamente.

### GRÁFICO 03

Medias e intervalos de Tukey HSD al 95,0



En el Grafico 03, se muestra las medias e intervalos de Tukey HSD al 95,0% no apreciándose diferencias estadística significativas entre los tratamientos T5 y T6 , el resto de los tratamientos difieren estadísticamente entre si .

### CUADRO 05

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* (Tomillo) frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Nº de Tubo	Aceite esencial (mg/ml)													Control	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	(+)	(-)
	0,09	0,12	0,15	0,18	0,21	0,25	0,28	0,31	0,34	0,37	0,40	0,43	0,46	---	---
Turbidez	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-

(+) Turbidez; (-) No Turbidez

Fuente: Elaboración Propia

En el Cuadro 05, se observa que la concentración superior a 0,31 mg/ml del aceite esencial no presentan turbidez (-) inhibe el crecimiento de la bacteria en estudio, se observa que concentraciones inferiores a 0,28 mg/ml presentan turbidez (+), lo que indica el crecimiento bacteriano. Determinando que para *Porphyromonas gingivalis* el CMI es de 0,31 mg/ml.

### CUADRO 06

Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* (Tomillo) frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.

Nº de tubo	Concentración (mg/ml)	UFC/Placa
T8	0,31	3
T9	0,34	2
T10	0,37	CMB

Fuente: Elaboración propia

En el Cuadro 06, se muestra solo las concentraciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* (Tomillo) donde no se evidencio turbidez, para determinar la concentración mínima bactericida (CMB); observando que en la concentración de 0,37 mg/ml hay inhibición total del crecimiento de *Porphyromonas gingivalis*, mientras que a las concentraciones de 0,31 mg/ml y 0,34 mg/ml existe aún el crecimiento de UFC.

## **CAPITULO V**

### **DISCUSIÓN**

Las plantas medicinales, son un recurso de gran importancia, para cubrir las necesidades terapéuticas y ha sido transmitido a través de generaciones. En la actualidad se está dando una expansión muy grande de las plantas medicinales por diferentes razones o factores, como el alto coste de los medicamentos sintéticos o la falta de acceso a los agentes quimioterapéuticos para una gran parte de la población. Es por ello que los consumidores prefieren consumir cada vez más productos de origen natural, principalmente por la falta de indicaciones de los efectos colaterales que pueden producir los medicamentos sintéticos.<sup>(44)</sup>

Este conocimiento se ha ido perfeccionando, sometido actualmente por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos, y clínicos.

La actividad biológica del aceite esencial del tomillo está relacionada con sus principales componentes, denominados timol y carvacrol. El timol tiene efectos antibacterianos, antifúngicos y antihelmínticos. En cuanto al carvacrol ha sido estudiado por sus efectos bactericidas. Todos estos efectos del aceite esencial del tomillo fueron demostradas por diversos estudios como Higes e Llorente (1996), Daferera et al. (2000), Bagamboula et al. (2004), Novacosk e Torres (2006), Soković et al. (2009) y Centeno et al. (2010).<sup>(18)</sup>

Conociendo algunas de sus propiedades curativas y su aplicación en diferentes áreas, de manera artesanal o industrial. Fue una de las razones que motivó el estudio de su aceite esencial.

El germen evaluado fue seleccionado por ser un microorganismo patógeno al ser humano muy común en las infecciones gingivales y difíciles de erradicar. Las pruebas preliminares proporcionaron datos sobre el efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. (Tomillo), observándose sensibilidad para *Porphyromonas gingivalis*.

Los resultados que mostraron las pruebas preliminares, incrementó el interés y la importancia de trabajar con esta especie botánica de Perú. Se enfrentó el aceite esencial a la bacteria: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, aplicando seis concentraciones de aceite esencial, cada una con ocho repeticiones y un control, teniendo así 48 unidades experimentales. Los datos fueron procesados mediante el análisis de varianza (ANDEVA) y la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05% y 0,01%, que permitió establecer mínimas diferencias entre los tratamientos.

Los datos obtenidos de los tratamientos de cada una de las especies bacterianas se procesaron mediante el Software estadístico SPS versión 18.0 para Windows.

El método utilizado para la obtención del aceite esencial fue la destilación por arrastre con vapor de agua. Esta técnica es muy utilizada a pequeña escala y a escala industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no se requiere tecnología sofisticada.<sup>(9)</sup>

En la extracción por el método de arrastre por vapor de agua del aceite esencial de *Thymus vulgaris L* se utilizó la planta entera donde se aplicó el efecto combinado del fenómeno de transporte intra particular por difusión molecular del vapor caliente, el rompimiento de las paredes celulares de los capilares que guardan los aceites esenciales y la subsecuente evaporación y difusión del aceite con el vapor caliente en el interior de la muestra vegetal, todo eso fue trabajado a una temperatura de 90 °C.

Teniendo en cuenta que, existen sustancias, generalmente de origen natural cuya actividad biológica no puede ser determinada por sus propiedades químicas o físico químicas, en este caso para evaluar la actividad o potencia del aceite esencial de *Thymus vulgaris L*, se emplean métodos de dosificación biológica, comparando cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el efecto producido por una preparación estándar en las mismas condiciones. En el presente trabajo realizado se consideró la investigación de Mercado, P.A. y col. (2007) donde determinaron que los métodos más comúnmente usados para la evaluación de la actividad de productos naturales vegetales son: Método de difusión en disco, dilución en agar y método turbidimétrico.

En nuestro caso se empleó el método de difusión en disco por su fácil aplicación en laboratorio. Donde los resultados obtenidos, pusieron de manifiesto, la actividad presentada por el aceite esencial de *Thymus vulgaris L*, frente a *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277*, actividad que en todos los casos fue debida a un daño letal que ocasionó el aceite sobre la célula bacteriana.

Para la técnica se empleó el inóculo estandarizado de  $1,5 \times 10^8$  UFC, recomendado para bacterias, que asegura un mejor desarrollo de las colonias de las especies.

El diluyente que se utilizó fue el dimetilsulfóxido (DMSO), que es un líquido incoloro, que se utiliza principalmente como solvente industrial. El cual es un disolvente aprótico de baja toxicidad y a la vez recomendado por la NCCLS en las pruebas de sensibilidad para bacterias. No observándose en ninguno de los casos efecto del solvente sobre las células bacterianas, por lo que los resultados son sólo imputables al aceite esencial.

De los resultados obtenidos, en el cuadro 01 y gráfico 01, se aprecia la evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris L* frente a *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277*, por el método de difusión del disco (Kirby Bauer) la sensibilidad de la bacteria empieza en el T1 con un halo promedio de 12,9 mm (0,46 mg/ml) pero alcanza un mayor diámetro de halo de inhibición en el T6 (2,76 mg/ml) con un halo promedio de 30,19 mm; lo que indica que a mayor concentración mayor halo de inhibición.

En el cuadro 02, según la escala de aromatógrafa de Duraffourd se determinó el grado de sensibilidad bacteriana en función al halo de inhibición del crecimiento del microorganismo: nula (inferior o igual a 8 mm), sensibilidad límite (9 a 14 mm), sensibilidad media (15 a 19 mm) y sumamente sensible (igual o superior a 20 mm). La concentración de aceite esencial de 2,76 mg/ml ejerce mayor efecto a *Porphyromonas gingivalis ATCC 33277* siendo sumamente sensible con 30,19 mm de diámetro.

Así mismo se observó que en el cuadro 02, que las concentraciones mayores a 3,22 mg/ml los halos de inhibición superaron en diámetro de la placa en la cual se hizo el estudio, concluyendo así que eliminaba en su totalidad a la especie (***Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277**).

En este contexto, se puede hipotetizar que la actividad antibacteriana observada en este trabajo podría ser atribuida a una interacción o efecto sinérgico de los principios activos (Bruneton, 1994), cuya acción es la de provocar lesiones en la membrana citoplasmática, ocasionando alteraciones en la composición interna de la célula bacteriana (Hernández y Rodríguez, 1991).

Al efectuar el análisis de varianza para el promedio en tamaño de los halos de inhibición sobre ***Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277** (cuadro 03) se observó que existen diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos, siendo el coeficiente de variabilidad de 4,907 %. Por lo que al realizar la prueba de Tukey (cuadro 04) se confirmó que el T6 (2,76 mg/ml) tuvo mayor actividad y de mayor significancia para ***Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277**.

Los resultados de esta prueba confirman que el T6 (2,76 mg/ml) es de mayor acción antibacteriano para ***Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277**.

De acuerdo al reporte de ensayo N° ANA12J12.000614B que se realizó en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María; Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímica y Biotecnológicas, Laboratorio de Control de Calidad en Arequipa (Anexo N° 02 ) por el método de cromatografía gaseosa con detección de masa se observó en forma cualitativa y cuantitativa la presencia de thymol; 1,4 –

cyclohexadiene, 1 -methyl-4-(1-methylethyl); benzene, 1-methyl-3-(1- methylethyl) entre otros componentes.

Según los resultados del Cuadro 05 y Cuadro 06, la concentración mínima inhibitoria (CMI) se observa en la concentración de 0,31 mg/ml donde se evidencia ausencia de turbidez. Tomando como referencia los 3 tubos siguientes que no presentaron turbidez se determinó la concentración mínima bactericida (CMB), mediante la técnica de difusión en agar, donde se observa la inhibición total del crecimiento para ***Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277** a la concentración de 0,37 mg/ml.

El Instituto de Odontología determinó el efecto antibacteriano del aceite esencial de ***O. vulgare*** sobre ***Enterococcus faecalis* ATCC 29212** con un CMI de 3 mg/ml y ***Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277** con CMI de 5 mg/ml. Al comparar los resultados obtenidos con los nuestros para ***Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277** con un CMI de 0,31 mg/ml, observamos gran diferencia, esta diferencia de actividad antibacteriana podría deberse a la diferencia en la composición fitoquímica donde el carvacrol representa 62 % para el ***O. vulgare*** y un 1,55 % en ***Thymus vulgaris* L** donde el timol representa un 36,50 % lo que daría un mayor efecto antimicrobiano al ***Thymus vulgaris* L**.

Villareal trabajo determinando el efecto antibacteriano del aceite esencial de ***Croton lechleri*** "sangre de grado" encontrando que la concentración mínima bactericida (CMB) fue de 4 mg/ml para ***E. faecalis* ATCC 29212** y de 7 mg/ml para ***P. gingivalis***, al comparar los resultados obtenidos con los nuestros para ***Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277** con un CMB de 0,37 mg/ml, observamos gran diferencia, si bien se trata de 2 especímenes vegetales diferentes y en el caso de la sangre de grado es la taspina su principal componente antibacteriano. Al tratarse de la misma cepa bacteriana podemos

inferir que el aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* es un mayor agente antibacteriano para la bacteria en estudio que el aceite esencial de *Croton lechleri*.

Araujo, trabajó con el aceite esencial de *Schinus molle* "molle" demostrando que ejerce un efecto inhibitorio del crecimiento tanto para *P. gingivalis* ATCC 33277 (CMI de 4 mg/ml) y como de *E. faecalis* ATCC 29212 (CMI de 2 mg/ml), al comparar los resultados obtenidos con los nuestros para *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 con un CMI de 0,31 mg/ml, observamos gran diferencia, si bien se trata de 2 especímenes vegetales diferentes y podría deberse a la diferencia en la composición fotoquímica para el componente  $\gamma$ -terpineno que representa un 1,13 % en *Schinus molle*. Al tratarse de la misma cepa bacteriana podemos inferir que el aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* es un mayor agente antibacteriano para la bacteria en estudio.

En general, los resultados sugieren la realización de mayores estudio *in vitro* considerando las diferencias de especies, para determinar susceptibilidades a cada una de ellas. Es necesario entonces, dar una aplicación científica que justifique el uso empírico en el Perú de las plantas medicinales. El conocimiento de su composición química y las propiedades terapéuticas que manifiesten, nos permitirían una mayor confiabilidad de sus usos.

## CONCLUSIONES

- Primera:** El aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* (Tomillo) presenta actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277.
- Segunda:** Se obtuvo el aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* (Tomillo) en un volumen de 6,5 ml con un porcentaje de rendimiento del aceite esencial de 0,22 % extraídos mediante la técnica por arrastre a vapor.
- Tercera:** El grado de sensibilidad bacteriana de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 por difusión del disco, es sumamente sensible a concentraciones de 2,76 mg/ml y que las concentraciones mayores a 3,22 mg/ml los halos de inhibición superaron el diámetro de la placa en la cual se hizo el estudio, concluyendo así que eliminaba en su totalidad a la especie.
- Cuarta:** La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* (Tomillo) frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 fue de 0,31 mg/ml.
- Quinta:** La Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* (Tomillo) frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 fue de 0,37 mg/ml.

**Sexta:** Se encuentra relación entre el efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a la bacteria de prueba con su composición fitoquímica, ya que se encuentra el Timol en un 36,50% a quien se le atribuye su mayor efecto antibacteriano y carvacrol 1,55%.

## RECOMENDACIONES

1. Se debe valorar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* (Tomillo) frente a otras bacterias de importancia patológica.
2. Relacionar los resultados obtenidos en el CMI, con las dosis tolerables en futuras pruebas biológicas, lo que podría permitir formular un producto de uso comercial.
3. Realizar estudios sobre los principios activos del aceite esencial de plantas de la región de Tacna.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AKERELE, O. (1993). Las Plantas Medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. Foro mundial de la salud.
2. ALZATE O., DIEGO A. Y COL.(2009). Evaluación de La Fitotoxicidad y La Actividad Antifúngica Contra ***Colletotrichum Acutatum*** de Los Aceites Esenciales de Tomillo (***Thymus Vulgaris***), Limoncillo (***Cymbopogon Citratus***), y Sus Componentes Mayoritarios. Universidad de Antioquia. Colombia
3. ARAUJO DIAZ, JORGE (2008). Actividad antimicrobiana de plantas. Revista Científica de la Universidad Científica del Sur. N° 6 Volumen 10. Lima.
4. ARDILA Q., MARTHA I. (2009). Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de ***Allium sativum***, ***Coriandrum sativum***, ***Eugenia Caryophyllata***, ***Origanum vulgare***, ***Rosmarinus officinalis*** Y ***Thymus vulgaris*** FRENTE A ***Clostridium perfringens***. Universidad de Caldas. Colombia
5. ARMAS MELGAREJO, ELMER HOLMER (2004). Estudio clínico descriptivo sobre el nivel de Gingivitis en mujeres de 20 a 24 años medicadas con Anticonceptivos orales LIMA –PERU.
6. ARRIAZA, M. (2010). Uso Industrial De Plantas Aromáticas Y Medicinales, Universidad Politecnica De Madrid. España.

7. BOSQUES- MOLINA, ELSA Y COL.(2006). Aceites esenciales: Bioconservadores con alto potencial en la industria alimentaria. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
8. BRACK A, HEINZ P. (2002). PERÚ MARAVILLOSO. Edit. Epenza. Empresa Periodística Nacional SAC. Lima – Perú.
9. BRUNENTON, J.(1991). Elementos de Fotoquímica y Farmacognosia. Editorial Acriba. España.
10. CASTRO, L. O. Y COL. Plantas medicinales: condimentares e aromáticas. Guairá: Agropecuária. Brasil
11. CHOQUEHUANCA, G. L. (2004). Tesis “Efecto antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Satureja boliviana* muña frente a bacterias patógenas grampositivas y gramnegativas”. Universidad Nacional de San Agustín. Facultad de ciencias biológicas y agropecuarias escuela profesional y académica de biología.
12. CORNEJO A; V. (1986). Estudio morfológico-estructural de plantas medicinales de uso más frecuente en Ayacucho. Tesis. Universidad San Cristóbal de Huamanga . Perú.
13. CREUS MARTINEZ, MERCEDES (1996). GINGIVITIS. EL FARMACEUTICO N° 174.
14. CUENCA E, SERRA L. (1994) Guía per a la prevenció i el control de les malalties bucodentals. Barcelona.

15. DEL RÍO, MARTINEZ P.(2006). Actividad biocida de un propolis chileno frente a ***Porphyromonas gingivalis***: estudio in vitro. Tesis. Universidad de Chile.
16. DORLING KINSERLEY . "The Encyclopedia of Medicinal Plants".
17. DURAFFOURD, C y J., LAPRAZ, (1983). Cuaderno de fitoterapia clínica. Editorial Masson. Francia.
18. ESTRADA O., PAOLA S.(2010). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de Romero "***Rosmarinus officinalis***" y Tomillo "***Thymus vulgaris***". Escuela Politécnica Superior de Chimborazo. Ecuador
19. FERNÁNDEZ O. (1987). Estudio de salud bucal de los estudiantes de enseñanza básica y media de la región metropolitana y los recursos humanos necesarios para su tratamiento. Tesis para optar al grado de Magíster en Salud Pública. Universidad de Chile.
20. FITOMEDICINA PASADO Y PRESENTE  
  
<http://web.sinectis.com.ar/fitomedicina/Introfito.html>.2006/05/28
21. FONNEGRA G., RAMIRO Y COL. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2da Edición, Editorial Universidad De Antioquia. Colombia

22. FUSELLI S., R. Y COL. (2006). Inhibición de *Paenibacillus larvae* empleando una mezcla de aceites esenciales y timol. Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina.
23. GARCIA R., HERIBERTO (2005). Plantas curativas mexicanas. Decima segunda reimpresión, Panorama editorial S.A.
24. GARCÍA, M.(1988). Importancia de la investigación química en la explotación de los aceites esenciales.VII Jornadas sobre plantas aromáticas.
25. GENNARO A. (2003). Remington Farmacia. 20ava Edición. Argentina. Editorial medica panamericana
26. GERMÁN; MORENO, Y COL. (2010). Aplicaciones Medicinales Del Tomillo. Univ. Cienc. Soc. Santa Cruz de la Sierra.
27. GINGIVITIS  
  
[http://www.odontologia-unmsm.edu.pe/revista\\_cientifica\\_odontologica\\_2010\\_II.pdf](http://www.odontologia-unmsm.edu.pe/revista_cientifica_odontologica_2010_II.pdf)
28. HERNANDEZ, L. (2003). Actividad inhibitoria letal de los extractos de ajo para *E. coli* y *L. Innocua*.
29. HERRERA A., F.C. y Col. (2006). Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. Universidad de Pamplona. Colombia.

30. HOOGESTEGER CORNELIO (1994). Uso de las plantas medicinales. Quinta Reimpresión, Arbol Editorial S.A.
31. INSTITUTO DE ODONTOLOGÍA. BIOMEDICUM. (2008) Actividades antibiopelícula de *Origanum vulgare* aceite esencial contra los patógenos periodontales.
32. KINANE DF.(2001). Causation and patogénesis of periodontal disease. Periodontology 2000, Vol 25.
33. LIMA, S. (2005). Análisis de los rendimientos obtenidos de dos especies de eucalipto trabajados en seco a nivel laboratorio y a nivel planta piloto en la extracción de su aceite esencial. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ingeniería, escuela de ingeniería química.
34. LOCK DE UGAZ, O. (1994). Investigación Fotoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales, 2<sup>da</sup> edición de la PUCP. Lima-Perú.
35. LÓPEZ LUENGO, M. (2006). Ámbito Farmacéutico Fitoterapia Tomillo Propiedades farmacológicas e indicaciones terapéuticas Vol 25 Núm 1.
36. LORENZI, H. y Col. (2002). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. Brasil.
37. MANRIQUE, G. (2001). Determinación de los Parámetros para la Desterpenación y Desmentolado del aceite esencial de muña *Satureja boliviana* y su utilización como conservante en la elaboración de chorizo. Tesis. Arequipa.

38. MANUAL DE FITOTERAPIA, EsSalud. Perú
39. MARTÍNEZ, M.(2003). Aceites esenciales. Facultad Química Farmacéutica. Medellín.
40. MARTINS, E. R. Y COL. (1994). Plantas medicinais.
41. MASCARENHAS P, GAPSKI R, AL- SHAMMARI K, WANG H.(2003). Influence of sex hormones on the periodontium.
42. MATESANZ-PÉREZ P, MATOS-CRUZ R, BASCONES-MARTÍNEZ A. (2008). Enfermedades gingivales: una revisión de la literatura.
43. MUÑOZ, FERNANDO (1996). Plantas medicinales aromáticas. Grupo Mundi Prensa.
44. MUÑOZ, ORLANDO y Col. (2004). Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología. Segunda edición, Editorial universitaria. Chile.
45. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD (1998). Situación de la Medicina Tradicional en America. Bol. Org. Panam. Salud.
46. PERIS JB, STÜBING Y COL. (1995). Fitoterapia aplicada. Valencia.
47. PHALOW, M. (1979). El gran libro de las plantas. Segunda edición. Editorial Everest, S.A. México.
48. PODLECH, D. (1992). Gran guía de la naturaleza-plantas medicinales Editorial everest S.A.

49. RAMOS PERFECTO, DONALD Y COL. (2011). ***Porphyromonas gingivalis***: patógeno predominante en la periodontitis crónica Dpto. de CC. Básicas. Laboratorio de Microbiología Facultad de Odontología Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
50. SALVADOR CAÑIGUERAL, FOLCARA (2000). Usos terapéuticos del Tomillo. Revista de Fitoterapia.
51. STELL Y TORRIE (1985). Bioestadística: Principios y procedimientos. 2da edición. Editorial Mac Graw – Hill. Mexico.
52. STEVENS, P.F. Y COL.(2002). Plantas medicinales y aromáticas. II segundo congreso internacional de plantas medicinales y aromáticas.
53. TYLER Y COL,(1979). Farmacognosia. 2da Edición. Editorial el Ateneo. Argentina.
54. TILLAN CAPO, J. (2002). Plantas medicinales. Revista cubana N° 2. Volumen 7. Pág. 37-44. Cuba.
55. TOLEDO, MARIA ISABEL Y COL. Aplicación del Tomillo (***Thymus vulgaris***) en el manejo de Enfermedades de la Salmonicultura. Pontificia Universidad Católica De Valparaíso. Escuela de Ciencias del Mar Laboratorio de Cultivo de Peces y Alimentación para la Acuicultura.
56. VAN GINKEL, A. (2003). Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB “Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y Producción.”

57. VILLAR DE FRESNO, A.M.(1999). Farmacognosia General. Editorial Síntesis. España.
58. VILLAREAL TREVIÑO, LICEO (2008). Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Croton lechleri* "Sangre de grado" en microorganismos presentes con periodontitis de adulto. Tesis. Universidad de Nuevo León. México.
59. ZEKARIA, DAN (2006). Los aceites esenciales una alternativa a los antimicrobianos. Laboratorios Calier

## **ANEXOS**

Anexo N° 01

Tacna, 29 de agosto del 2012



Señor:

DR. QUITERIO VALENCIA MECOLA

Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias

Presente.-

De mi consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a Ud., para manifestarle con relación a la solicitud del Sr. Eduardo René Lagos La Rosa, sobre la identificación de una especie botánica, informo que se ha procedido a identificar la muestra entregada y debo señalar que se trata de *Thymus vulgaris* L. "Tomillo"

Sin más que informar al respecto, le saludo cordialmente.

Atentamente;

  
Dra. Rosario Zagarra Zagarra  
Profesora Principal DE- FCAG

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS		UNJBG
PROV N°:	2802	FECHA:
A :	Sr. Eduardo R. Lagos La Rosa	
PARA :	Su conocimiento	
		
DECANO		DECANO
TACNA		TACNA



**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS**  
**LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166  
 ✉ laboratorioensayoucsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350  
 AREQUIPA - PERU



**INFORME DE ENSAYO**

**N° DE INFORME: ANA12J12.000614B**

<b>Nombre del Cliente</b>	: EDUARDO RENÉ LAGOS LA ROSA
<b>Dirección del Cliente</b>	: DISTRITO G.A.L. ASOCIACION VISTA ALEGRE MZ 37 LOTE 14 - TACNA
<b>Condición del Muestreado</b>	: POR EL CLIENTE
<b>Descripción</b>	: ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO
<b>Envase</b>	: Tubo de ensayo vidrio con tapa rosca
<b>Peso de Muestra</b>	: 4,5 mL
<b>Fecha de Recepción</b>	: 12/10/2012
<b>Fecha de Emisión de informe</b>	: 19/10/2012
<b>Paginas</b>	: Pagina 1 de 3

**I. ANALISIS FISICO QUIMICO**

ANALISIS	RESULTADO
<b>Determinación cualitativa de metabolitos secundarios</b> Cromatografía Gaseosa con detección de masas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (+)-4-Carene</li> <li>• Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-</li> <li>• 1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-</li> <li>• Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-</li> <li>• Linalool, methyl ether</li> <li>• Thymol</li> <li>• Phenol,2-methyl-5-(1-methylethyl)-Karvacrol</li> <li>• Caryophyllene</li> </ul>

<b>Determinación Cuantitativa de metabolitos secundarios (%)</b> Cromatografía Gaseosa con detección de masas, método de cuantificación, por normalización interna (área)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (+)-4-Carene (2,88 %)</li> <li>• Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)- (24,87%)</li> <li>• 1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)- (25,96 %)</li> <li>• Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)- (1,69 %)</li> <li>• Linalool, methyl ether (2,87 %)</li> <li>• Thymol (36.50 %)</li> <li>• Phenol,2-methyl-5-(1-methylethyl)-Karvacrol (1,55 %)</li> <li>• Caryophyllene (3,69 %)</li> </ul>
--	--



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad





**UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEÚTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS**  
**LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD**



Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166  
 ✉ laboratorioensayoucsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350  
 AREQUIPA - PERU



**INFORME DE ENSAYO**

**Nº DE INFORME: ANA12J12.000614B**

**Nombre del Cliente** : EDUARDO RENÉ LAGOS LA ROSA  
**Dirección del Cliente** : DISTRITO G.A.L. ASOCIACION VISTA ALEGRE MZ 37  
 LOTE 14 - TACNA  
**Condición del Muestreado** : POR EL CLIENTE  
**Descripción** : ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO  
**Envase** : Tubo de ensayo vidrio con tapa rosca  
**Peso de Muestra** : 4,5 mL  
**Fecha de Recepción** : 12/10/2012  
**Fecha de Emisión de informe** : 19/10/2012  
**Paginas** : Pagina 3 de 3

Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Peak Report TIC				A/H	Mark	Name
				Area	Area%	Height	Height%			
1	8.575	8.500	8.640	349638	2.88	109833	3.29	3.18	MI	(+)-4-Carene
2	8.722	8.640	8.790	3020089	24.87	891075	26.67	3.39		Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-
3	9.414	9.325	9.500	3151848	25.96	836147	25.03	3.77		1,4-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-methylethyl)-
4	9.697	9.630	9.745	205621	1.69	56415	1.69	3.64	MI	Cyclohexanol, 1-methyl-4-(1-methylethenyl)-
5	10.291	10.235	10.360	348311	2.87	97723	2.93	3.56		Linalool, methyl ether
6	17.140	17.030	17.215	4431907	36.50	1127415	33.75	3.93		Thymol
7	17.314	17.215	17.425	187769	1.55	52993	1.59	3.54	MI	Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- Karvacrol
8	19.609	19.560	19.670	448048	3.69	169229	5.07	2.65		Caryophyllene
				12143231	100.00	3340830	100.00			

Q.F. Juan Ramirez Orellana  
 COEA 052  
 DIRECTOR TÉCNICO LECC



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

## Anexo N° 03

### ABREVIATURAS

CMI	:	Concentración mínima inhibitoria
CMB	:	Concentración mínima bactericida
mg/ml	:	Miligramo por mililitro
μl	:	Microlito
mm	:	Milimetro
C°	:	Grados Celsius
g/ml	:	Gramo por mililitro
ANDEVA:		Análisis de varianza
g	:	Gramo
ml	:	Mililitro
DMSO	:	Dimetilsulfóxido
UFC	:	Unidades formadoras de colonia
NCCLS:		Nacional Comittee for Clinical Laboratory Standards
F de V	:	Fuente de variabilidad
G.L.	:	Grado de libertad
S.C.	:	Suma de cuadrado
C.M.	:	Cuadrado medio
Fc	:	Prueba de F
C.V.	:	Coefficiente de variabilidad

## FOTOGRAFIAS

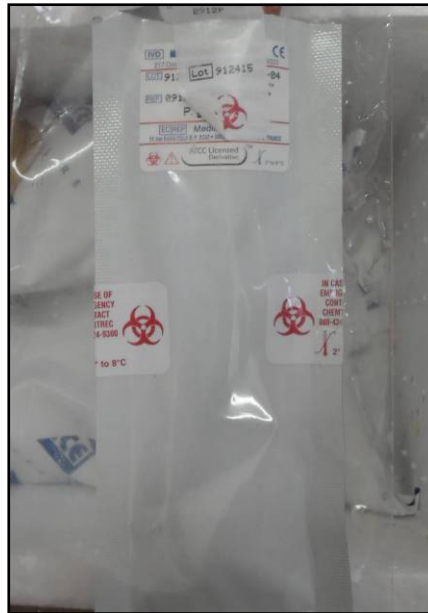
FOTO Nº 01: *Thymus vulgaris* L. (Tomillo)



**FOTO N° 02:** Extracción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. (Tomillo) por destilación por arrastre con vapor de agua



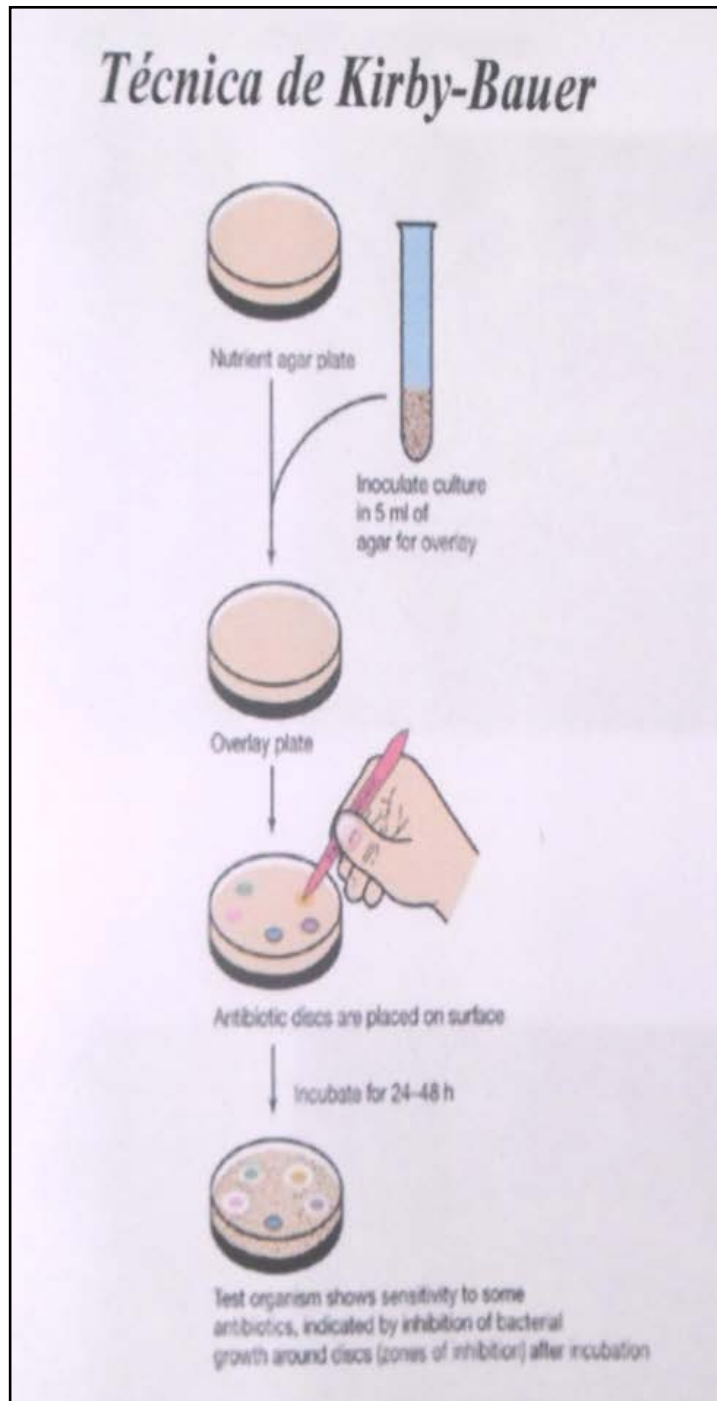
**FOTO N° 03:** Cepa de bacteria en estudio *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

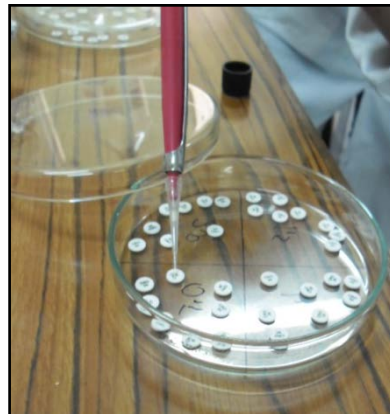


**FOTO N° 04:** Crecimiento de bacteria en estudio *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 en medio agar Mueller Hinton.

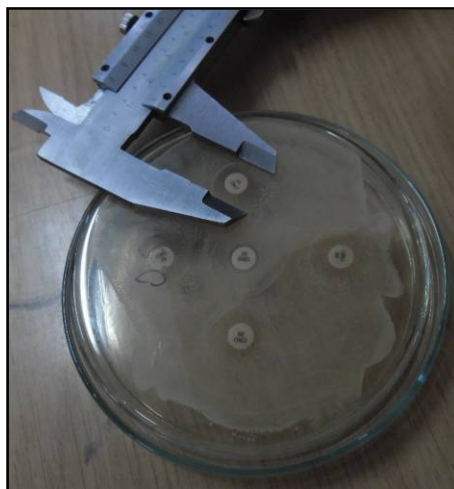
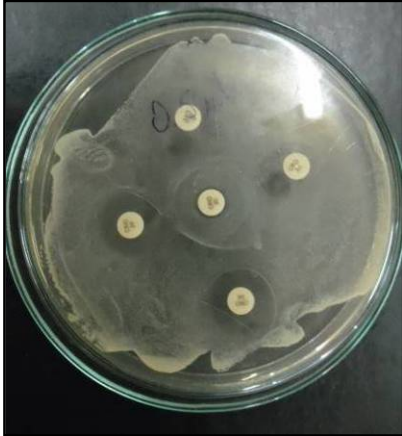


FOTO N° 05: Preparación de inóculo y discos técnica de Kirby Bauer





**FOTO N° 06:** Susceptibilidad de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 al aceite esencial de *Thymus vulgaris* L.



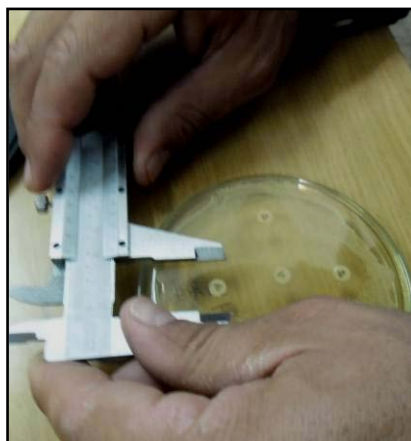
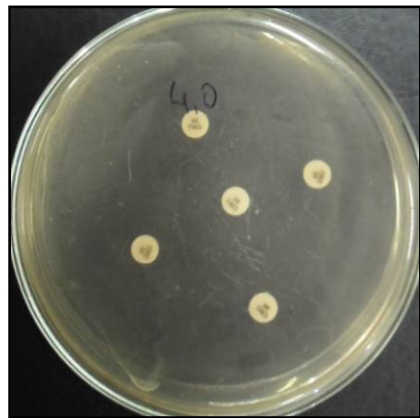
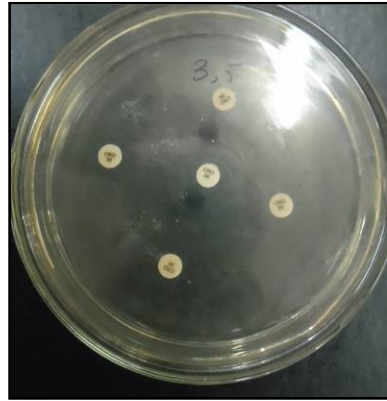
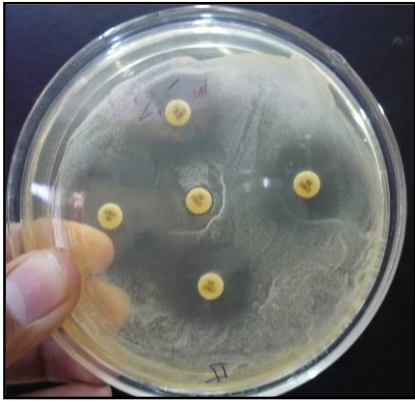


FOTO N° 07: Técnica de susceptibilidad en caldo de dilución

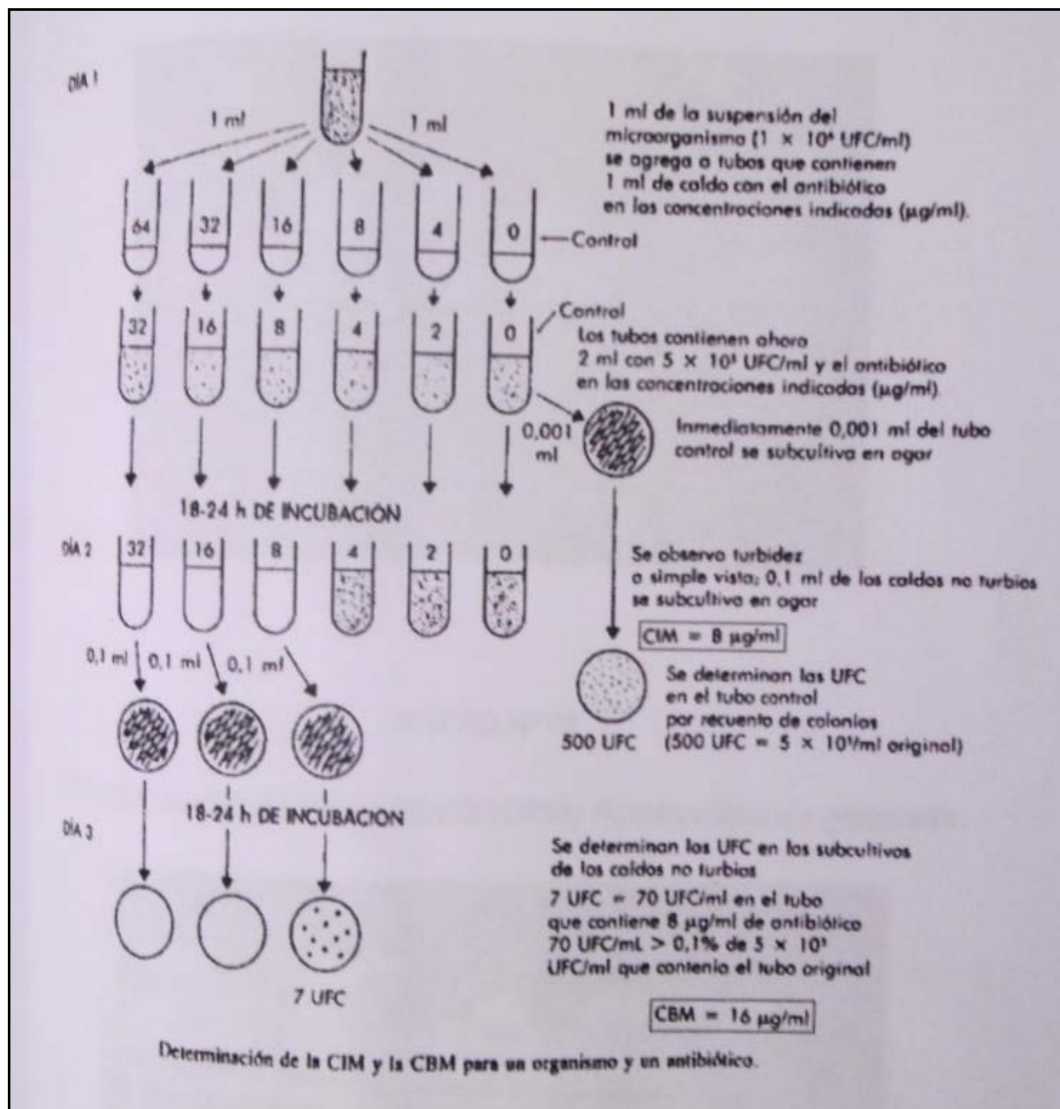


FOTO N° 08: Concentración Mínima Inhibitoria de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

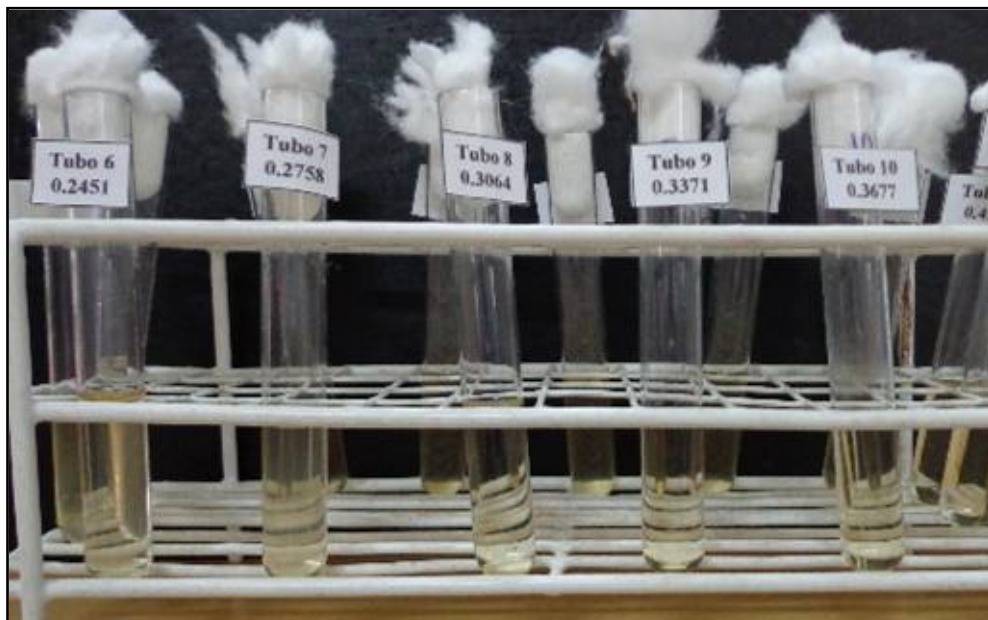
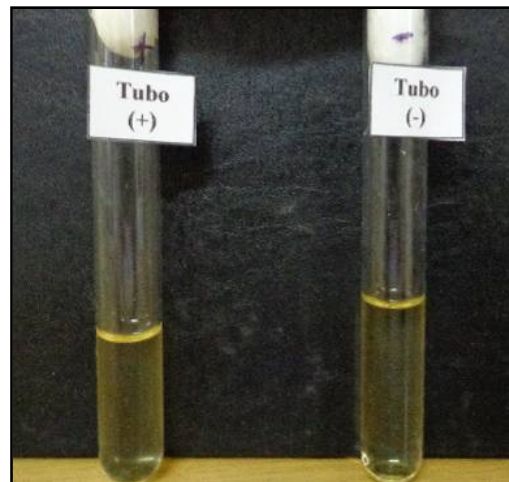


FOTO N° 09: Concentración Mínima Bactericida de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

