

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" DE ICA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



"Actividad de antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de *Thymus sp L.* (Tomillo) contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*."

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:
QUIMICO FARMACÉUTICO**

PRESENTADO POR :

**Bach. Carbajal Gonzalez, Lilia Magaly
Bach. Rey Sánchez Ochoa, Anais Marianella**

ASESORA:

Mg. Jessica Yolanda Huarcaya Rojas

**ICA - PERÚ
2014**

DEDICATORIA

Dedico mi tesis con todo mi cariño y mi amor a las personas que hacen todo en la vida para que pueda lograr mis sueños y mis metas, por motivarme y darme la mano cuando más lo necesito y acompañarme en los momentos más especiales de mi vida, a ustedes por siempre mi corazón y mis agradecimientos: Mama Lilia Gonzalez Paucarhuanca y Papa Oscar Carbajal Ramos.

Lilia Magaly

DEDICATORIA

Dedicado a mi familia: A mi madre, a mis hermanos, a mi segunda madre María Luisa y en especial a ti papa Ruperto Rey Sánchez que has sido el motor de mi vida, mi roble fuerte y valiente, te amo.

Anais Marianella

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar queremos agradecer a Dios por habernos dado la sabiduría, el entendimiento y la fortaleza para poder llegar al final de nuestra carrera, por habernos dejado que nos rindiéramos en ningún momento e iluminarnos para salir adelante, También nos gustaría agradecer a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a nuestra asesora la Doctora Jessica Huarcaya Rojas.

Un agradecimiento a la Doctora Teresa Cahuana Gonzáles que nos orientó con los resultados finales de nuestro proyecto, al Doctor Luis Cartagena Sigvas que nos apoyó con el área de microbiología.

Y por último a nuestra Universidad "San Luis Gonzaga de Ica" por la oportunidad que nos brindo para convertirnos en profesiones con ética y moral.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO II: GENERALIDADES	14
2.1.1 <i>THYMUS SP L.</i>	14
2.1.2 Clasificación Taxonómica	14
2.1.3 Sinonimia Común	14
2.1.4 Descripción Botánica	14
2.1.5 Hábitat	15
2.1.6 Parte Utilizada	15
2.1.7 Historia	15
2.1.8 Componentes químicos	17
2.1.9 Usos etnomedicinales	17
2.1.10 Efectos adversos y/o tóxicos	18
2.2 ESTUDIOS REFERENTES A LA ESPECIE	19
2.2.1. Actividad Antimicrobiana	19
2.2.2. Actividad Antitusígena –Broncoespasmólisis	20
2.2.3. Actividad Antiespasmódica-Digestiva	22
2.2.4. Actividad Antiinflamatoria – analgésica	22
2.2.5. Otros usos de interés	23

2.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	23
2.3.1 Agentes Antimicrobianos	25
2.3.2 Descripción de las bacterias en estudio	25
2.3.3 Métodos para determinar la Actividad Antimicrobiana	30
CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1 MATERIALES Y EQUIPOS	32
3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE ESTUDIO	36
3.2.1 Obtención del material vegetal	36
3.2.2 Tratamiento de la muestra	36
3.3 SCREENING FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS	37
3.4 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS	43
3.5 ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	44
3.5.1 Cepa utilizada	44
3.5.2 Medios de Cultivo	44
3.5.3 Control Positivo	44
3.5.4 Control Negativo	44
3.5.5 Preparación de Medios y cepas:	44
3.5.5.1 Preparación de Medio de Cultivo Sólido	44
3.5.5.2 Preparación de Medio de Cultivo Líquido	45
3.5.5.3 Preparación del Inóculo	45
3.5.6 Determinación de la Actividad Antibacteriana	46
3.5.6.1 Método de Difusión en Agar	46
3.5.6.2 Método de Dilución (CMI)	49
3.5.6.3 Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR)	52

CAPÍTULO IV: RESULTADOS	53
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	67

RESUMEN

Thymus sp L. "Tomillo", en la medicina tradicional se han utilizado las hojas y flores, en caso de inflamaciones crónicas de los bronquios, el asma, tos ferina, el dolor de estómago, los trastornos digestivos y la diarrea. Se ha llegado a utilizar como repelente de mosquitos. En uso externo, se recomiendan en caso de dermatitis, forúnculos, dermatomicosis, vaginitis, etc.

El objetivo de la investigación es determinar la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de *Thymus sp* L.(Tomillo).

Se realizó un Screening fitoquímico de los extractos en mención, para poder determinar la presencia de los metabolitos secundarios presentes identificándose a: taninos, compuestos fenólicos libres, triterpenos y esteroides, antraquinonas, alcaloides, flavonoides y saponinas.

La actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de *Thymus sp* L., a una concentración de 250 mg/mL, contra *Staphylococcus aureus*, mostró halos de inhibición de 14.1 mm y 6.1 mm respectivamente.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a una concentración de 250 mg/mL, para el extracto acuoso por reflujo fue de 15.6 mg/mL. y para el extracto etanólico por percolación se observó a una concentración de 31.25 mg/mL.

Palabras claves: *Thymus sp* L. antibacteriana, *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Thymus sp L. * "Thyme", in the traditional medicine have been used the leaves and flowers, in the case of the chronic inflammation of the bronchi, asthma, whooping cough, stomach pain, digestive disorders and diarrhea. It has been used as mosquito repellent. In external use, it is recommended in case dermatitis, furuncles, , ringworm, vaginitis, etc.

The objective of the research is to determine the antibacterial activity of aqueous and ethanol extracts of *Thymus sp L.* (Thyme). Screening phytochemical extracts mention was made in order to determine the presence of secondary metabolites Identificándose to: tannins, free phenolic compounds, triterpenes and steroids, anthraquinones, alkaloids, flavonoids and saponins.

The antibacterial activity of the aqueous and ethanol extracts of *Thymus sp L.* at a concentration of 250 mg / mL against *Staphylococcus aureus*, showed zones of inhibition of 6.1 mm and 14.1 mm respectively.

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) at a concentration of 250 mg / mL. to reflow the aqueous extract was 15.6 mg / mL. and ethanol extract by percolation was observed at a concentration of 31.25 mg / mL.

Keywords: *Thymus sp L.* antibacterial, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

I. INTRODUCCIÓN

La utilización de plantas medicinales en el tratamiento de diferentes enfermedades, incluidas las infecciones bacterianas, constituyen en la actualidad un desafío para la medicina, y se ofrece como una alternativa.

La especie *Thymus sp* L. (Tomillo), es oriundo de la región mediterránea occidental, en especial del sur de Italia, siendo posteriormente distribuido en todas las regiones. Crece en forma silvestre en matorrales secos, suelos rocosos pero bien drenados y soleados, hasta una altura cercana a los 2.500 m. Se cultiva extensamente en casi todos los países como planta aromática culinaria (en especial en el sur de Francia, España, Marruecos y Norteamérica). En el Perú se cultivan en las provincias de Sihuas y Corongo, ubicadas al nororiente de la Región de Ancash.

Entre sus principales componentes químicos tenemos. Aceite esencial, flavonoides, ácidos fénolicos, taninos y saponósidos⁽¹⁾.

En medicina tradicional el tomillo se ha empleado las hojas y flores, contra la tos ferina, las inflamaciones crónicas de los bronquios, el asma, el dolor de estómago, los trastornos digestivos y la diarrea. Se ha llegado a utilizar como repelente de mosquitos. En inhalaciones tiene efecto expectorante que lo hace ideal en los catarros secos de los bronquios. Energiza, estimula, tonifica, da fuerzas, limpia y purifica.

En uso externo, se recomiendan topicaciones lavativas frente a distintos tipos de infecciones o heridas cutáneas. La experiencia indica que su efecto antiséptico es superior al agua oxigenada o al fenol. La maceración en aceite aplicada en

forma de cataplasma, genera un efecto analgésico en casos de reumatismos, esguinces o tortícolis. ⁽²⁾

Cabe resaltar que también tiene otros usos de interés , el tomillo es una de las plantas más importantes como aromatizante de sopas, marinadas, rellenos, guisos, verduras y platos de cocción lenta, donde suele conservar su sabor inalterable.

El timol es muy utilizado por la industria cosmética en la elaboración de enjuagues bucales y dentífricos.

Existen estudios de la actividad antimicrobiana del aceite esencial, frente a *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*, al mismo tiempo que ejercieron actividad inhibitoria frente *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Corynebacterium diphtheriae*.

Ante ello, se creyó conveniente realizarle un Screening fitoquímico a los extractos acuoso y etanólico, y con ayuda de sus reactivos de precipitación y/o coloración, se detectaron la presencia de metabolitos secundarios a los cuales se les atribuye propiedades antimicrobianas. Para ello se escogieron bacterias Gram (+) y Gram (-), como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y se enfrentaron con los extractos en mención y se utilizó como control positivo a la Amoxicilina.

Los objetivos del presente trabajo son:

- Determinar la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de *Thymus sp L.*(Tomillo) contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- Identificar los metabolitos secundarios en ambos extractos
- Determinar la actividad inhibitoria de los extractos.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos comparándolos con el control positivo.

CAPÍTULO II: GENERALIDADES

2.1 *THYMUS SP L.*

2.1.1 Clasificación Taxonómica :

- **Reino** : Plantae.
- **División** : Magnoliophytas
- **Clase** : Magnoliopsidas
- **Orden** : Lamiales
- **Familia** : Lamiaceae
- **Género** : *Thymus*
- **Especie** : *Thymus sp L.*

2.1.2 Sinonimia común: Tomillo, tomillo de jardín, tremoncillo, timo, senserina, carrasquilla.

2.1.3 Descripción Botánica: ^(1,2)

Se trata de un subarbusto aromático y perenne, perteneciente a la familia de las *Labiadas*, caracterizado por presentar una altura variable entre 10 y 40 cm; tallos leñosos tortuosos y grisáceos; hojas opuestas, verde-grisáceas, enteras, lineares o elípticas, de hasta 15 mm de largo, con envés tomentoso; flores pequeñas bilabiadas de color lila o blanco, dispuestas en inflorescencias terminales densas o laxas, que hacen su aparición desde principios de verano hasta finales de otoño. El fruto es un aquenio ovoide liso.

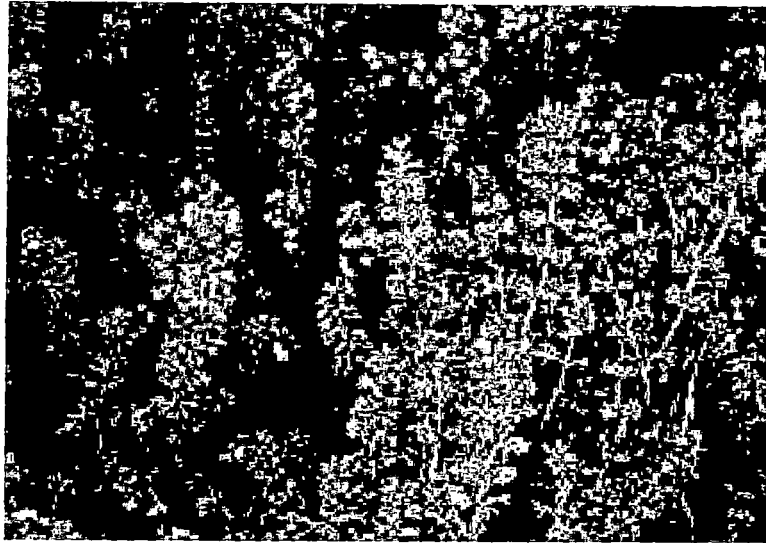


Figura N°1. Subarbusto de *Thymus sp L.*

2.1.4. Hábitat:

El *tomillo* es oriundo de la región mediterránea occidental, en especial del sur de Italia, siendo posteriormente distribuido en prácticamente todas las regiones. Crece silvestre en matorrales secos, suelos rocosos pero bien drenados y soleados, hasta una altura cercana a los 2.500 m. Se cultiva extensamente en casi todos los países como planta aromática culinaria (en especial en el sur de Francia, España, Marruecos y Norteamérica).

En el Perú se cultivan en las provincias de Sihuas y Corongo, ubicadas al nororiente de la Región de Ancash.

2.1.5 Parte Utilizada:

Hojas y flores.

2.1.6 Historia : ⁽²⁾

El uso del *tomillo* data de tiempos muy antiguos. Los egipcios lo empleaban como una de las sustancias aplicadas en los procesos de momificación. El nombre *Thymus* proviene del griego *thumus* que significa *fuerza* o *coraje*, ya que se empleaba principalmente como infusión energizante y como antiséptico de heridas de los guerreros. Esta nomenclatura fue empleada por Teofrasto para designar tanto al *tomillo* como a la *ajedrea*. Se cree que la planta que empleaban los griegos muy probablemente era una variedad conocida como *Thymus capitatus* L. Plinio la recomendaba como antídoto para las mordeduras de serpientes. El propio Carlomagno (742-814) ordenó su cultivo en todos los jardines para aprovechar tanto sus propiedades medicinales como culinarias.

Al parecer fueron los monjes benedictinos quienes lo introdujeron en Centroeuropa, siendo muy popular entre los años 850 y 1250, sobretodo en el norte de los Alpes. Para entonces eran muy comunes los baños tonificantes con esencias de *tomillo* así como su empleo antiparasitario. En el siglo XVI fue cultivado extensamente en toda Europa y regiones aledañas al Mediterráneo, formando parte de numerosas recetas y preparados correspondientes a las primeras farmacopeas europeas. En 1725 un boticario alemán llamado Neumann aísla el aceite esencial,

comenzando a partir de entonces su estudio con fines terapéuticos.

2.1.7 Componentes químicos:

- **Aceite esencial** (Thymus vulgaris 1,5-2,5%, Thymus zygis 0,3%) de composición variable según el tipo de planta, el de mayor cantidad es el timol y/o carvacrol, y otras cantidades de geraniol, terpineol, linalol, trans-tujanol-terpineol.
- **Flavonoides:** derivados del apigenol y luteolol;
- **Ácidos fenólicos:** caféico, rosmarínico.
- **Taninos :** (10%).
- **Saponósidos.**

2.1.8. Usos etnomedicinales : ^(2,3).

La esencia le confiere al **Tomillo propiedades** tonificantes, estimulantes del apetito, eupépticas, coleréticas, espasmolíticas, expectorantes, antisépticas, antihelmínticas y antifúngicas. Los ácidos fenólicos y flavonoides reforzarían la acción antiséptica, y estos últimos le confieren además una acción diurética.

El tomillo se ha empleado contra la tos ferina, las inflamaciones crónicas de los bronquios, el asma, el dolor de

estómago, los trastornos digestivos y la diarrea. Se ha llegado a utilizar como repelente de mosquitos. En inhalaciones tiene efecto expectorante que lo hace ideal en los catarrros secos de los bronquios. Energiza, estimula, tonifica, da fuerzas, limpia y purifica.

Por sus propiedades el Tomillo se indica en afecciones respiratorias: catarro, gripe, faringitis, tos irritativa, amigdalitis, bronquitis, asma, enfisema. En afecciones digestivas: disquinesia biliar, digestiones lentas, gastritis crónicas, meteorismo, espasmos gastrointestinales, parasitosis, colitis, inapetencia; astenia, convalecencia; cistitis, uretritis, pielonefritis.

En uso externo: dermatitis, forúnculos, infecciones cutáneas, dermatomycosis, vaginitis, conjuntivitis, otitis, rinitis, sinusitis, dolores reumáticos, estomatitis, dolores dentales, alopecia, úlceras, contusiones, esguinces, hematomas, quemaduras.

(29)

2.1.9 Efectos adversos y/o tóxicos:

Como siempre que aparece una esencia, conviene recordar que puede dar lugar a reacciones alérgicas, sobre todo en niños, y en dosis excesivas puede llegar a provocar convulsiones. En general, no se recomienda el uso de esta esencia durante períodos prolongados de tiempo.

El timol, a dosis elevadas, puede causar toxicidad hepática, albuminuria y hematuria. La utilización prolongada de colutorios a base de timol, puede provocar tireotoxicosis.

2.2 Estudios referentes a la especie:

2.2.1. Actividad antimicrobiana:

Dentro de la actividad antimicrobiana, el *timol* y el *carvacrol* han demostrado exhibir el mayor espectro terapéutico comparativamente con el resto de los componentes del aceite esencial ⁽⁴⁾.

Investigadores de la Universidad de Montpellier (Francia) han identificado entre seis y siete quimiotipos diferentes en ejemplares de *tomillo* europeos ⁽⁵⁾. En estudios de actividad antibacteriana se ha visto, por ejemplo, que el quimiotipo 5 es el menos activo en función de la CIM (concentración inhibitoria mínima) de las cepas bacterianas, mientras que el quimiotipo 1 presenta la mayor actividad antifúngica.

Frente a *Staphylococcus aureus* también resultó activo *in vitro* el extracto acuoso de las hojas de *tomillo* ⁽⁶⁾. En cambio, frente a *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis* la actividad de los extractos acuosos y etanólicos ha resultado débil ⁽⁷⁾. Otros ensayos *in vitro* realizados con el aceite esencial corroboraron su actividad frente a *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*, al mismo tiempo que ejercieron actividad

inhibitoria frente *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Corynebacterium diphtheriae* ⁽⁸⁾. Asimismo, el aceite esencial demostró inhibir el desarrollo de *Listeria monocytogens in vitro*, al bloquear la actividad de la enzima *listeriolisina O*. En ese sentido redujo a 52.1 HU/ml las unidades hemolíticas, respecto al control de 99.8 HU/ml ⁽⁹⁾.

A nivel micótico el aceite esencial ha demostrado efecto fungistático frente a *Microsporium canis* y *Microsporium gypseum* con una CIM de 25 ppm ⁽¹⁰⁾. En tanto el extracto acuoso como el acetónico de *tomillo* han desarrollado actividad inhibitoria *in vitro* frente a *Mycobacterium tuberculosis* ⁽¹¹⁾. Otros hongos que han demostrado sensibilidad frente al aceite esencial de *tomillo* son: *Cryptococcus neoformans*, *Saprolegnia sp.* y *Zygorhynchus sp.* Frente a hongos fitopatógenos han resultado sensibles al aceite esencial de *tomillo* *Alternaria tenuis*, *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *Botrytis allii*, *Ceratocystic ulmi*, *Cladosporium fulvum*, *Claviceps purpurea*, *Diplodia maydis*, *Fusarium spp.*, *Fusicladium effusum*, *Gioberella fujikuroi*, *Lentinus lapideus* y *Lenzites trabea* ⁽¹²⁾.

2.2.2 Actividad Antitusígena- Broncoespamólisis :

El extracto etanólico (30%) de hojas y flores de *tomillo* demostró en gatos, efectos antitusivos cuando fue administrado por vía oral en dosis de 1 mL/k. En dosis de 0,25 ml/k demostró propiedades expectorantes. La actividad antitusígena se centraría en una estimulación de los receptores β_2 de la tráquea Broucke C. Sobre músculo liso aislado de tráquea de cobayos, el aceite esencial de *tomillo* produjo efectos relajantes con una $ED_{50}=56$ mg/l, el extracto etanólico ha demostrado antagonizar en el mismo ensayo, el efecto espasmógeno-contráctil de *carbacol*, *histamina* o *prostaglandina F₂- α* sobre el músculo transversal traqueal, de forma reversible y concentración-dependiente ⁽¹³⁾.

El aceite esencial ha demostrado experimentalmente un aumento en la secreción de la mucosidad bronquial y una mayor eficacia del transporte y movimientos ciliares en bronquios. Esta actividad se debe por un lado a una acción refleja inducida por una ligera irritación gástrica; y por otro lado, a una actividad directa sobre la mucosa bronquial, a tanto a que el aceite es eliminado también a través de los pulmones.

En un estudio multicéntrico que abarcó 7.783 pacientes con bronquitis aguda (alrededor de 2000 niños < 12 años), divididos en dos grupos (4.629 con preparado herbal y 3.154

con *N-acetilcisteína* o *ambroxol*), se pudo constatar que la administración a lo largo de 10 días de un preparado herbal compuesto por 60 mg de extracto de raíz de *Primula veris* y 160 mg de extracto de partes aéreas de *tomillo*, evidenciaron una respuesta clínica significativamente superior al grupo *acetilcisteína/ambroxol*, con incluso una mejor tolerancia. El porcentaje de respuestas favorables al tratamiento herbal fue similar tanto en el grupo de pacientes adultos como en el de niños ⁽¹⁴⁾.

2.2.3 Actividad Antiespasmódica-Digestiva:

El aceite esencial de *tomillo* demostró efectos espasmolíticos sobre intestino de conejos en una concentración de 50 µg/mL y efectos relajantes sobre íleon aislado de cobayos con una ED₅₀=6,9 mg/l. La actividad antiespasmódica del aceite esencial fue comparable a *papaverina*. Tanto el *timol* como el *carvacrol* del aceite esencial presentan esta propiedad, la cual demostró ser sinergizada por la presencia de flavonoides. La misma fue observada a través de varios estudios *in vitro* demostrando ambas sustancias inhibir la actividad de la *acetilcolina* sobre los efectores autonómicos inervados por fibras colinérgicas postganglionares, con disminución de la disponibilidad del Ca²⁺ a nivel celular. La presencia de agluconas flavónicas, de comprobada actividad antioxidante, influiría muy

probablemente en su acción relajante sobre la musculatura lisa. Por su parte, el timol ha demostrado actividad colagoga, carminativa y eupéptica, en este último caso reforzada por su principio amargo *serpilina*.

2.1.4. Actividad Antiinflamatoria-Analgésica :

El extracto etanólico de *tomillo* ensayado *in vivo* sobre ratas, exhibe actividad antiinflamatoria y analgésica. Las mismas estarían relacionadas con la presencia de *carvacrol* y el *timol*. Dichos compuestos demostraron inhibición sobre la enzima *ciclooxigenasa* en modelos animales como así también inhibición de la vía del complemento ⁽¹⁵⁾. El extracto metanólico de *tomillo* no ha demostrado actividad antiinflamatoria en el edema auricular de ratón bajo inducción con *acetato de tetradecanoil-forbol* ⁽¹⁶⁾.

2.2.5. Otros usos de interés:

El tomillo es una de las plantas más importantes como aromatizante de sopas, marinadas, rellenos, guisos, verduras y platos de cocción lenta, donde suele conservar su sabor inalterable. Las hojas secas también se añaden a popurrís. Constituye uno de los principales ingredientes del bouquet garni y muchos otros platos de la cocina francesa.

El timol es muy utilizado por la industria cosmética en la elaboración de enjuagues bucales y dentífricos.

2.3. Actividad antimicrobiana

Los agentes antimicrobianos son aquellos utilizados para destruir o impedir el crecimiento de los microorganismos. Por su estado pueden ser: líquidos, sólidos o gases y por su naturaleza, físicos y químicos. ^(17,18)

La eficacia de estos agentes está condicionada por varios factores como son: la naturaleza y concentración del mismo, así como la concentración y características de la población microbiana presente, la temperatura, la duración del contacto entre el agente y los microorganismos, la naturaleza del material a descontaminar, particularmente la presencia de material orgánico, y el pH.

Los agentes antimicrobianos actúan sobre la estructura de célula bacteriana y sobre sus procesos metabólicos, y sus modos posibles de acción son: desnaturalización de la proteína, rompimiento de la membrana o de la pared celular, remoción de grupos sulfhidrilos libres, interferencia con reacciones enzimáticas de microorganismos y acción sobre el ADN ⁽²⁶⁾.

A continuación, algunos de los términos relacionados con los agentes antimicrobianos:

Bacteriostático: la máxima concentración no tóxica que se alcanza en suero y tejidos que impida el desarrollo y multiplicación de los microorganismos, sin destruirlos, pudiendo estos multiplicarse nuevamente al desaparecer el agente antimicrobiano. Sirven para complementar los mecanismos defensivos del huésped.

Bactericida: Su acción es letal sobre los microorganismos, por lo

Germicida.- Agente capaz de matar microorganismo rápidamente, algunos de estos agentes actúan matando ciertos microorganismos, pero solamente inhiben el crecimiento de otros.

Virucida.- Agente que inactiva a los virus.

Fungicida.- Agente que mata a los hongos.

Esporicida.- Agente que mata a las esporas bacteriana o micóticas.

Desinfectante.- Agente químico usado para matar microorganismos sobre objetos inaminados, pero que resulta tóxico para ser aplicado directamente a los tejidos.

Antisépticos.- Son desinfectantes que pueden ser utilizados sobre la piel y, en casos especiales, sobre las mucosas.

Estéril.- Libre de vida de cualquier clase. Tenemos que señalar, que dado que el criterio de muerte para los microorganismos es su incapacidad para reproducirse, el material estéril puede contener células microbianas metabólicamente intactas.

2.3.1. Agentes Antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos, según su acción, se pueden considerar bacteriostáticos o bactericidas y según su naturaleza pueden ser físicos o químicos. Entre los agentes físicos de esterilización se utiliza especialmente el calor (calor húmedo y calor seco), la filtración y las radiaciones.

En cuanto a los agentes químicos, algunos tienen inconvenientes para su uso, por no cumplir el principio de toxicidad selectiva, porque resultan muy tóxicos e irritantes para el hombre o porque afectan los materiales a esterilizar. (19).

Hay agentes químicos que pueden emplearse como esterilizantes, por su enérgica acción sobre los microorganismos, pero muchos tienen que ser utilizados diluidos, con el objetivo de disminuir su toxicidad y poder irritante, y en este caso se usan habitualmente como desinfectantes o antisépticos. (27)

2.3.2. Descripción de las bacterias de estudio

➤ *Staphylococcus aureus*

Son esféricos frecuentemente en forma de racimo, pero también pueden observarse aislados en parejas, en cadenas cortas o en tétradas; alcanzan de 0,5 a 1 micro de diámetro, Grampositivos e inmóviles, normalmente acapsulados, no forman esporas. (20)

Es un microorganismo del reino de los protistas, ampliamente distribuido en el ambiente, coloniza al hombre y animales. El hombre es portador asintomático entre un 20 y un 40% de los adultos sanos y forma parte de la flora normal de muchos sitios del organismo como piel y nasofaringe y tracto gastrointestinal, causando diversas manifestaciones

clínicas. Casi toda persona presenta algún tipo de infección por *S.aureus* durante la vida, que varía en gravedad desde intoxicación alimentaria (17,19).

La palabra griega "staphyle" significa racimo de uvas, y constituye la raíz del término genérico, en tanto aureus hace referencia al pigmento dorado característico de la especie.

Típicamente en el aislamiento inicial el microorganismo produce su color característico amarillo dorado, pero esta facultad es variable observándose blancas o pálidas después del cultivo en el laboratorio y aun frecuentemente en material clínico. (28)

La mayoría de cepas elaboran la enzima coagulasa, capaz de coagular el plasma también producen toxinas conocidas como estafilolisinas, donde se incluyen cuatro tipos de hemolisinas, destacando la hemolisina alfa, proteína capaz de lisar diversos tipos de células incluyendo los leucositos humanos; producen además sustancias como la hialuronidasa, estafiloquinasa, lipasa, proteinasa, nucleasa (DN-asa y RN-asa).

Existen cepas que producen penicilinas, la cual inactiva la porción beta-lactama de la penicilina.

Esto explica la resistencia del microorganismo antibióticos.

La pared estafilocócica contiene una columna vertebral de péptidoglucano y ácidos teicoicos específicos de cada especie, *S. aureus* posee un componente antifagocitario de

superficie, la proteína A, unida a la pared de peptidoglucano, pero que puede ser liberado extracelularmente.⁽²⁶⁾

Una característica importante de *S. aureus* es su facultad para desarrollar resistencia a los antibióticos, al menos el 90% de cepas de estafilococos hospitalarios son resistentes a la penicilina, gracias a la penicilinasas, es menor frecuente la resistencia penicilinasas resistentes, como la metilcilina, pero existen cepas metilcilina, pero existen cepas metilcilinasas resistentes de *S. aureus* las cuales han alterado el sitio de ataque.

S. aureus es potencialmente patógeno, las infecciones estafilocócicas específicas son los forúnculos, el impétigo ampollar, la osteomielitis, la enteritis y la intoxicación alimentaria por enterotoxina. Se comprueba que éstos causan infecciones en muchos tejidos, órganos y tractos del cuerpo como: endocarditis, septicemia, meningitis, orzuelos, neumonía, cistitis y sepsis puerperal, etc.⁽²²⁾

S. aureus puede producir una variedad de procesos infecciosos que van desde la infección cutáneas relativamente benignas hasta enfermedades sistémicas potencialmente fatales. Las infecciones cutáneas incluyen foliculitis simple y el impétigo (infección superficial de la piel en niños).⁽¹⁸⁾

En cuanto a infecciones profundas, se pueden desarrollar infecciones más extensas y profundas a partir de infecciones

cutáneas, endógenas, o de una exposición a fuentes exógenas. Un recién nacido que es hospitalizado expuesto al estafilococo puede adquirir una neumonía o una septicemia fatal. Los ancianos que han experimentado un ataque de influenza pueden sucumbir a una neumonía estafilocócica. La osteomielitis, una infección del hueso y médula ósea que asume la forma de un absceso resulta difícil de erradicar.

También hay cepas de *S. aureus* que pueden producir intoxicaciones alimentarias debido a la elaboración de exotoxinas durante su desarrollo en alimentos contaminados. Dos a tres horas después de la ingestión de ésta causa un cuadro caracterizado por vómitos violentos, calambres, diarreas y postración, raras veces es fatal, el paciente se recupera en un lapso máximo de 24-48 horas.

➤ ***Escherichia coli* :**

Las enterobacterias son bacilos gramnegativos que, en ocasiones, en cultivos jóvenes, se pueden observar formas cocobacilares y hasta cocoides. Sus bordes son rectos y sus extremos curvos. El tamaño promedio de la mayoría de estas bacterias oscila entre 0,5 y 2 μm de ancho, y de 2 a 4 μm de largo. La presencia de una cápsula puede ser observada muy rara vez en algunas cepas de *E. coli*.⁽²⁴⁾

Las bacterias pertenecientes a esta familia no pueden clasificarse sobre la base de la coloración de Gram, puesto

que todos sus miembros se presentan con la misma forma y afinidad tintoreal. ⁽²⁷⁾

E. coli son bacilos de 1 a 3 μm por 0.5 μm , sus formas varían desde cocos a pequeños bastoncillos, que se presentan solos, en pares, en cortas cadenas, agrupados, en general móviles por flagelos peritricos, aunque existen variantes móviles no flageladas. No forman esporas; generalmente son no capsulados y Gram negativos. ⁽¹⁹⁾

E. coli es la especie bacteriana más comúnmente recuperada en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que involucran virtualmente todos los tejidos humanos y sistemas de órganos. *E. coli* es uno de los organismos comunes involucrados en sepsis Gram negativa y shock inducido por endotoxinas. Las infecciones del tracto urinario y de las heridas, la neumonía en pacientes hospitalizados inmunosuprimidos y las meningitis en los neonatos son otras formas comunes de infección causada por *E. coli*.

Las infecciones por *E. coli* pueden ser divididas en extraintestinales e intestinales. Las extraintestinales pueden ocurrir por el contacto de persona a persona. *E. coli* es una causa común de infecciones urinarias como: cistitis, pielitis, pielonefritis, esto ocurre por la íntima asociación entre el hábitat normal de los microorganismos y el tracto urinario,

estas infecciones están alrededor del 20% de todas las infecciones urinarias en Hospitales. En pacientes tratados.

Las infecciones intestinales están limitadas a las producidas por las seis clases de *E. coli* que en la actualidad se consideran como patógenas entéricas, estas son:

E. coli enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* difusamente adherente (ECDA).⁽¹⁸⁾

2.3.3. Métodos para la determinación de la actividad antimicrobiana.

• Método de Difusión:

Fundamento: Para determinar la actividad antibacteriana se realizan pruebas de sensibilidad antibacteriana (Antibiogramas), mediante el método Kirby Bauer (Difusión de Disco en Agar Mûeller-Hinton).

En este método, la sensibilidad es medida por los halos de inhibición que se evidencian alrededor de discos de papel de filtro, previamente impregnados con los extractos preparados a la concentración a ensayar.

Como control positivo se utilizan discos de sensibilidad para Antibiogramas⁽²⁰⁾.

•Método de Dilución:

Fundamento: Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones decrecientes del extracto de la planta a evaluar.

Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica utilizando un medio de cultivo adecuado, posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación permite el crecimiento del microorganismo; luego se realiza la lectura, determinando que concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo ⁽¹⁹⁾.

Concentración mínima inhibitoria: Es la menor cantidad o concentración de antimicrobiano, que es capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria.

CAPÍTULO III: PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y EQUIPOS

Materiales de Laboratorio:

- Tubos de ensayo 15 x20
- Tubos de ensayo 13x100
- Gradillas para tubos
- Probeta de 100 mL.
- Percolador artesanal
- Pipetas: 1, 5 y 10 mL.
- Pipetas Pasteur
- Vaso de precipitación: 100, 500 y 1000 mL.
- Embudo de vidrio
- Placas Petri
- Espátula
- Matraz erlemeyer 250 mL.
- Fiola 100mL.
- Baguetas

- Varilla de reflujo
- Mechero bunsen
- Asa bacteriológica
- Luna de reloj
- Termómetro
- Micropipetas
- Viales
- Soporte universal
- Aros

Equipos de Laboratorio:

- Autoclave
- Destilador
- Estufa
- Cocinilla eléctrica
- Campana bacteriológica de flujo laminar
- Baño maría
- Balanza analítica
- Molino manual
- Refrigerador

Reactivos e insumos:

- Etanol 96°
- Agua destilada
- Diclorometano
- Alcohol amílico
- Anhídrido acético
- Acido clorhídrico Q.P
- Acido sulfúrico Q.P.
- Solución de hidróxido de sodio 5%
- Limaduras de magnesio
- Solución gelatina 1%
- Solución de cloruro férrico 5%
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Dragendorff

Material vegetal:

- Hojas y flores de *Thymus sp L.* (Tomillo).

Material Biológico:

- Cepas de *Staphylococcus aureus*

- Cepas de *Escherichia coli*

Medios de Cultivo:

- Agar Mùller-Hinton

- Caldo nutritivo

Control Positivo:

- Amoxicilina (25 mg/mL).

Control Negativo:

- Etanol de 96°

- Agua destilada

Otros materiales:

- Guantes

- Mascarillas

- Equipo de venoclisis

- Viales

- Algodón

- Hisopos

- Papel de filtro

- Papel platino

- Papel kraff

- Plumón indeleble

- Etiquetas

3.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE ESTUDIO

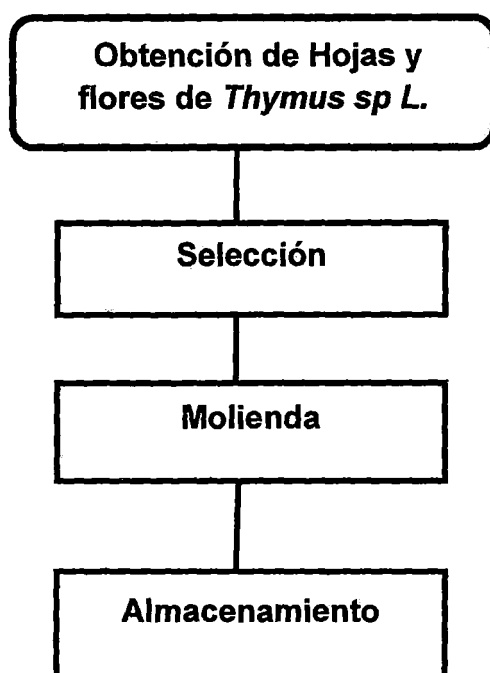
3.2.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL:

Las hojas y flores de *Thymus sp L.* fueron adquiridas en el Hipermercado Tottus de la ciudad de Ica, en el mes de Julio del 2013.

3.2.2. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA: ^(21,23)

Las muestras obtenidas, estaban envasadas en bolsas herméticamente cerradas. Encontrándose la muestra seleccionada seca casi entera. Se procedió a triturar en un mortero y después se almacenó la muestra en frasco de color ámbar.

Flujograma N° 1: Tratamiento de la muestra



3.3. SCREENING FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS:⁽²⁰⁾

- **Extracto Etanólico.-** Se peso 10 g de muestra seca y molida y se maceró en 90 mL. de etanol de 96°, durante 7 días se filtró y concentró a mitad de volumen para realizar la identificación de los metabolitos secundarios.

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS:⁽²⁴⁾

REACCIÓN DE GELATINA.- Tomar 0.5 mL de muestra y agregar 0.5 ml de solución acuosa de gelatina al 0.5%.

Para la determinación de taninos, la reacción es positiva si aparece turbidez o precipitado.

REACCIÓN DE CLORURO FÉRRICO.- Tomar 0.5 mL de la muestra y añadir 1-2 gotas de solución acuosa de cloruro férrico al 0.5%.

Para la determinación de grupos fenólicos libres, la reacción es positiva si aparece un color intenso azul, negro o verde.

REACCIÓN LIEBERMAN-BURCHARD.- Tomar 0.5 mL de muestra, se agregan 0.5 mL de anhídrido acético y 1 gota de ácido sulfúrico concentrado.

Para la determinación de triterpenoides y/o esteroides, la reacción es positiva si aparece un color azul, verde o naranja.

REACCIÓN DE BORNTRAGER.- Tomar 0.5 de la muestra, se agitan suavemente con 5 mL de NaOH al 5% y se observa el color de la fase acuosa.

Para la determinación de antraquinonas, la reacción es positiva si se observa una coloración roja.

REACCIÓN PARA ALCALOIDES: Tomar 2 mL de la muestra y se lleva a sequedad, el residuo se disuelve con 5 mL HCl al 1%, calentado ligeramente a 50⁰C, sobre esta solución se hacen las reacciones de MAYER, WAGNER Y DRAGENDORFF.

Para los ensayos se toma 0.5 ml de la solución y se le agregan gotas del reactivo correspondiente.

Reacción Mayer: La reacción es positiva si aparece un precipitado de color blanco.

Reacción Wagner: La reacción es positiva si aparece precipitado color marrón.

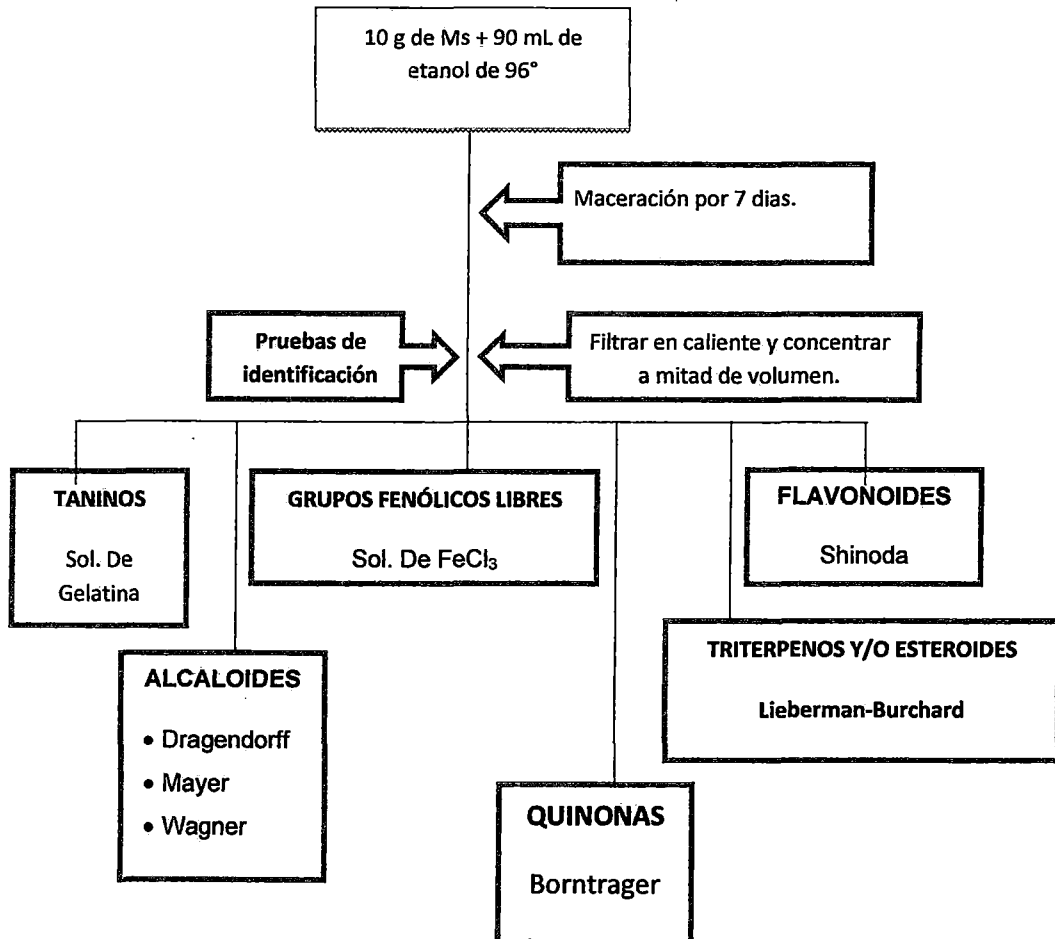
Reacción Dragendorff: La reacción es positiva si aparece precipitado color anaranjado.

REACCIÓN DE SHINODA: Tomar 0.5 mL de muestra y agregar 0.2 mL. de HCl concentrado, se agregan limaduras de Magnesio. Se deja reposar 5 minutos.

Para la identificación de flavonoides, la reacción es positiva si aparece un color rojo o rosado.

Flujograma N° 2: Screening Fitoquímico del Extracto

Etanólico de *Thymus sp L.*



Fuente: Los Autores.

- **Extracto Acuoso.-** Se pesó 10 g de muestra seca y molida y se maceró en 90 mL de agua destilada, se llevó a reflujo por 1 hora, se filtró y concentró a mitad de volumen para realizar la identificación de los metabolitos secundarios.

IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS: (36,42, 43).

REACCIÓN DE GELATINA.- Tomar 0.5 mL de muestra y agregar 0.5 ml de solución acuosa de gelatina al 0.5%.

Para la determinación de taninos, la reacción es positiva si aparece turbidez o precipitado.

REACCIÓN DE CLORURO FÉRRICO.- Tomar 0.5 mL de la muestra y añadir 1-2 gotas de solución acuosa de cloruro férrico al 0.5%.

Para la determinación de grupos fenólicos libres, la reacción es positiva si aparece un color intenso azul, negro o verde.

REACCIÓN PARA ALCALOIDES: Tomar 2 mL de la muestra y se lleva a sequedad, el residuo se disuelve con 5 mL HCl al 1%, calentado ligeramente a 50⁰C, sobre esta solución se hacen las reacciones de MAYER, WAGNER Y DRAGENDORFF.

Para los ensayos se toma 0.5 ml de la solución y se le agregan gotas del reactivo correspondiente.

Reacción Mayer: La reacción es positiva si aparece un precipitado de color blanco.

Reacción Wagner: La reacción es positiva si aparece precipitado color marrón.

Reacción Dragendorff: La reacción es positiva si aparece precipitado color anaranjado.

REACCIÓN DE SHINODA: Tomar 0.5 mL de muestra y agregar 0.2 mL de HCl concentrado, se agregan limaduras de Magnesio. Se deja reposar 5 minutos.

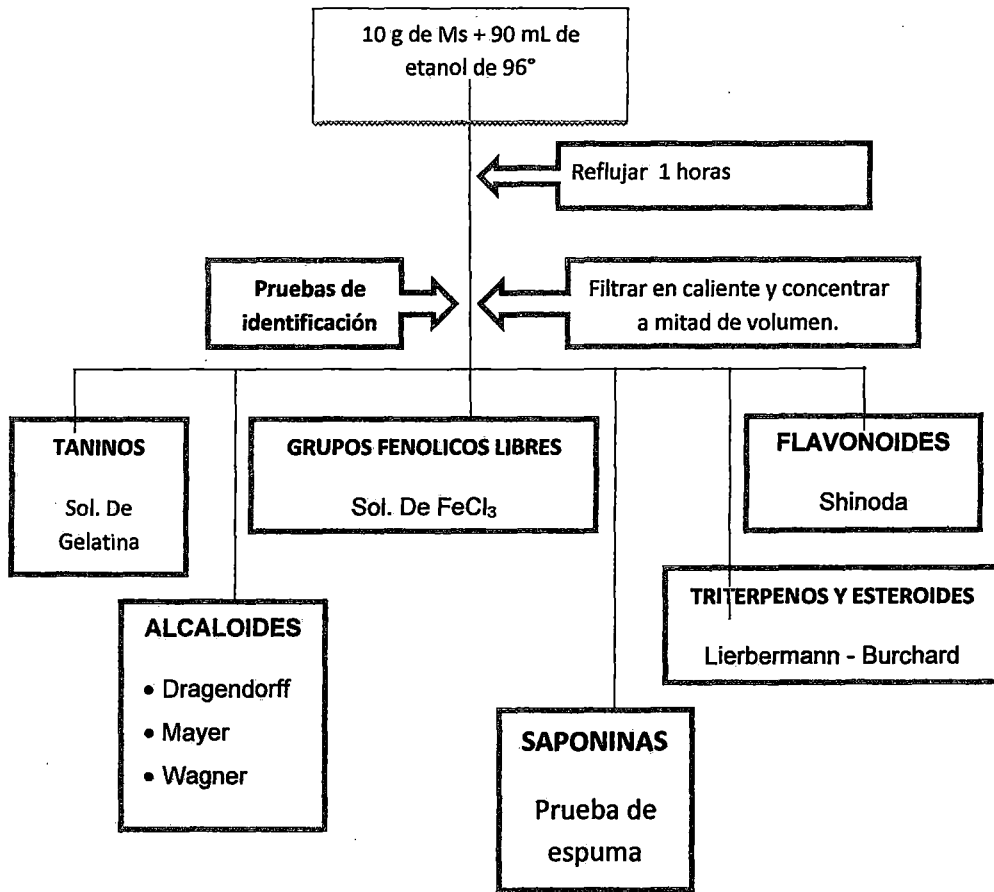
Para la identificación de flavonoides, la reacción es positiva si aparece un color rojo o rosado.

PRUEBA DE ESPUMA: Colocar en un tubo de ensayo 1 mL de la muestra, tapar y agitar fuertemente durante 15 minutos, luego de ese tiempo se mide la altura de espuma.

Para la identificación de saponinas, la reacción es negativa si la altura de espuma es menor de 5 mm.

Flujograma N° 3: Screening Fitoquímico del Extracto

Acuoso de *Thymus sp L.*



Fuente: Los Autores.

3.4. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS:

Se obtuvieron dos tipos de extractos:

- **Extracto Etanólico por Percolación** ⁽²⁴⁾

Se realiza a temperatura ambiente, que consiste en el paso del solvente través de la droga hasta su extracción completa.

Se pesa 50 gramos de la muestra seca y molida , se colocó en un vaso de precipitación de 1000 mL, se humectó la muestra con etanol de 96° , se dejó en reposo por espacio de 1 hora seguidamente se colocó la muestra en el percolador, se le agregó 500 mL del solvente se deja en maceración por un periodo de 48 horas. Luego se empieza a lixiviar lentamente 20 gotas por minuto, se recibe en un frasco ámbar y se cierra herméticamente. Se procedió a agregar solvente al percolador se deja por 24 horas, pasado el tiempo indicado se vuelve a lixiviar y finalmente todo se junta y es llevado a concentrar a sequedad.

- **Extracto acuoso por reflujo.** ^{(21,24).}

Se pesó en una balanza analítica 50 g de la muestra seca y molida, se colocó en un matraz erlenmeyer, se añadió 500 mL de agua destilada y se colocó la varilla de reflujo se llevó a baño maría por 4 horas a una temperatura de 60°C, concluida la extracción se retiró la varilla de reflujo y se procedió a filtrar y concentró a sequedad.

3.5 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

3.5.1 Cepas utilizadas:

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*

Las cepas fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" de Ica. Las cuales fueron obtenidas del Instituto Nacional de Salud.

3.5.2 Medios de Cultivo:

- Agar Müeller-Hinton
- Caldo Nutritivo.

3.5.3 Control Positivo:

- Amoxicilina (25 mg/mL)

3.5.4 Control Negativo:

- Etanol 96°
- Agua destilada

3.5.5 Preparación de Medios de Cultivo y Cepas:

3.5.5.1 Preparación del Medio de Cultivo Sólido.-

Todos los materiales de laboratorio (material de vidrio, fierro, torundas, discos de papel Whatman, etc), fueron previamente esterilizados.

Para preparar el medio de cultivo Mûeller–Hinton, se suspende 39 g de éste en 1000 mL de agua destilada, y se calienta a ebullición hasta disolución completa. Se distribuye en frascos y se esteriliza en autoclave por 15 minutos y 15 lb de presión (121°C).

Se vertió el medio derretido en placas Petri estériles cubriendo la superficie con una capa de 4 mm de grosor y dejar que el medio se endurezca ⁽¹⁸⁾.

3.5.5.2 Preparación del Medio de Cultivo Líquido.-

Se suspendió la cantidad requerida de cultivo (polvo en gramos por litro de agua destilada. Luego se mezcló hasta uniformizar. Se calentó agitando frecuentemente unos minutos hasta que se disolvió y se llevó a autoclave entre 15 a 20 minutos a 121°C 0 15 lb de presión. Luego se distribuyó en placas o en tubos.

3.5.5.3 Preparación del Inóculo.-

De un cultivo puro se tomó una asada de 4 a 5 colonias que presentaron las mismas características morfológicas.

Luego fueron sembradas en caldo nutritivo para bacterias.

Seguidamente fueron incubados a 37 °C por 24 horas, para determinar aproximadamente la concentración

microbiana estos caldos fueron ajustados a la turbidez del estándar N° 0.5 de Mac Farland.

3.5.6 Determinación de la Actividad Antibacteriana:

3.5.6.1 Método de Difusión de Disco en Agar.-

Fue empleado el método de Kirby Bauer (Difusión de Disco en Agar Mûeller-Hinton).

Las placas petri con agar Mûeller-Hinton, previamente rotuladas, fueron sembradas con la ayuda de una torunda empapada de bacteria tratando que la siembra sea uniforme, luego se dejó secar por un tiempo de 10 minutos.

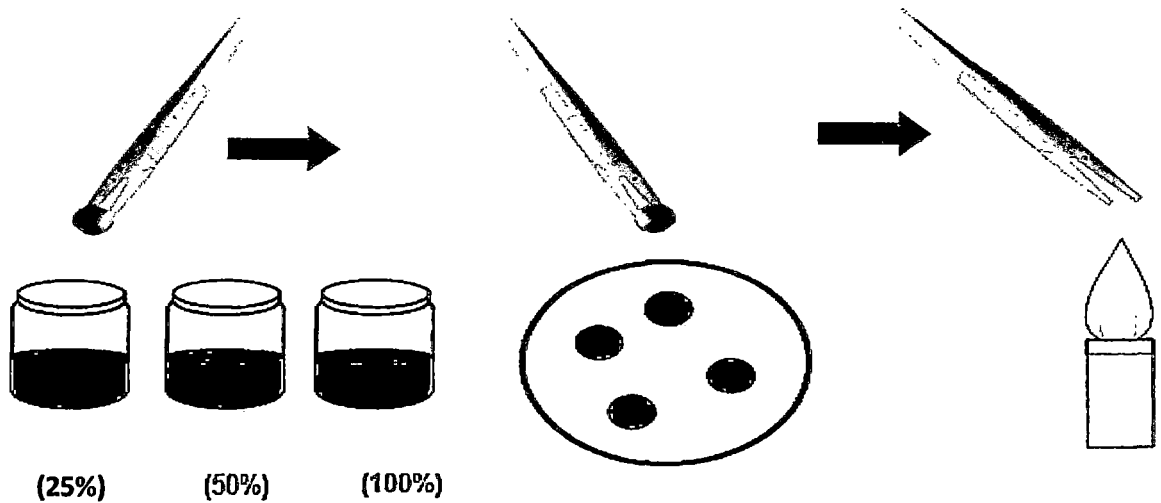
Seguidamente se prepararon extractos acuosos y etanólicos a concentraciones de 25%(250 mg/mL), 50%(500 mg/mL) y 100%(1000 mg/mL). Se colocaron 3 discos de papel de filtro embebidos con las diferentes concentraciones del extracto acuoso, etanólico y la amoxicilina (Control positivo) en cada placa petri, con la ayuda de una pinza la cual fue previamente esterilizada al mechero antes de coger el siguiente disco, los mismos que fueron ubicados de tal manera que las zonas de inhibición no se entrecrucen.

Seguidamente las placas fueron incubadas en posición invertidas a temperatura de 37°C por 24 horas ^(39,46).

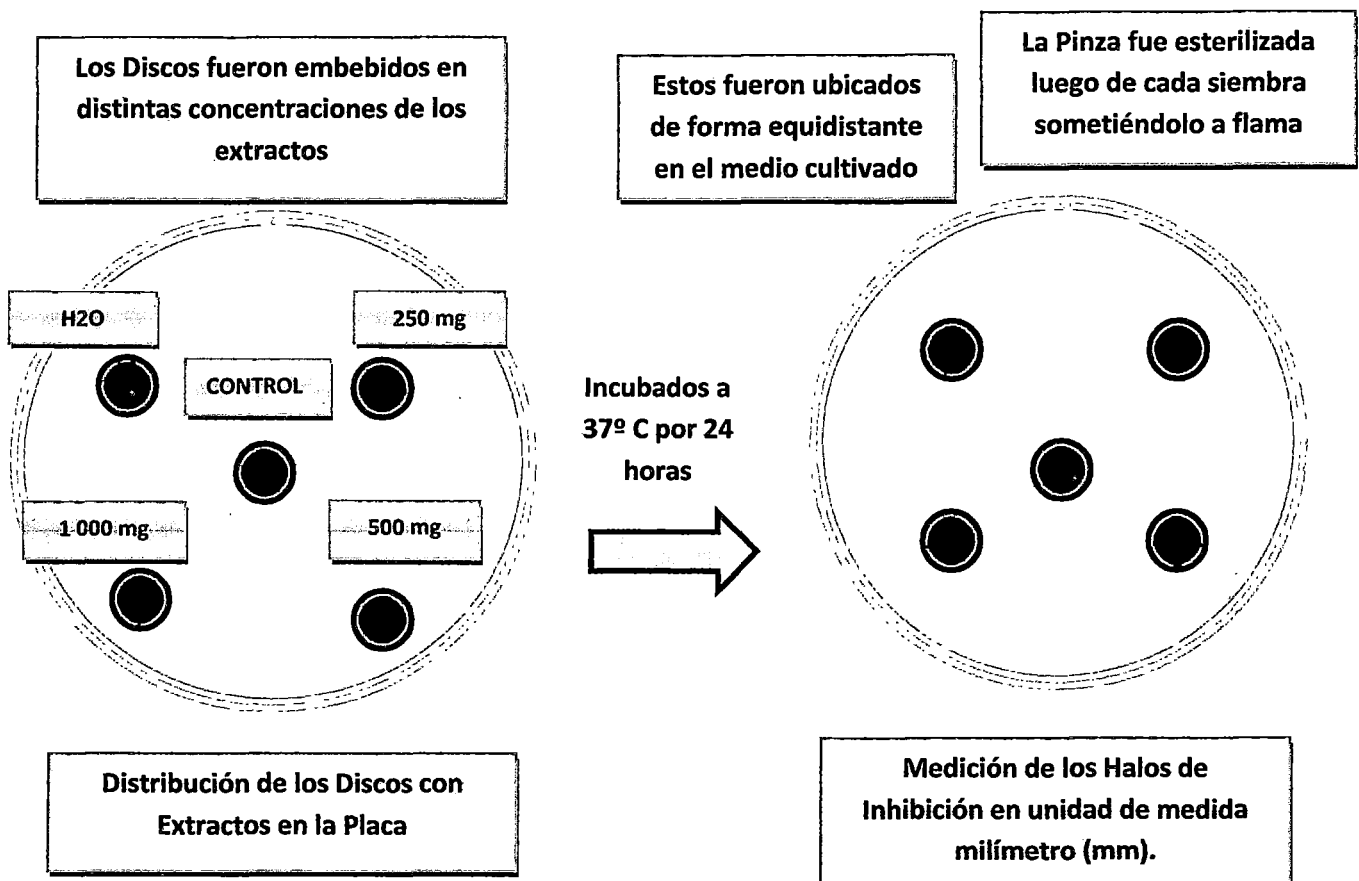
Lectura:

Se verificó los halos de inhibición formados procediéndose a tomar las medidas teniendo en cuenta el diámetro de estos.

Figura N° 3 : Método de Difusión en Agar del extracto acuoso de *Thymus sp L.*



Método de diluciones sucesiva



3.5.6.2 Método de Dilución: Concentración Mínima

Inhibitoria (CMI):

Se empleó el Método de dilución como se detalla:

A partir del cultivo puro se toma una asada cargada con el inóculo, se toca y limpia el aro del asa bacteriológica en un ángulo que forme entre el caldo y el vidrio del tubo de ensayo.

Se flameó la boca del tubo y se vuelve a tapar dejándolo en la gradilla previamente rotulada según la bacteria replicada.

Se incubó a 37°C por 24 horas, cumplido el tiempo se ajustó al estándar 0.5 de Mac Farland.

Se rotuló 10 tubos de ensayo estériles por cada tipo de extracto.

A partir del tubo N° 2 hasta el tubo N° 10 se le agrega 0.5 mL de Caldo Nutritivo para bacterias.

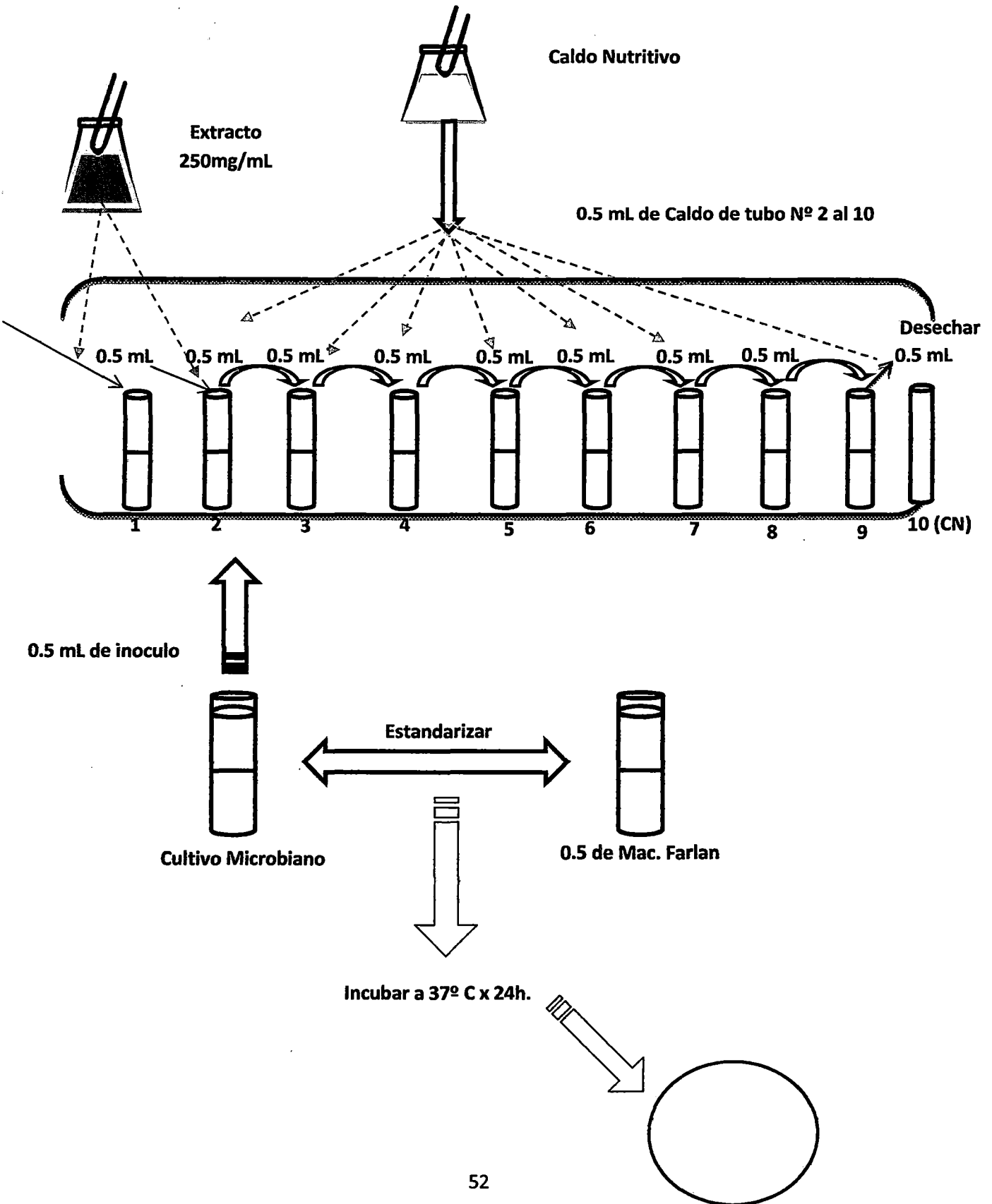
Seguidamente se coloca 0.5 mL del extracto al 25% al tubo N° 1 y tubo N° 2, a partir del tubo N° 2 se traspasó 0.5 mL al tubo N° 3 mezclando, y así sucesivamente hasta el tubo N° 9; del tubo N° 9 se coge 0.5 mL y se desechó. El tubo de ensayo N° 10 no recibió extracto.

Luego se agrega 0.5 mL del inóculo microbiano a todos los tubos y se incuba a 37°C por 24 horas ^(33,45).

Lectura.-

Para determinar si hubo o no crecimiento microbiano, se analizó principalmente la turbidez, se elige el tubo con la menor concentración donde no se observó crecimiento bacteriano, los tubos que presentaron turbidez, nos indican crecimiento bacteriano, mientras en los tubos que no se observó turbidez, indicaron ausencia de crecimiento bacteriano, por lo tanto susceptibilidad de los microorganismos usados frente al extracto, la prueba se realizó por triplicado.

Figura N° 4: CMI del extracto acuoso de *Thymus sp L.*



3.5.6.3 Porcentaje de Inhibición Relativa (PIR): ^(22,27)

Para la determinación del porcentaje de inhibición relativa (PIR) se utilizaron los resultados obtenidos por los extractos frente a los obtenidos por el control positivo que fue el antibiótico amoxicilina (25 mg/mL).

$$\text{PIR (\%)} = \frac{A \times 100}{B}$$

Donde:

A= Promedio del diámetro del halo de inhibición del extracto.

B= Promedio del diámetro del halo de inhibición del antibiótico

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

**Tabla N° 1: Screening Fitoquímico del Extracto Etanólico de
*Thymus sp L.***

Metabolitos	Reacción	Resultado	Observación
Taninos	Sol. de Gelatina	++	Turbidez
Compuestos fenólicos libres	Sol. De FeCl ₃	+++	Coloración verde oscuro
Flavonoides	Shinoda	+	Coloración amarilla
Alcaloides	Dragendorff	+++	Precipitado Anaranjado
	Mayer	+++	Precipitado blanco
	Wagner	+++	Precipitado marrón
Triterpenos y Esteroides	Liebermann y Burchard	+++	Coloración verde oscuro
Saponinas	Prueba de Espuma	-	-----

Fuente: Los Autores

Leyenda: (+++): Abundante
 (++) : Moderado
 (+) : Leve
 (-) : Ausente

Tabla N° 2: Screening Fitoquímico del Extracto Acuoso

Thymus sp. L.

Metabolitos	Reacción	Resultado	Observación
Taninos	Sol. de Gelatina	++	Turbidez
Compuestos fenólicos libres	Sol. De FeCl₃	+++	Coloración verde oscuro
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración anaranjada
Alcaloides	Dragendorff	+++	Precipitado Anaranjado
	Mayer	-	-----
	Wagner	-	-----
Saponinas	Prueba de Espuma	++	Espuma

Fuente : Los Autores

Leyenda: (++) : Abundante
 (++) : Moderado
 (+) : Leve
 (-) : Ausente

**Tabla N° 3: Método de Difusión en disco de los extractos de
*Thymus sp L.***

Microorganismos	Extractos	Diámetro (mm) de zona de Inhibición a diferentes cc (mg/mL)			Control (+)	PIR% 250 mg/mL
		100%	50%	25%		
<i>Staphylococcus aureus</i>	Etanólico - Percolación	7.0	6.5	6.1	28	21.79
	Acuoso - Reflujo	15.5	14.5	14.1	28	50.36
<i>Escherichia coli</i>	Etanólico- Percolación.	7.5	6.5	5.2	25	20.8
	Acuoso - Reflujo	-	-	-	25	-

Fuente: Autores

Donde:

- C.P. = Amoxicilina 25 mg/mL
- C.N.= Alcohol de 96° y agua destilada
- PIR = Porcentaje de Inhibición Relativa.

**Tabla N° 4: Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos de
*Thymus sp L.***

Microorganismo	Extracto	Concentración decreciente de extractos mg/mL.									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Concentración mg/MI (25%)	250	125	62.5	31.25	15.6	7.8	3.9	2.0	1.0	CN
<i>Staphylococcus aureus</i>	Acuoso - Reflujo	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	Etanólico-Percolación	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	Acuoso-Reflujo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Etanólico-Percolación	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Fuente: Los autores

Donde :

C.N. : Control del microorganismo en caldo

(+) : Crecimiento microbiano

(-) : Sin crecimiento microbiano

Tabla N°5: Concentración mínima inhibitoria de los extractos acuoso y etanólico de *Thymus sp L.*

Extractos Microorganismo	CMI (mg/mL)	
	Acuoso x reflujo	Etanólico percolación
Staphylococcus aureus	15.6	31.25

Fuente: Los autores

DISCUSIÓN:

El *Thymus sp L.* es una especie oriunda de la región mediterránea occidental, en especial del sur de Italia. Se cultiva extensamente en casi todos los países como planta aromática culinaria (en especial en el sur de Francia, España, Marruecos y Norteamérica). En el Perú se cultivan en las provincias de Sihuas y Corongo, ubicadas al nororiente de la Región de Ancash.

En medicina tradicional el tomillo se ha empleado las hojas y flores, contra la tos ferina, las inflamaciones crónicas de los bronquios, el asma, el dolor de estómago, los trastornos digestivos y la diarrea. Se ha llegado a utilizar como repelente de mosquitos. En uso externo, se recomiendan topicaciones lavativas frente a distintos tipos de infecciones o heridas cutáneas.

En un trabajo anterior realizado por Cáceres A. *et al.*, 1991, determinó que el extracto acuoso de las hojas de tomillo es activo frente a *Staphylococcus aureus*.

Otros ensayos *in vitro* realizados por Allegrini J. *et al.* 1972; Ramonaelina A. *et al.*, 1987; Safiyev S. *et al.*, 1997; Essawi T. & Srour M., 2000; con el aceite esencial corroboraron su actividad frente a *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*, al mismo tiempo que ejercieron actividad inhibitoria frente *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogens*, *Enterococcus faecalis* y *Corynebacterium diphtheriae*.

En el trabajo realizado se determinó la actividad del extracto acuoso y etanólico de *Thymus sp L.*, a una concentración de 250 mg/mL, contra *Staphylococcus aureus*, mostró halos de inhibición . En comparación con el control positivo de Amoxicilina, se considera una sensibilidad intermedia y resistente respectivamente.

El extracto etanólico por percolación, frente a *Escherichia coli*, mostró un halo de inhibición de 5.2 mm, y el extracto acuoso por reflujo no presentó halos de inhibición.

La ausencia de actividad inhibitoria del extracto acuoso de *Thimus sp L.* frente a *Escherichia coli*, comparado a lo observado con *Staphylococcus aureus*, se relaciona con las diferencias estructurales en dichas bacterias representantes tanto de bacterias Gram negativas como bacterias Gram positivas respectivamente, donde las Gram negativas presentan una envoltura externa que protege a la pared bacteriana (que es mas angosta) mientras que en las Gram positivas no se presenta dicha envoltura estando más expuesta la pared bacteriana (más ancha o gruesa) donde posiblemente actuaría el extracto evaluado, desestabilizando la pared bacteriana.

Con respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a una concentración de 250 mg/mL para el extracto acuoso por reflujo fue de 15.6 mg/mL y para el extracto etanólico por percolación se observó a una concentración de 31.25 mg/mL.

Los metabolitos secundarios identificados en los extractos acuoso y etanólico de *Thymus sp L.*, fueron: taninos, compuestos fenólicos libres, triterpenos y esteroides, antraquinonas, alcaloides, flavonoides y saponinas.

CONCLUSIONES:

1. La actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de *Thymus sp L.*, a una concentración de 250 mg/mL, contra *Staphylococcus aureus*, mostró halos de inhibición de 14.1 mm y 6.1 mm respectivamente.
2. El extracto etanólico por percolación, frente a *Escherichia coli*, mostró un halo de inhibición de 5.2 mm, y el extracto acuoso por reflujo no presentó halos de inhibición.
3. El porcentaje de inhibición relativa (PIR) frente a *Staphylococcus aureus*, para el extracto acuoso por reflujo fue de 50.36 %, mientras que el extracto etanólico por percolación obtuvo un 21.79%. El PIR para el extracto etanólico por percolación frente a *Escherichia coli* fue de 20.8%.
4. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a una concentración de 250 mg/mL. para el extracto acuoso por reflujo fue de 15.6 mg/mL y para el extracto etanólico por percolación se observó a una concentración de 31.25 mg/mL.
5. Los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Thymus sp L.*, fueron: taninos, compuestos fenólicos libres, triterpenos y esteroides, antraquinonas, alcaloides, flavonoides y saponinas

RECOMENDACIONES:

- 1. Continuar con estudios sobre la actividad antibacteriana de los extractos *Thymus sp* L., frente a otros microorganismos.**
- 2. Realizar estudios de Toxicidad aguda de los extractos acuosos y etanólico.**
- 3. Incentivar a los estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, para que realicen investigaciones de plantas medicinales**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Alonso J. Tratado de fitofármacos y nutracéuticos, Buenos Aires-Argentina., 2004.
2. Palacios J. Plantas medicinales nativas del Perú. Tercera edición Lima-Perú, 2006.
3. Brack Egg, A. Diccionario Enciclopédico de Plantas útiles del Perú. Cuzco, 1999.
4. Dorman H. and Deans S.: Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88 (2): 308-16 (2000).
5. Passet J.: Parfums, Cosmetics et Aromes. 28: 39 (1979).
6. Cáceres A.; Álvarez A.; Ovando A. y Samayoa B.: Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. I. Screening of 68 plants against Gram positive bacteria. *J. Ethnopharmacol.*31: 193-208 (1991).
7. Díaz R.; Quevedo Sarmiento J.; Ramos Cormenzana A.; Cabo P. and Cabo J.: Phytochemical and antibacterial screening of some species of Spanish Lamiaceae. *Fitoterapia.* 59 (4): 329-332. (1988).
8. Essawi T. and Srour M.: Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 70 (3): 343-9 (2000).
9. Smith-Palmer A, Stewartt J, Fyfe L.: Inhibition of listeriolysin O and phosphatidylcholine-specific production in *Listeria monocytogenes* by subinhibitory concentrations of plant essential oils. *J Med Microbiol* 51(7):567-74 (2002).

10. Perrucci S.; Mancianti F.; Cioni P.; Flamini G.; Morelli I. and Macchioni G.: In vitro antifungal activity of essential oils against some isolates of *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. *Planta Med.* 60: 184-5 (1994).
11. Lall N. and Meyer J.: In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *J. Ethnopharmacol.* 66 (3): 347-54 (1999).
12. Soliman K. and Badeaa R.: Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol* 40(11):1669-75 (2002).
13. Meister A.; Bernhardt G.; Christoffel V. and Buschauer A.: Antispasmodic activity of *Thymus vulgaris* extract on the isolated guinea-pig trachea: discrimination between drug and ethanol effects. *Planta Med.* 65 (6): 512-6 (1999).
14. Peris J.; Stübing G. y Vanaclocha B.: *Fitoterapia Aplicada*. Col. Farmac. Valencia. Ed. MICOF. (1995).
15. Gancevici G. and Popescu C.: Natural inhibitors of complement. III. Inactivation of the complement cascade in vitro by vegetal spices. (*Ocimum basilicum*, *Artemisia dracuncululus* and *Thymus vulgaris*). *Arch. Roum. Pathol. Exp. Microbiol.* 46 (4): 321-31 (1987).
16. Yasukawa K.; Yamaguchi A.; Arita J.; Sakurai S.; Ikeda A.; Takido M.: Inhibitory effect of edible plant extracts on 12-0-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate-induced ear oedema in mice. *Phytother. Res.* 7: 185-9 (1993).
17. Actividad Antimicrobiana de las Plantas disponible:
www.uvmnet.edu/investigacion/episteme/numero8y96/documentos/a_.doc.

2006-10-02

18. Actividad Antimicrobiana disponible:

<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp8.pdf> 2006

2009-04-25.

19. Elmer W. et. al. 2001. Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color. 5ª. ed. Argentina. Panamericana. pp. 171, 190, 198, 202, 209, 528-535, 818-825, 955, 1015-1017.

20. Santander C. Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto total de *Peperomia galloides* H.B.K (siempre viva). Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.N.ICA; 2005: 17-28.

21. Miranda M. Farmacognosia y Productos Naturales. 1ed. Ed. Universidad de la Habana.Cuba. 2001.

22. Guillermo J, Salinas M. Manual Práctico de Microbiología". Facultad de Ciencias. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, 1995.

23. Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica de Plantas medicinales. 2ed. Ed. Acribia España, 2001.

24. Barrionuevo C. Vizarreta M. Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de hojas y tallos del *Psidium guajava* L (Guayaba).Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico. Facultad de Farmacia y Bioquímica. U.N.ICA.;2006 : 12-38

25. Cañigüeral S. Plantas Medicinales y drogas vegetales, Editorial Masson. España, 1998.

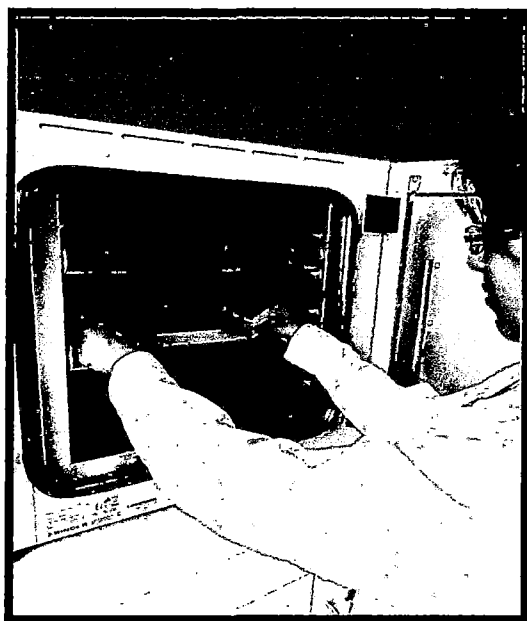
26. Murray P.,Rosenthal,K. Microbiología Médica.5ª. ed. España. Elsevier Masson. pp. 7, 67, 89, 221, 323, 357, 2007.

27. Alvares, V. et. al. 1990. Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. España.pp. 28, 70-78, 111.
28. Saldierna J. Recetario de Hierbas y Plantas Medicinales Editorial Lexus. México, 2000.
29. Castillo E. Martínez I. Manual de Fitoterapia, editorial Elsevier Masson. Barcelona- España, 2007.

ANEXO N°1: TRATAMIENTO DE LA MUESTRA



Selección de la muestra



Secado en Estufa

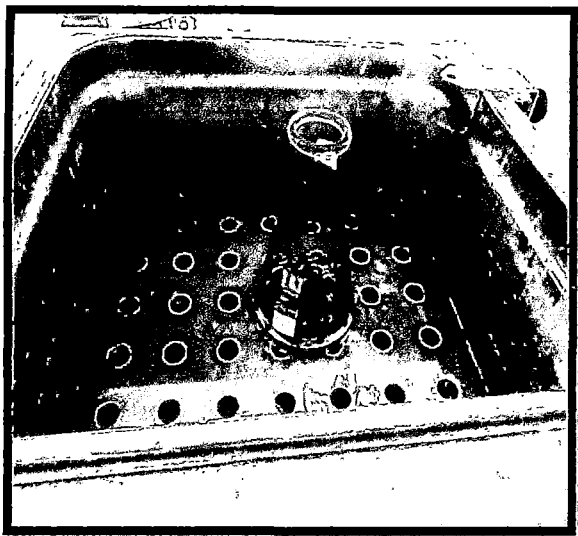


Percolador artesanal



Equipo de reflujo

ANEXO Nº2: PREPARACIÓN DE EXTRACTOS PARA EL SCREENING FITOQUIMICO



Extracto en baño maría



Filtración del extracto

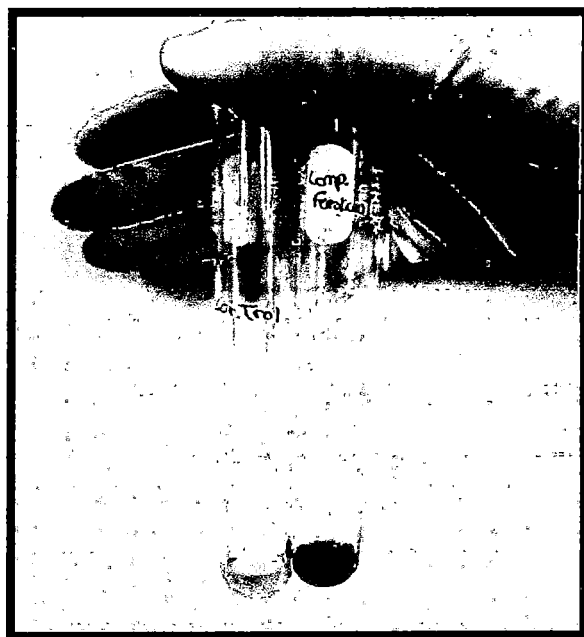


Reactivos de coloración y/o precipitación

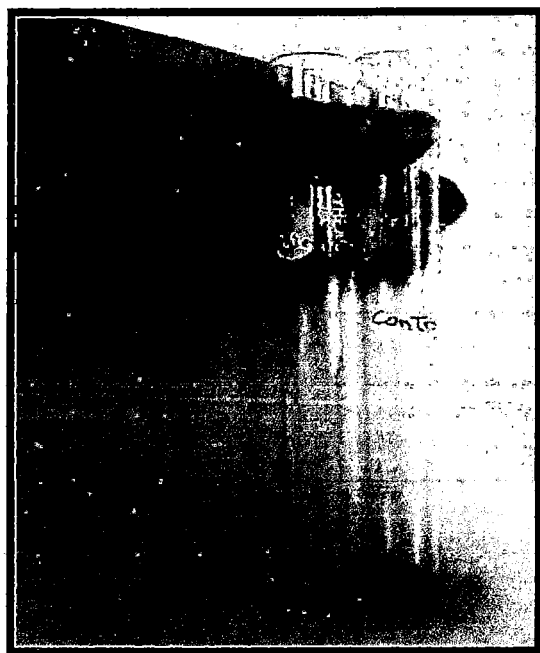
ANEXO N° 3: SCREENING DEL EXTRACTO ETANÓLICO



Taninos

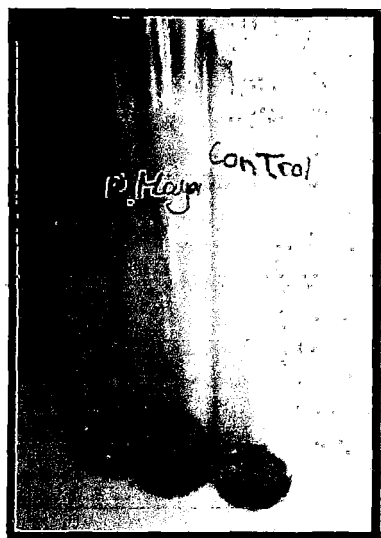


Compuestos fenólicos



Triterpenos y/o esteroides

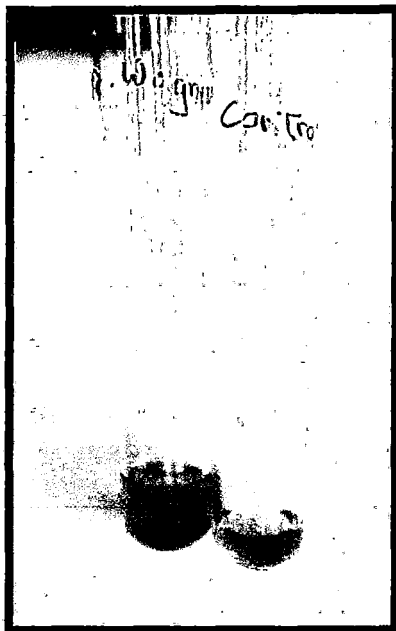
ANEXO Nº4: IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES EN EL EXTRACTO ETANÓLICO



TUBO 1: Con el reactivo de Mayer



TUBO 2: Con el reactivo Dragendorff

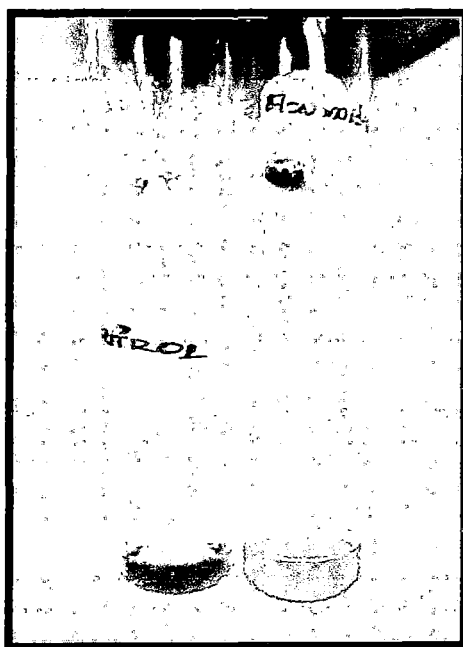


TUBO 3: Con el reactivo Wagner

ANEXO N°5: SCREENING FITOQUIMICO DEL EXTRACTO ACUOSO



Extracto Acuoso



Flavonoides del extracto acuoso

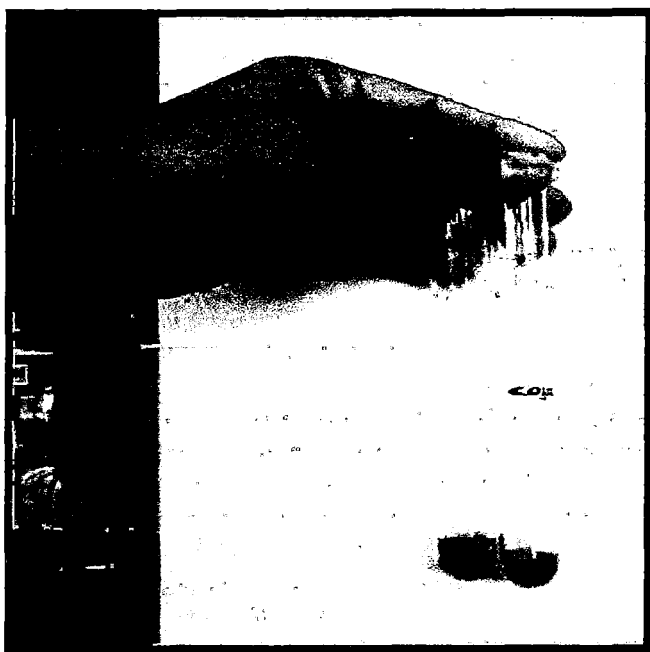


Extracto acuoso: Saponinas

ANEXO N°6: Extracto acuoso



Extracto acuoso: Compuestos fenólicos

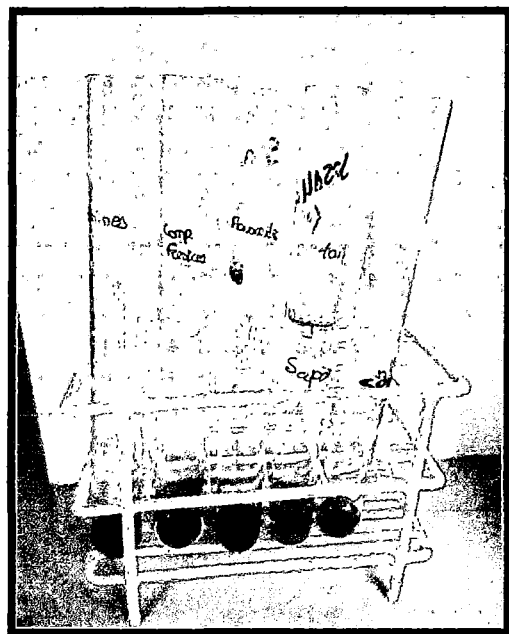
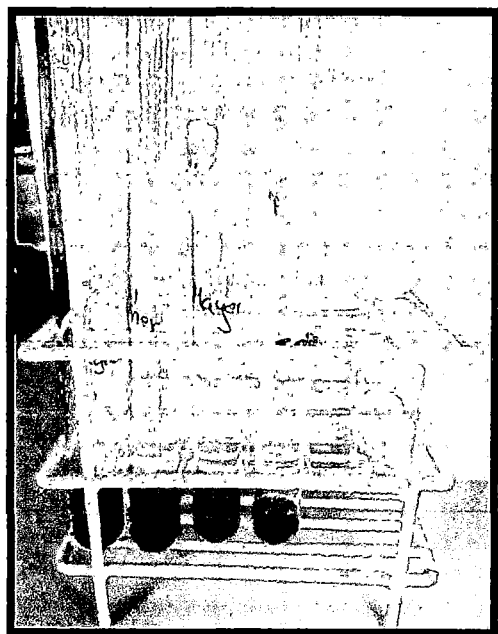


Extracto acuoso: Taninos

ANEXO N°7: IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES



EXTRACTO ACUOSO ALCALOIDES: Mayer, Dragendorff y Wagner



Reacciones del extracto acuoso

ANEXO N°8: PATÓGENOS Y AGARES QUE SE UTILIZARON EN LA SIEMBRA

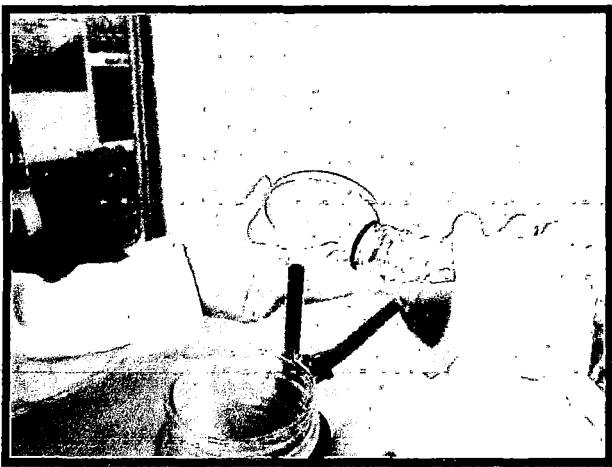
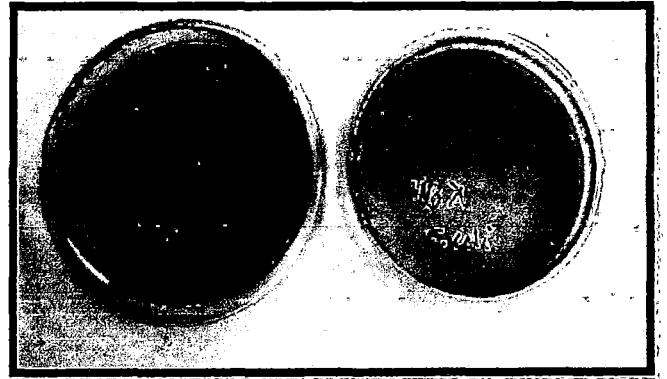


Agares:

- Agar Müller-Hinton
- Caldo nutritivo

Los patógenos:

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*



Plaqueando los agares

ANEXO N°9: PREPARACIÓN DE LAS PLACAS PARA LA SIEMBRA



Preparando las placas con los agares.

Placas para las siembras.

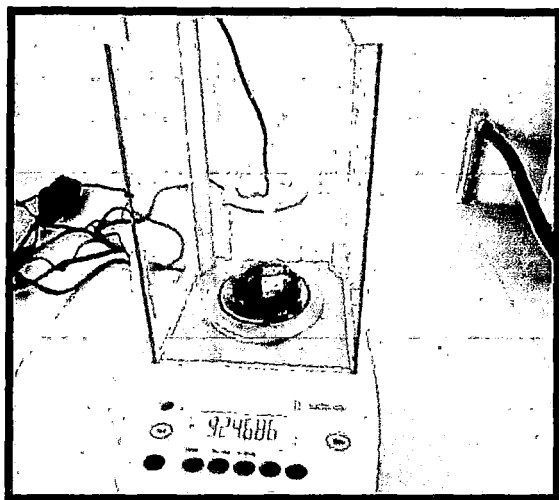


Preparando el control con amoxicilina.

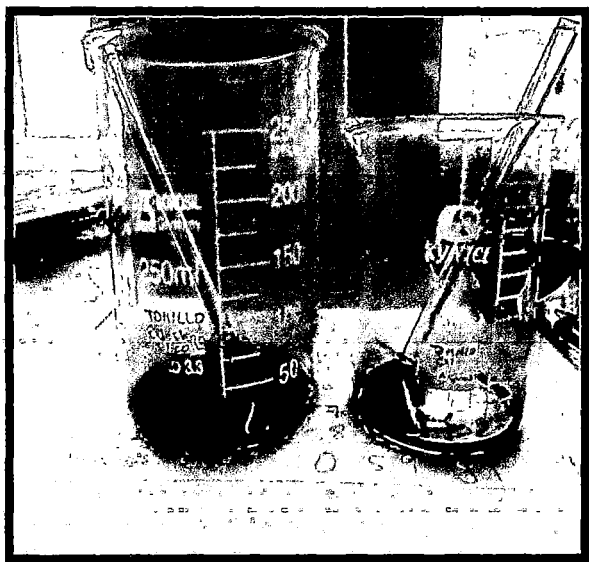
ANEXO Nº10: PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DEL EXTRACTO ETANÓLICO



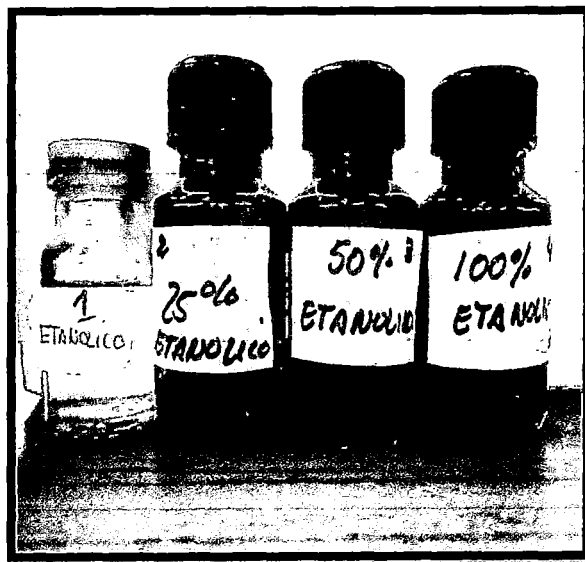
Extracto Etanólico y extracto acuoso



Peso del extracto etanólico

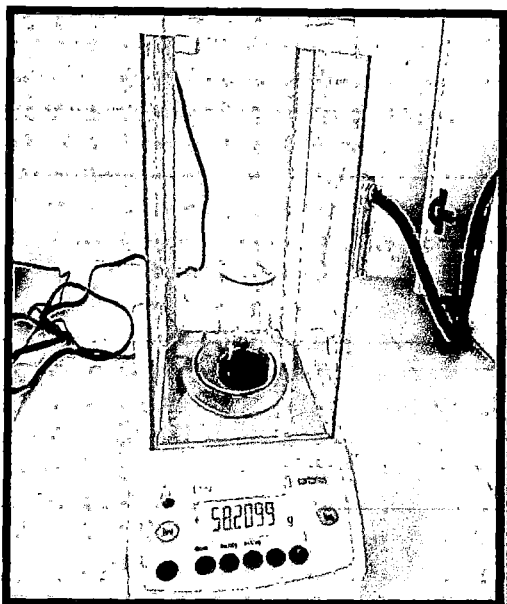


Diluciones de extractos

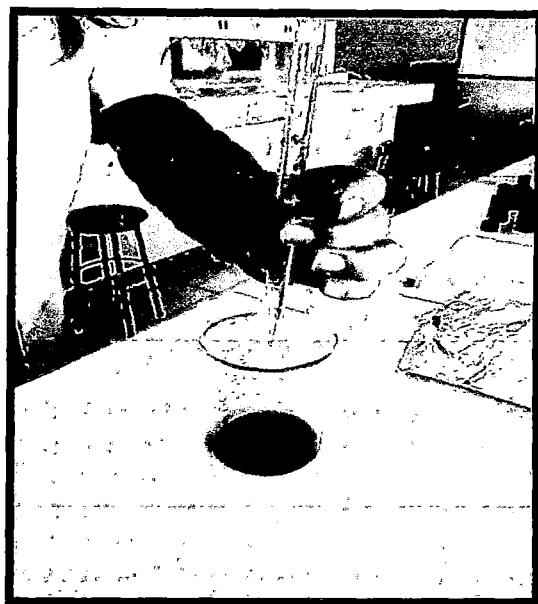


Cocentraciones del extracto etanólico

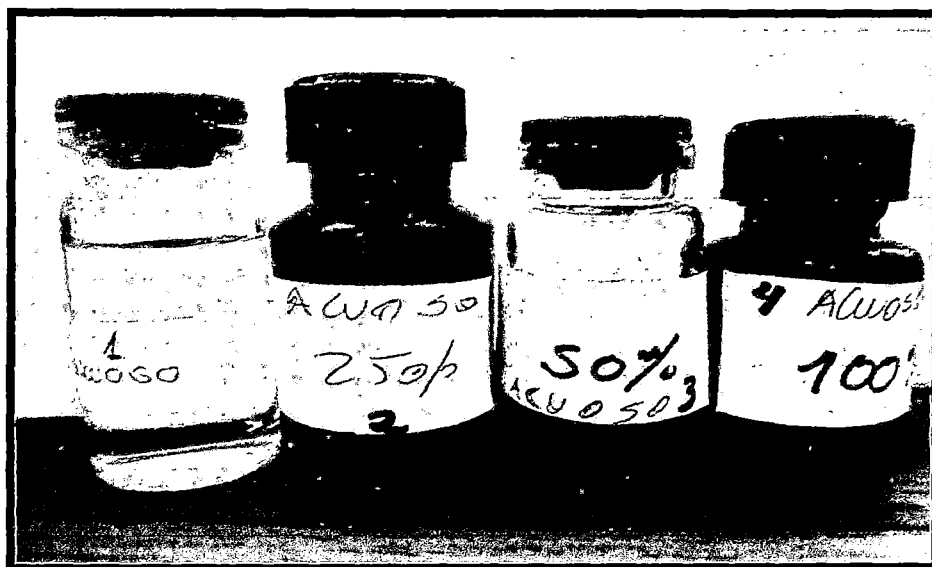
ANEXO N°11: PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DEL EXTRACTO ACUOSO



Pesado del extracto acuoso



Dilución de extracto acuoso

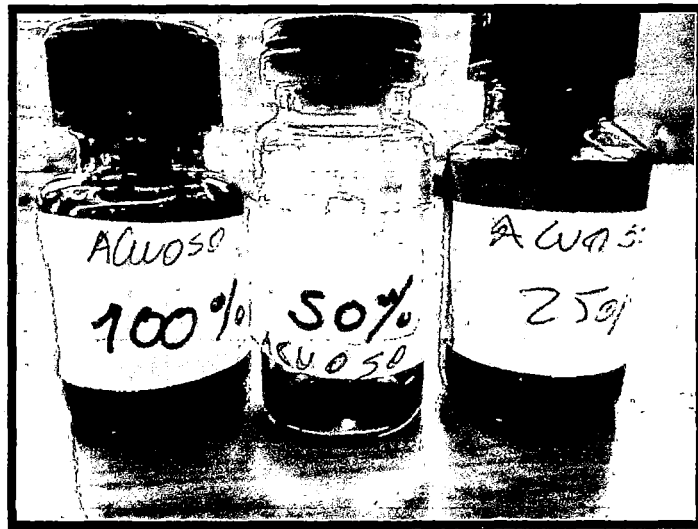


Concentraciones del extracto acuoso y su respectivo blanco

ANEXO Nº12: CONCENTRACIONES DE LOS EXTRACTOS

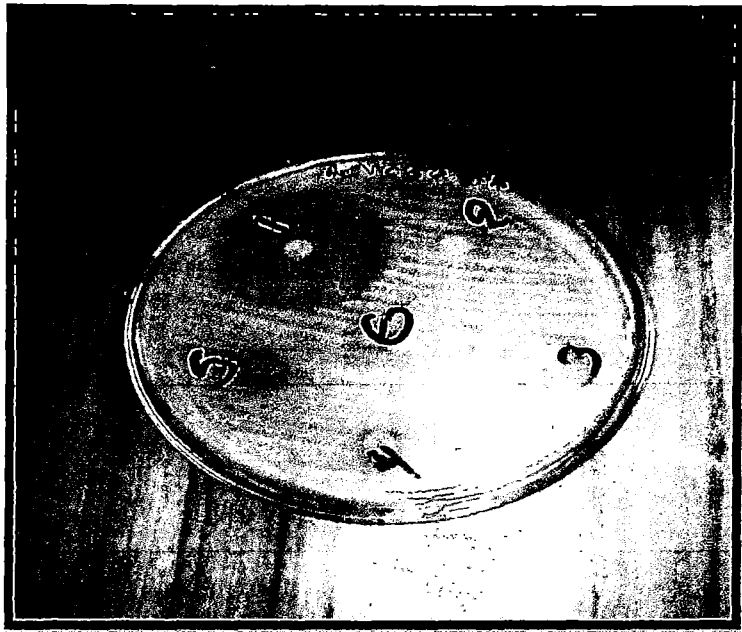


Extracto etanólico: 100, 50 y 25%



Extracto acuoso: 100, 50 y 25%

ANEXO Nº13: MÉTODO DE DIFUSIÓN EN DISCO

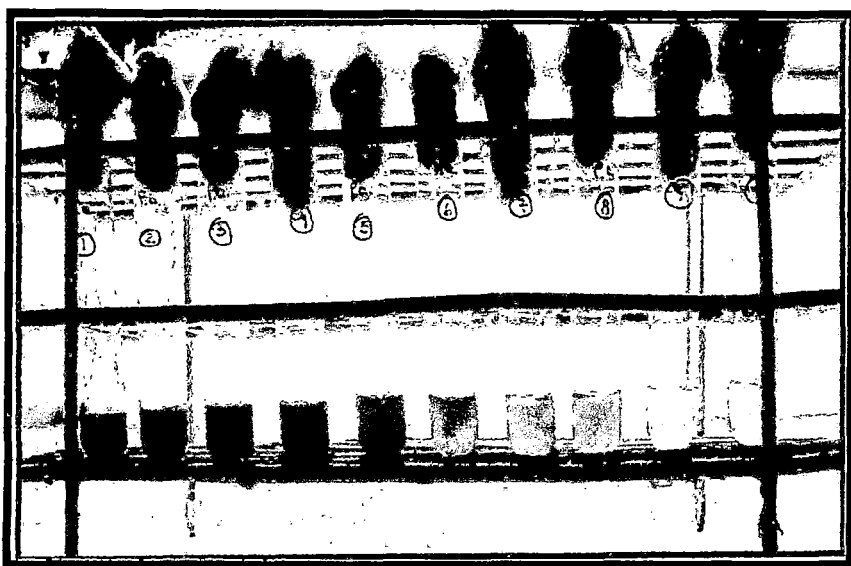


Actividad antibacteriana del extracto acuoso de *Thimus* sp. L. Frente A *Staphylococcus aureus*.

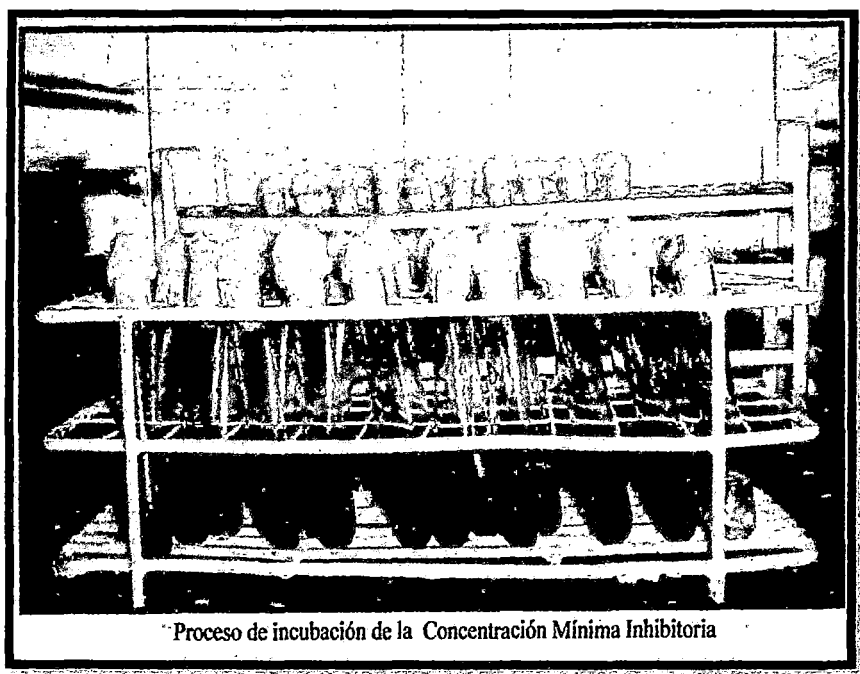


Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Thimus* sp. L. Frente A *Staphylococcus aureus*

ANEXO Nº 14: CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)



Determinación de CMI del extracto acuoso



Determinación de CMI del extracto etanólico

ANEXO N°15: CERTIFICADO BOTÁNICO

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

El Biólogo que suscribe certifica que la muestra VEGETAL, traída por las señoritas; Carbajal González, Lilia Magaly con DNI N° 45545897 y Rey Sánchez Ochoa, Anais Marianella con DNI N° 44264521 pertenece a la especie conocida con el nombre técnico de *Thymus* sp L "tomillo" según clasificación sistemática de Arthur Cronquist 1993. Por tanto se extiende la presente certificación a pedido de las interesadas.

Reino: Plantae

División: Magnoliophytas

Clase: Magnoliopsidas

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Thymus*

Especie: *Thymus* sp L

N.V: "tomillo"

Ica, 16 de Julio del 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA" ICA
FACULTAD DE CIENCIAS

Mg. Bto. David M. Miranda Juan
GBP: 3641

“Año de la Inversión para el Desarrollo Rural y la Seguridad Alimentaria”

“Año de la Promoción de la Industria Responsable y del Compromiso Climático”

UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA DE ICA

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

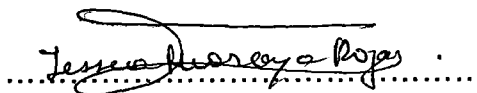
CONSTANCIA

Quien Suscribe, **Mg. Jessica Yolanda Huarcaya Rojas**, asesora del Proyecto de Tesis titulado: **“Actividad antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de *Thymus sp L.* (Tomillo) contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*”**, dejo constancia que:

Las Bachilleres: Carbajal Gonzalez Lilia Magaly y Rey Sánchez Ochoa Anais Marianella, han culminado el desarrollo de la tesis, bajo mi asesoramiento quedando apto para ser presentado y evaluado.

Ica, 16 de Diciembre del 2013 .

Atentamente,



Mg. Jessica Y. Huarcaya Rojas.

Asesora