

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

“EFICACIA ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL EXTRACTO DE  
MASTUERZO (*Tropaeolum majus*) Y TOMILLO (*Thymus vulgaris*) SOBRE CEPA  
CERTIFICADA DE *Staphylococcus aureus*”

“Documento Final del Proyecto de Investigación como requisito para obtener el  
grado de Médico Veterinario Zootecnista”

**AUTOR: JUAN CARLOS MIRA NARANJO**

**TUTOR: DRA. MAYRA MONTERO**

**CEVALLOS– ECUADOR**

**2017**

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

“El suscrito, JUAN CARLOS MIRA NARANJO, portador de cédula identidad número: 060314223-3 libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “EFICACIA ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL EXTRACTO DE MASTUERZO (*Tropaeolum majus*) Y TOMILLO (*Thymus vulgaris*) SOBRE CEPA CERTIFICADA DE *Staphylococcus aureus*” es original, autentico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas”.

.....  
JUAN CARLOS MIRA NARANJO

C.I. 0603142233

## DERECHOS DE AUTOR

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “EFICACIA ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL EXTRACTO DE MASTUERZO (*Tropaeolum majus*) Y TOMILLO (*Thymus vulgaris*) SOBRE CEPA CERTIFICADA DE *Staphylococcus aureus*” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él”.

.....  
JUAN CARLOS MIRA NARANJO

C.I. 0603142233

“EFICACIA ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL EXTRACTO DE  
MASTUERZO (*Tropaeolum majus*) Y TOMILLO (*Thymus vulgaris*) SOBRE CEPA  
CERTIFICADA DE *Staphylococcus aureus*”

**REVISADO POR:**

.....

**Dra. Mg. Mayra Montero**

**TUTOR**

.....

**Ing. Mg. Eduardo Cruz**

**ASESOR DE REDACCIÓN TÉCNICA**

.....

**Ing. Pilar Pazmiño**

**ASESOR DE BIOMETRÍA**

**APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:**

**FECHA**

.....

.....

Dr. Mg. Pedro Díaz.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

.....

.....

**Dr. Mg. Roberto Almeida**

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN .....	ix
SUMMARY.....	x
CAPITULO I .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO II.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO.....	3
2.1.    ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS .....	3
2.2.    CATEGORÍA FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL .....	11
2.2.1  EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES .....	11
_a)  MASTUERZO ( <i>Tropaeolum majus</i> ) .....	11
_b)  TOMILLO ( <i>Thymus vulgaris</i> ).....	13
2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
2.2.3  MEDIOS DE CULTIVO .....	19
2.2.4  MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD .....	20
CAPITULO III .....	22
3.1    HIPÓTESIS .....	22
3.2    OBJETIVOS.....	22
CAPÍTULO IV.....	23
MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
4.1    UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO .....	23
4.2    CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR .....	23
4.3    EQUIPOS Y MATERIALES .....	24
4.4    FACTORES DE ESTUDIO .....	25
4.5    TRATAMIENTOS .....	26
4.6    DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
4.7    MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN .....	27
4.7.1  Obtención del material biológico. ....	27
4.7.2  Obtención de los extractos .....	27
4.7.3  Elaboración de las concentraciones de extracto acuoso de mastuerzo .....	27
4.7.4  Elaboración de las concentraciones de aceite esencial de tomillo ...	28
4.7.5  Elaboración de los medios de cultivo .....	28

4.7.6	Activación de la cepa .....	29
4.8	VARIABLES RESPUESTA.....	29
4.8.1	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas bacterianas mediante el método de microdilución en caldo.....	29
4.8.2	Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)..	30
4.8.3	Prueba de difusión por disco. ....	31
4.9	PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.....	31
<b>CAPÍTULO V .....</b>		<b>32</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>		<b>32</b>
5.1	RESULTADOS.....	32
5.2	DISCUSIÓN .....	34
<b>CAPITULO VI.....</b>		<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS .....</b>		<b>37</b>
6.1	CONCLUSIONES.....	37
6.2	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38
6.3	ANEXOS.....	43
<b>CAPÍTULO VII .....</b>		<b>48</b>
<b>PROPUESTA .....</b>		<b>48</b>
7.1	DATOS INFORMATIVOS .....	48
7.2	ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA .....	48
7.3	JUSTIFICACIÓN .....	48
7.4	OBJETIVOS .....	49
7.5	ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD.....	49
7.6	FUNDAMENTACIÓN.....	49
7.7	METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO .....	49
7.8	ADMINISTRACIÓN .....	50
7.9	PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN .....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> CONDICIONES METEOROLÓGICAS .....	23
<b>TABLA 2.</b> TRATAMIENTOS .....	26
<b>TABLA 3.</b> CONCENTRACIONES Y DILUCIONES DE AGUA DESTILADA Y EXTRACTO ACUOSO DE MASTUERZO ( <i>Tropaeolum majus</i> ) .....	28
<b>TABLA 4.</b> CONCENTRACIONES Y DILUCIONES DE AGUA DESTILADA Y ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO ( <i>Thymus vulgaris</i> ) .....	28
<b>TABLA 5.</b> DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL EXTRACTO ACUOSO DE MASTUERZO ( <i>Tropaeolum majus</i> ) Y DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO ( <i>Thymus vulgaris</i> ) .....	32
<b>TABLA 6.</b> DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DEL EXTRACTO ACUOSO DE MASTUERZO ( <i>Tropaeolum majus</i> ) Y DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO ( <i>Thymus vulgaris</i> ).....	33
<b>TABLA 7.</b> HALOS DE SENSIBILIDAD (MM) DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO ( <i>Thymus vulgaris</i> ) .....	34

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS POR EL MÉTODO DE DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR EN EQUIPO CLEVANGER</b> .....	43
<b>ANEXO 2. CONCENTRACIONES DEL ACEITE DE <i>Thymus vulgaris</i></b> .....	43
<b>ANEXO 3. CEPA CERTIFICADA DE <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	44
<b>ANEXO 4. SIEMBRA DE LA CEPA ACTIVADA DE <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	44
<b>ANEXO 5. AJUSTE DEL INOCULO AL TUBO N° 5 DE LA ESCALA MC FARLAND</b> .....	45
<b>ANEXO 6. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA AL 1 % DEL ACEITE DE TOMILLO</b> .....	45
<b>ANEXO 7. HALOS DE SENSIBILIDAD AL 1% DE ACEITE DE TOMILLO</b> .....	46
<b>ANEXO 8. HALOS DE SENSIBILIDAD AL 5 % DE ACEITE DE TOMILLO</b> .....	46
<b>ANEXO 9. HALOS DE SENSIBILIDAD AL 10 % DE ACEITE DE TOMILLO</b> .....	46
<b>ANEXO 10. PRUEBA DE HALOS DE SENSIBILIDAD EN EXTRACTO DE MASTUERZO</b> .....	47
<b>ANEXO 11. DIÁMETRO DE HALOS DE INHIBICIÓN <i>Staphylococcus aureus</i> (mm) USANDO ACEITE DE TOMILLO</b> .....	47
<b>ANEXO 12. ANÁLISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN <i>Staphylococcus aureus</i> USANDO ACEITE DE TOMILLO</b> .....	47
<b>ANEXO 13. PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA LA VARIABLE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA EN <i>Staphylococcus aureus</i> USANDO ACEITE DE TOMILLO</b> .....	47

## RESUMEN

El trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar in vitro la eficacia antimicrobiana del extracto de mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre *Staphylococcus aureus*. Se evaluaron concentraciones al 1%, 5%, 10%, 30%, 50%, 70% y 90% en dilución en etanol al 96,8%. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria mediante el método de microdilución en caldo, el inóculo bacteriano se estandarizó al 0.5 de la escala de MacFarland en espectrofotómetro, teniendo como resultado que el tubo al 1% de aceite de tomillo no presentó turbidez, el cual al ser sembrado en agar Mueller-Hinton determinó la Concentración Bactericida Mínima en la que no se observó crecimiento de colonias; por otro lado el extracto de mastuerzo evidenció turbidez en todas sus diluciones por lo que no cuenta con actividad antimicrobiana. La aplicación del análisis de varianza dio como resultado que los tratamientos al 5% y 10% no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) con valores de 15.35 mm y 15.9 mm, en comparación al 1% que fue de 12.2 mm de halos de inhibición. Mientras que, en el caso del extracto de mastuerzo no hubo formación de halos sobre la cepa *Staphylococcus aureus*.

**Palabras claves:** Concentración Mínima Bactericida, Concentración Mínima Inhibitoria, MacFarland

## SUMMARY

The objective of this research was to evaluate in vitro the antimicrobial efficacy of the extract of nasturtium (*Tropaeolum majus*) and thyme (*Thymus vulgaris*) on *Staphylococcus aureus*. Concentrations were evaluated at 1%, 5%, 10%, 30%, 50%, 70% and 90% dilution in 96.8% ethanol. The Minimum Inhibitory Concentration was determined by the microdilution method in broth, the bacterial inoculum was standardized at 0.5 of the MacFarland scale in spectrophotometer, with the result that the tube at 1% of thyme oil did not show turbidity, which when seeded on Mueller-Hinton agar determined the Minimum Bactericidal Concentration in which no growth of colonies was observed; On the other hand the extract of nasturtium evidenced turbidity in all its dilutions reason why it does not count with antimicrobial activity. The application of the analysis of variance resulted in that the treatments at 5% and 10% were not significantly different ( $p = <0.05$ ) with values of 15.35 mm and 15.9 mm, compared to 1% that was 12.2 mm Halos of inhibition. In the case of the nasturtium extract, no halos were formed on the strain *Staphylococcus aureus*.

**Key words:** Minimum Bactericidal Concentration, Minimum Inhibitory Concentration, MacFarland

# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional es usada en todo el mundo, representando un complemento esencial en la práctica médica correspondiente a la cultura de cada pueblo, los cambios acelerados de las sociedades actuales y la medicina moderna han promovido la falta de interés por preservar este tipo de terapéutica. La Organización mundial de la salud (OMS) la define como la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, bien sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales (Gualavisí, 2008; OMS, 2013).

Hoy en día los medicamentos que se encuentran disponibles en el mercado, presentan cierto grado de toxicidad para el organismo, además el uso indebido de antibióticos produce resistencia tanto en el ser humano como en los animales, convirtiéndose en una gran amenaza para la salud mundial y seguridad alimentaria; los seres vivos se encuentran en constante evolución y lucha por la supervivencia, incluyendo a los patógenos bacterianos y sus hospedadores, fruto de esta batalla da lugar a la resistencia bacteriana. Por dicha razón es indispensable indagar en nuevos agentes terapéuticos que cuenten con seguridad y efectividad (Holden et al., 2004; O'Connell, 2006).

Los productos fitoterapéuticos suelen tener márgenes de seguridad amplios y casi no presentan efectos adversos en comparación con los fármacos sintéticos, son usados con frecuencia contra patologías menores o prácticas profilácticas. La mayoría de las plantas usadas por la industria farmacéutica provienen de países en desarrollo. El Ecuador es un país megadiverso con mayor número de especies de plantas por unidad de área en América del Sur. Muchas de estas plantas cuentan con propiedades medicinales, siendo usadas principalmente por los pueblos del sector rural (Bravo, 2013; Brondani et al., 2016; de Souza Prestes et al., 2008).

Tomando en consideración las prácticas médicas del pasado y que actualmente requieren un estudio tenemos especies vegetales como el mastuerzo (*Tropaeolum majus*), que por su gran adaptabilidad y rusticidad crece en muchas partes del mundo, es distinguida por sus propiedades medicinales, ha sido usada como antiséptico, diurético, purgante, antiinflamatorio, antiespasmódico, expectorante. Por otra parte, su aplicación externa se emplea en tratamientos de la piel en dermatitis, quemaduras y descamación. Del mismo modo, el tomillo (*Thymus vulgaris*) que por siglos ha sido usado como una especia, cuenta con grandes virtudes terapéuticas, relacionadas con su alto contenido en timol y carvacrol, compuestos que le confieren la acción antiséptica. También tiene propiedades antiespasmódica, expectorante, antioxidante y fungicida (Folcarà & Vanaclocha, 2000).

Los grupos bacterianos como los estafilococos se caracterizan por ser microorganismos oportunistas que tienen la capacidad de infectar, persistir y replicarse en cualquier tejido. Las cepas de *Staphylococcus aureus*, se encuentran colonizando constantemente la piel por lo que están expuestas a todas las terapias con antibióticos. Esto obliga a buscar otras opciones para el tratamiento de infecciones estafilococales, siendo las plantas una gran alternativa por su contenido de fitoquímicos y a su poco o nulo efecto tóxico (García, 2006).

La presente investigación se realizó con propósito de comparar la eficacia antimicrobiana in vitro del extracto de mastuerzo y el extracto de tomillo aplicado a la cepa de *Staphylococcus aureus*

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

#### 2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Zanetti, Manfron, Hoelzel, Pagliarin, & Morel (2003) al estudiar la toxicidad aguda y antibacteriana de dos extractos de mastuerzo (*Tropaeolum majus*) mediante extractos acuosos y etanólicos preparados por maceración en frío durante 14 días usando 578 g de la droga en polvo, las soluciones obtenidas fueron filtradas y evaporadas, obteniendo 17,07% de extracto acuoso y 12,09% de extracto etanólico. La evaluación del efecto antibacteriano se realizó por el método de bioautografía en bacterias gram negativas y gram positivas, demostraron que, el extracto etanólico de mastuerzo presentó actividad antimicrobiana para los microorganismos: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella Setubal*.

Bazylo et al. (2013) al comparar los efectos antioxidante, antiinflamatorio, actividad antimicrobiana y composición química entre extractos acuoso e hidroetanólico de mastuerzo (*Tropaeolum majus*). La actividad antimicrobiana fue probada contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bordetella bronchiseptica*, concluyeron que la actividad microbiana está en relación con el contenido de isotiacinato de bencilo en los extractos.

Acosta (2006) abordó la exploración de la actividad antimicrobiana de caléndula (*Caléndula officinalis*) y mastuerzo (*Tropaeolum majus*), dos plantas silvestres utilizadas en la industria cosmética y alimenticia por su potencial antimicrobiano, obteniendo extractos a partir de ellas, aplicando tres variables de extracción: por solventes, temperaturas y concentraciones. Los extractos fueron aplicados mediante el método de difusión por disco contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y

*Saccharomyces cerevisiae*, detectado la posible presencia de fitoantimicrobianos. Los resultados obtenidos fueron: que el extracto más efectivo contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* fue de caléndula (*Caléndula officinalis*), formando halos de inhibición de 13 mm de diámetro, mientras que el extracto más eficaz contra *Saccharomyces cerevisiae* fue el *Tropaeolum majus* con 13.17 mm de diámetro de inhibición.

Bastidas, Llacua, & Lousset (2016) evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de las flores de la especie vegetal mastuerzo (*Tompaeolum majus*) frente al crecimiento del microorganismo *Penicillium sp.* Estudiaron la cantidad de fenoles totales presente en el extracto, a través de la prueba de Folin ciocalteau, determinaron la actividad antimicrobiana con el método de Kirby Bauer, además la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de flores frente a *Penicillium sp* formando halos de 8 a 15 mm. Concluyendo que el extracto metanólico de flor roja de mastuerzo mostró un mayor diámetro de inhibición a una concentración del 100 %, además se comparó la concentración mínima inhibitoria de los extractos, teniendo como resultado que la CMI del mastuerzo de flores rojas es de 60%, y del mastuerzo de flores amarillas y anaranjadas es de 70%.

Fahimi, Hajimehdipoor, Shabanpoor, Bagheri, & Shekarchi (2014) realizaron una investigación para determinar la actividad antibacteriana sinérgica de aceites esenciales de Lamiaceae. Los aceites se obtuvieron de partes de Tomillo (*Thymus vulgaris*), Espliego (*Lavandula angustifolia*), Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Toronjil (*Mentha piperita*), las bacterias utilizadas fueron: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Determinaron que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* fue eficaz contra todas las bacterias examinadas excepto *Pseudomonas aeruginosa*, la actividad antibacteriana del tomillo se debe a la presencia de compuestos fenólicos como: carvacrol, timol,  $\gamma$ -terpineno y el p-cimeno. La actividad máxima de los aceites esenciales probados se obtuvo a partir de la combinación de aceites esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*), Espliego (*Lavandula angustifolia*) y Toronjil (*Mentha piperita*) contra *Staphylococcus aureus*.

García (2006) al estudiar la “Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple”, valorando la actividad antimicrobiana in vitro de ocho extractos vegetales y dos aceites esenciales en contra de *Staphylococcus aureus*. Los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos evaluados fueron: perejil (*Petroselinum sativum*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*), y gobernadora (*Larrea tridentata*); y los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y de orégano (*Lippia graveolens*), determinando las concentraciones mínimas inhibitorias mediante el método de macrodilución. En las pruebas de actividad antibacteriana, los resultados determinaron que no existió diferencia entre las concentraciones mínimas inhibitorias que fue de 2.77 mg mL<sup>-1</sup> de los extractos vegetales alcohólicos y los hidroalcohólicos en todas las cepas, mientras que los aceites esenciales inhibieron el crecimiento bacteriano a concentraciones mínimas inhibitorias variables e inferiores a las de los extractos alcohólicos. Los resultados mostraron que los componentes químicos más abundantes en los extractos fueron el etil ester ácido hexadecanoico, fitol, cariofilenos, timol y para-cimeno.

Zeghad & Merghem (2013) evaluaron la actividad antioxidante y antibacteriana del Tomillo (*Thymus vulgaris*). En este trabajo la actividad antimicrobiana de compuestos flavonoides aislados fue determinada por el método de discos de difusión en agar Mueller-Hinton, usando cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados de los diámetros de las zonas de inhibición revelaron sensibilidad de *Escherichia coli* a los flavonoides aislados, mostrando diámetro de inhibición de 8-18 mm, mientras que en el caso de *Staphylococcus aureus* fue de 10-15 mm. Se presume que los flavonoides que carecen de grupos hidroxilo tienen mayor actividad antibacteriana, lo que conduce a un aumento de la afinidad química por los lípidos de la membrana celular haciéndola más permeable.

Sadiki et al. (2014) estudiaron el efecto antibacteriano sinérgico de los aceites esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Arrayán (*Myrtus communis*) por índice de concentración inhibitoria fraccional. Se usaron dos referencias bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, Concluyendo que *Thymus vulgaris* fue más eficaz en comparación con *Myrtus communis* contra las cepas bacterianas estudiadas.

Además, todas las aplicaciones de combinación entre los aceites esenciales de *Myrtus communis* y *Thymus vulgaris* mostraron un efecto antibacteriano sinérgico parcial. Sólo una combinación contra *Staphylococcus aureus* (1/8 MIC arrayan +1/4 MIC de tomillo) y dos combinaciones contra *Escherichia coli* (1/4 MIC arrayan + 1/8 MIC tomillo y 1/8 MIC arrayan +1/4 MIC tomillo), estos hallazgos sugieren que la mezcla de estos aceites esenciales a concentraciones adecuadamente bajas podría ser una alternativa prometedora para reemplazar a los agentes antimicrobianos sintéticos y conducir a nuevas investigaciones sobre productos naturales para mejorar sus propiedades antibacterianas.

Nuñez, Moro, & D'Aquino (2007) estudiaron “Enterotoxinas y enzimas estafilococcicas en presencia de aceites esenciales” se investigó el efecto de concentraciones subinhibitorias de Clavo (*Eugenia Caryophyllata*), Canela (*Cinnamomum zeylanicum*), y Tomillo (*Thymus vulgaris*) en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y en la producción de coagulasa, termonucleasa y enterotoxina. Se agregaron diferentes concentraciones de los aceites esenciales a Caldo Cerebro Corazón. La producción de enterotoxina en presencia y en ausencia de los aceites esenciales se determinó por la técnica de enzimoimmunoensayo (ELISA). Los resultados indicaron que bajas concentraciones no afectan el crecimiento, reducen la producción de las enzimas ensayadas y de enterotoxina El aceite esencial de tomillo es el que presenta mayor actividad pues al 0,04% produce la pérdida de la actividad de ambas enzimas y de la enterotoxicidad después de 24 horas de incubación.

García et al. (2009) evaluaron la susceptibilidad in vitro de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a diferentes extractos vegetales y aceites esenciales. Se evaluaron extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de: perejil (*Petroselinum savitum*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y gobernadora (*Larrea tridentata*) ; y los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y orégano (*Lippia graveolens*), determinando las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) mediante el método de macrodilución. Los resultados mostraron que no existió diferencia en las CMI que fue de 2.77 mg mL en los extractos vegetales, tanto alcohólicos como hidroalcohólicos en las dos cepas, mientras que los aceites esenciales inhibieron el crecimiento bacteriano

a CMI inferiores a las de los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de clavo fue de 1.38 mg mL y orégano de 0.17 mg mL para la cepa hospitalaria, y clavo se determinó 0.34 mg mL y orégano 0.17 mg mL para la cepa de referencia.

Rosas & López (2011) realizaron una revisión donde explican la importancia de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en los alimentos, principalmente de tomillo, como posible fuente de compuestos antimicrobianos naturales. Concluyendo que la cantidad de aceite necesaria para ejercer la actividad antimicrobiana es la mayoría del tiempo, mayor que la cantidad normalmente usada como saborizante y se asocia con efectos adversos sensoriales. También se debería usar sinérgicamente con otros aceites para aprovechar sus compuestos como timol y carvacrol, disminuyendo así su concentración evitando los efectos adversos, y recomiendan asociarlo a técnicas de conservación como disminución del pH.

En la investigación sobre el efecto inhibitorio del crecimiento de *Clostridium perfringens*, frente a extractos obtenidos con diferentes solventes de los bulbos de *Allium sativum* (ajo); de las hojas y tallos de *Coriandrum sativum* (cilantro), *Eugenia Caryophyllata* (clavo de olor), *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Thymus vulgaris* (tomillo). Se utilizó el método de difusión en medio semisólido en agar perfringens OPSP Base, 20 ml del medio se mezclaron con 1 ml del inóculo de *C. perfringens* ajustado a una concentración de  $10^8$  UFC/ml determinado por la escala de McFarland, se hicieron pozos de 5 mm de diámetro y 5 mm de profundidad, en los cuales se colocaron 50 µl de los extractos disueltos en hexano o aceite de canola y usando vancomicina como control positivo. Se incubó bajo condiciones de anaerobiosis a 37°C por 18 a 24 horas; se observó la presencia de halos de inhibición y se midió el diámetro de los mismos. Los resultados demuestran que *O. vulgare* y *T. vulgaris* no presentaron inhibición para este microorganismo; todos demás extractos presentaron inhibición de 7,2 y 13,3% de diámetro en comparación con la vancomicina. (Ardila, Vargas, Pérez, & Mejía, 2009)

De Souza Prestes et al. (2008) Realizaron un estudio para determinar la actividad de extractos de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) frente a microorganismos asociados con otitis externa. La evaluación de los extractos fue

realizada a través de microdiluciones en caldo frente a aislados de *Malassezia pachydermatis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, se evaluaron 3 extractos un aceite, una tintura y una decocción. Los aceites presentaron concentración inhibitoria mínima menor frente a los microorganismos, pero los extractos que presentaron mejor rendimiento fueron las tinturas. Concluyeron que los 2 tipos de extractos pueden ser una alternativa para el tratamiento de la otitis externa de los perros.

Herrera & García (2006) En la Universidad de Pamplona evaluaron el efecto bactericida de extractos acuosos de canela (*Cinnamomum verum*), clavo (*Syzygium aromaticum*), laurel (*Laurus nobilis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*), sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Como resultado el extracto de canela mostró gran espectro de acción sobre las bacterias usadas. Los demás extractos, demostraron acción inhibitoria contra algunas de las cepas bacterianas. El extracto de tomillo presentó un notorio efecto inhibidor frente a *Salmonella spp.*, demostró un escaso poder inhibitorio frente a las otras cepas ensayadas. Esto puede ser debido a que al parecer, el efecto de este extracto es mucho mejor cuando las condiciones son anaeróbicas.

Dorman & Deans (2000) evaluaron la actividad antimicrobiana de los aceites vegetales volátiles de: pimienta (*Piper nigrum*), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), geranio (*Pelargonium graveolens*), nuez moscada (*Myristica fragrans*), orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) que fueron usados sobre 25 géneros bacterianos diferentes incluyendo patógenos de animales y plantas de intoxicación alimentaria y bacterias de deterioro. Los aceites volátiles mostraron efectos inhibidores considerables contra todos los organismos, sin embargo, los aceites volátiles de geranio (*Pelargonium graveolens*), y tomillo (*Thymus vulgaris*) ejercieron una mayor actividad inhibidora contra organismos Gram-positivos.

Acosta, Castro, Roque, & Felix (2000) evaluaron el aceite esencial extraído de las hojas y flores de Tomillo (*Thymus vulgaris*) por arrastre de vapor, el cual fue sometido

a análisis físico-químico y composición química por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas GC/MS, determinándose compuestos hidrocarbonados. Asimismo, se determinó la actividad antimicrobiana frente a cepas de: *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β hemolítico*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella flexnery*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*. Se demostrando que el aceite en diluciones 1:10 y 1:20 muestra actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β hemolítico*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella flexnery*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*

Abu-shanab (2004) investigó las actividades antibacterianas de extractos vegetales utilizados en la medicina popular en Palestina, usaron extractos de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), salvia (*Salvia officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y canela china (*Chinese cinnamon*) en cuatro especies bacterianas por difusión de disco y micro dilución. Los patrones de inhibición variaron de acuerdo al solvente usado y bacteria. El *Staphylococcus aureus* resistente a metilciclina y *Bacillus subtilis* fueron los que demostraron mayor inhibición. La combinación de salvia con romero y romero con tomillo, tuvieron mayor efecto que actuando individualmente.

Khedid et al. (2009) Investigaron la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo *Thymis vulgaris* del este de Marruecos. El aceite fue obtenido mediante hidrodestilación, la actividad antibacteriana fue evaluada contra Gram negativos y Gram positivos, las cepas usadas fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus sp.*, *Pantoa sp.* y *Escherichia coli*, mostrando gran actividad frente a Gram negativos, la actividad biológica del aceite esencial depende de la composición química de la planta la cual es determinada por genotipo y la influencia del medio ambiente y las condiciones agronómicas.

Sartoratto et al. (2004) obtuvieron aceites esenciales a partir de partes aéreas de Toronjil (*Mentha piperita*), Menta (*Mentha spicata*), Tomillo (*Thymus vulgaris*), Orégano (*Origanum vulgare*), Cedrón (*Aloysia triphylla*), Albahaca de clavo (*Ocimum gratissimum*), Albahaca (*Ocimum basilicum*) mediante destilación por arrastre de vapor utilizando un sistema de tipo Clevenger. Estos aceites se aplicaron para medir la actividad antibacteriana y anti-*Candida albicans* usando el método bioautográfico. Posteriormente, se determinó la concentración mínima inhibitoria de los aceites por el método de microdilución. La mayoría de los aceites esenciales estudiados fueron eficaces contra *Enterococcus faecium* y *Salmonella choleraesuis*. *Aloysia triphylla* y *Origanum basilicum* presentaron una inhibición moderada contra *Staphylococcus aureus*, mientras que sólo *Aloysia triphylla* y *Mentha piperita* fueron capaces de controlar la levadura *Candida albicans*.

Al-Bayati (2008) evaluó los aceites esenciales y los extractos de metanol obtenidos de las partes aéreas de las semillas de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Anís (*Pimpinella anisum*) para sus actividades antibacterianas individuales y combinadas contra: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus Vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los aceites esenciales y los extractos de metanol revelaron actividades antibacterianas prometedoras contra la mayoría de los patógenos usando el método de microdilución de caldo. Se observó actividad máxima de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Pimpinella anisum* y extractos de metanol (MIC 15.6 y 62.5 µg / ml) contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Proteus vulgaris*. Las combinaciones de aceites esenciales y extractos de metanol mostraron una acción aditiva contra la mayoría de los patógenos probados, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*.

Coy & Acosta (1996) estudiaron la actividad antibacteriana y composición química de los aceites esenciales de Romero (*Rosmarinus officinalis*), Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Cúrcuma (*Curcuma longa*), observaron resultados de inhibición comparables con la ampicilina; de los tres aceites evaluados frente a la cepa de *Staphylococcus aureus*, se pueden observar porcentajes de inhibición de 60 % para el

caso del aceite de romero y 70 % en los aceites de tomillo y cúrcuma, respectivamente. Los aceites evaluados no presentaron porcentajes de inhibición representativos frente a las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella tiphy*.

## **2.2.CATEGORÍA FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL**

### **2.2.1 EXTRACTOS Y ACEITES ESENCIALES**

Kalemba & Kunicka (2003) definen a los aceites esenciales y extractos vegetales como complejos metabolitos secundarios que son aislados de las plantas por diferentes métodos como: infusiones, tinturas, expresión de los frutos, por medio de soxhlet o por arrastre de vapor. Los compuestos químicos obtenidos son los responsables de la fragancia y propiedades biológicas de las plantas. Los aceites esenciales y extractos vegetales cubren un amplio margen de efectos farmacológicos mostrando variedad de propiedades como antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerígenas; también actúan contra una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos virus, protozoarios, insectos y plantas.

#### **a) MASTUERZO (*Tropaeolum majus*)**

- **Nombres populares**

Cachaco de muladar (Colombia); marañuela (Cuba); mastranto de indias, espuela de galán, llagas de Cristo (España); capuchina (Brasil); cress nasturtium (en inglés)

- **Descripción botánica**

El mastuerzo es una planta herbácea anual casi trepadora, decumbente y subcarnosa, de 0,50-1 m de altura. De los tallos crecen peciolo delgados, lisos y carnosos; de un color rojizo en la base y verde hacia la hoja. Tiene hojas alternas redondas, de 4-10 cm de diámetro; peciolo largos, enrollados en espiral. Flores amarillas o anaranjadas con pedúnculos mayores que las hojas, cáliz campanulado, amarillento, de 1,2 - 1,7 cm de largo, espolón de 2-3 cm de longitud. Los frutos están formados por tres drupas

separables de 1-1,5 cm de diámetro, cuyas semillas tienen un aspecto rugoso. Pertenece a la familia de las tropaeolaceae tiene un solo género y abarca 95 especies de plantas entre tuberosas y perennes, esta familia es cultivada de forma ornamental pero generalmente crece de forma silvestre como maleza. Su importancia radica en sus bondades medicinales para combatir múltiples dolencias, ya sea oral o de uso externo, mediante infusiones, diluciones, macerados o extractos (Cabezas, 2014; Restrepo, Quintero, Fraume, & Palomino, 2005).

- **Clasificación Taxonómica del Mastuerzo**

Según Cabezas (2014), la clasificación taxonómica del mastuerzo es la siguiente:

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Geraniales

Familia: Tropaeolaceae

Género: Tropaeolum

Especie: Majus

- **Habitad**

Es nativa de la región Andina de Sudamérica, más precisamente de Perú, actualmente se encuentra distribuida por todo el mundo, puede resultar invasiva, compitiendo con la flora propia del área (Restrepo et al., 2005).

- **Usos terapéuticos**

El mastuerzo es una planta usada para el tratamiento de diversas dolencias como problemas cardiovasculares, infecciones del tracto urinario, asma y constipación. Tienen acción antibacteriana principalmente contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bordetella bronchiseptica*; antioxidante especialmente en sus flores, antiescorbútica, antiséptica

a nivel urinario y respiratorio. La mejor manera de utilizarla es como tintura. En los últimos años también ha sido utilizado como antidepresivo, antihipertensivo y en afecciones de la piel como eczema, descamación, hongos (Brondani et al., 2016; Lourenço, 2011; Santos, Aparecida, Felgueira, & Broetto, 2016; Zeller & Schneeberger, 1982).

- **Composición Química**

Estudios fotoquímicos del mastuerzo aportan la presencia de: Flavonoides (isoquercitrina, quercetina, luteína, astragalina y kaempferol). Ácidos grasos (ácido erúcico, ácido oleico y linoléico). Ácidos esenciales con heterósidos sulfurados: glucotropéolósido, que liberan isotiocianato de bencilo cuya actividad antimicrobiana ha sido ampliamente documentada. Glucosinolatos (benzilglicosinolatos), poseen actividad inhibitoria in vitro sobre algunas células tumorales humanas. Triterpenos tetracíclicos previamente aisladas de sus hojas. Las hojas contienen ácido ascórbico e isoquercitrósido. Las flores contienen helenina, mirosina. Además posee pigmentos: la sorbusina y carotenoides, resinas, pectinas (Bazytko et al., 2013; Brondani et al., 2016; Cabezas, 2014; Lourenço, 2011)

- **Mecanismo de acción**

Isiocianato de benzilo: su efecto antimicrobiano consiste en la disrupción de la membrana celular por inhibición de enzimas esenciales. (Cabezas, 2014)

Taninos tras una hidrólisis ácida liberan una antocianidina. Químicamente se trata de polímeros de flavanoles su función antimicrobiana se debe básicamente a que se priva del medio idóneo a los microorganismos evitando así su desarrollo y multiplicación. (Acosta, 2006)

**b) TOMILLO (Thymus vulgaris)**

Es una planta subarborescente cultivada como hierba aromática y medicinal. Originaria de Europa Mediterránea, en la antigüedad era utilizada por guerreros como infusión energizante y antiséptico para las heridas. Los egipcios la empleaban como sustancia

aplicada para momificaciones, mientras que los griegos la usaban en rituales debido a su intenso aroma (Estrada, 2010; Panchi, 2016).

- **Nombres populares**

Farigola, estremoncillo, tomello, tremoncillo, tomillo.

- **Descripción botánica**

Arbusto aromático perenne de intenso olor a timol, 20-50 cm de alto de aspecto grisáceo, tallo recto leñoso muy ramificado. Hojas abundantes ovaladas, lanceoladas de 4 a 10 mm de largo, en ocasiones pueden parecer más estrechas porque se enrollan sus bordes hacia envés en épocas de sequía. Las flores son terminales numerosas en grupos de dos a 3 florecitas, bilabiadas de color rosa, púrpura pálido o blanco de 7-8 mm. Semilla lisa, ovalada, 0.7-1.0 mm de largo (Cano, Godínez, Chávez, & Barrientos, 2001; Gimeno, 2001).

- **Clasificación Taxonómica del tomillo**

Estrada (2010) clasifica taxonómicamente al tomillo como:

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: Thymus

Especie: Thymus Vulgaris

- **Hábitat**

El tomillo originario del mediterráneo en alturas de 0-1800 msnm (Asia occidental, Europa Central y el norte de África) pero es posible encontrarlo en diferentes partes del mundo, crece en terrenos montañosos, secos, soleados y calcáneos, es resistente a

sequias y heladas, el clima más favorable para su cultivo es templado y subtropical en América. Su reproducción se puede hacer con semillas o por medio de pies o esquejes (Ingalo, 2014).

- **Usos terapéuticos**

El tomillo en medicina es usado como antibacteriano estudios demuestran que el extracto de hojas inhibe *S. Aureus*. El aceite esencial es activo contra *C. Diphtherheriae*, *E.coli*, *S. Typhi*, *S. Pneumoniae* y *S. Pyogenes*, del mismo modo tiene efecto fungistático y fungicida contra *M. Canis* y *M gypseum*; es activo contra hongos fitopatógenos, expectorante su aceite esencial fluidifica los líquidos, antihelmíntico y antitusivo relajando el musculo liso bronquial, antiséptico su infusión se emplea en problemas bucales. También se lo usa como digestivo, estimulante del apetito, antiespasmódico, carminativo. Por vía tópica sirve en cicatrización de heridas, reumatismo, eczema, quemaduras, soriasis, tineas y aumenta el flujo sanguíneo del área (Cano et al., 2001; Estrada, 2010; Zeghad & Merghem, 2013).

- **Composición Química**

La planta de tomillo contiene aceite esencial (1.0-2.5%): fundamentalmente presenta timol (40%), p-cimeno (15-50%), alcanfor (11- 16%), carvacrol (2.5-14.6 %), linalol (4%), 1,8-cineol (3 %), cimol borneol, camfeno, limonelo,  $\alpha$ - y  $\beta$ -, citral, mirceno,  $\alpha$ -felandreno, geraniol,  $\beta$ -cariofileno,  $\delta$ -cadineno,  $\beta$ -terpineol, terpinoleno, verbenona y otros constituyentes volátiles.

También contiene flavonoides como la apigenina y luteolina, numerosas flavonas metoxiladas, flavonas, flavonoles y heterósidos de luteonina.

Taninos como: serpilina, saponinas acidas y neutras, ácido labiático, oleanómico y ursólico, ácidos fenilcarboxilicos, ácidos rosmarínico, ácido litospermico, resinas (Alonso, 2008; Cano et al., 2001; Folcarà & Vanaclocha, 2000).

- **Mecanismo de acción**

La actividad antimicrobiana del tomillo está dada gracias a sus componentes químicos, teniendo principalmente timol, carvacrol, p-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, borneol, limoneo y linalol. (Rosas & López, 2011). Los compuestos que mayor actividad antimicrobiana poseen son el carvacrol y timol que por lo general se encuentra formando parte del 40% del aceite. Se ha reportado que los aceites esenciales tienen mayor afinidad por las bacterias gram positivas ya que según Khedid et al. (2009) tienden a ubicarse en la pared celular y se acumulan en membrana citoplasmática; mientras que Nuñez et al. (2007) manifiesta que los aceites esenciales por su carácter lipofílico, actúan en la membrana citoplasmática; la acumulación sobre ésta de compuestos lipofílicos produce considerables efectos en las propiedades estructurales y funcionales de la misma, con un aumento de la permeabilidad celular. (Zeghad & Merghem, 2013) afirma que flavonoides carentes de grupos hidroxilo tienen mayor afinidad química por los lípidos de membrana en comparación con los que poseen más. En un trabajo realizado por Burt & Reinders (2003) determinan la acción antimicrobiana del carvacrol que aumenta la fluidez y permeabilidad de la membrana celular, crea canales a través de la membrana empujando las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos permitiendo que los iones abandonen el citoplasma; por otro lado el timol se une a las proteínas de membrana de manera hidrofóbica y por puentes de hidrogeno volviendo la membrana permeable.

### **2.2.2 *Staphylococcus aureus***

Es un género etiológico de una gran variedad de patologías, considerando su rol primordial en infecciones nosocomiales, que incluyen: afecciones de la piel y tejidos blandos, bacteriemias, infecciones de sistema genitourinario, endocarditis e infecciones del Sistema Nervioso Central. (Perazzi et al., 2010)

- **Características microbiológicas**

El género *Staphylococcus* son cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Su nombre proviene del griego *staphyle* que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa positivos (enzima capaz de desdoblarse el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre), coagulasa y factor de agrupamiento extracelular; característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos. (Cervantes et al., 2014; Haddadin, Fappiano, & Lipsett, 1998)

- **Taxonomía**

Cervantes et al. (2014) clasifican taxonómicamente al tomillo de la siguiente manera:

Dominio: Bacteria

Filo: Firmicutes

Clase: Bacili

Orden: Bacillales

Familia: Staphylococcaceae

Género: *Staphylococcus*

Especie: *S. aureus*

- **Fisiología**

Este género *Staphylococcus* es relativamente más resistente al calor, mientras que otras bacterias se destruyen en 30 minutos a 60 grados centígrados. Los *Staphylococcus* necesitan temperaturas más grandes y tiempos más largos. La resistencia al calor está acompañada por crecimiento máximo más elevado, a diferencia de muchas bacterias crecen a 45 grados centígrados. La resistencia a la desecación también es notable; pueden permanecer infecciosos en el medio ambiente

durante largos periodos. Una característica que tienen en común los gram positivos es que son sensibles a la acción bacteriostática de los colorantes trifenil-metano, también son sensibles a las penicilinas y antibióticos de amplio espectro, sin embargo suelen desarrollar resistencia microbiana a los fármacos (Almeida, 2013).

- **Estructura**

### **Pared celular**

Contienen polisacáridos, proteínas antigénicas y también otras sustancias importantes. El péptidoglucano suministra el exoesqueleto rígido de la pared celular. La exposición a un ácido fuerte o a lisozima destruye a los péptidoglucano. El péptidoglucano es importante en la patogenia de la infección: induce la producción de interleucina-1 (pirógeno, endógeno) y de anticuerpos opsonicos en los monocitos; y puede atraer químicamente a los leucocitos polimorfonucleares. Los ácidos teicoicos, polímeros de glicerol, están unidos al péptidoglucano y pueden ser antigénicos. Algunas cepas del *Staphylococcus aureus* poseen cápsulas que inhiben la fagocitosis por los leucocitos polimorfo nucleares a menos que se encuentren presentes anticuerpos específicos (Almeida, 2013).

### **Estructura génica**

El género *Staphylococcus* está constituido por 19 especies y se diferencian de otros géneros de la familia en base al contenido de guanina y citosina en el ADN composición de la pared celular y su habilidad de crecer anaeróbicamente y fermentar la glucosa bajo esas condiciones. Existen tres especies más conocidas las cuales son: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus aureus* (Almeida, 2013).

### **Espectro de enfermedades e infecciones**

Las infecciones estafilococales por lo general involucran una intensa supuración y destrucción de tejido. Y en general pueden agruparse en infecciones cutáneas

localizadas como la foliculitis, forúnculo e impétigo; infecciones de diversas heridas; infecciones profundas que se diseminan a partir de la piel para causar bacteriemia y comprometer huesos, articulación, órganos y tejidos profundos; causan muchos síndromes patológicos como abscesos en la piel, osteomielitis, endocarditis, neumonía y síndrome de shock tóxico. Ya que la cepa de *Staphylococcus aureus* se encuentra colonizando continuamente la piel, está expuesta a todas las terapias con antibióticos surgiendo de esta manera los microorganismos resistentes (Bae et al., 2004; García, 2006).

### **2.2.3 MEDIOS DE CULTIVO**

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos. (Solano, 2005)

#### **a) Medios de cultivo no selectivos**

Son aquellos que permiten el crecimiento de una gran variedad de microorganismos (Castro A., 2014).

- **Caldo cerebro-corazón.-** La infusión de cerebro y corazón ha resultado ser efectiva en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos muchos tipos de patógenos. Se ha utilizado como medio base para las nuevas fórmulas de medios de cultivo cuando se suplementa con sangre o agentes selectivos (Casado, Torrico, & Medina, 2012).

#### **b) Medios de cultivo selectivo**

Son aquellos que permiten el crecimiento de un tipo de microorganismos determinado, inhibiendo el desarrollo de los demás (Castro, 2014).

- **Agar Manitol salado.-** es un medio de cultivo que se utiliza normalmente en microbiología. Permite el crecimiento de un determinado grupo de bacterias mientras que inhibe el crecimiento de otras. Este medio es importante en el laboratorio clínico debido a que es capaz de distinguir los microorganismos patogénicos en un corto periodo de tiempo. Contiene una alta concentración (~7.5%-10%) de sal (NaCl), haciéndolo selectivo para *Staphylococcus* debido a que el nivel de NaCl es inhibitorio para la mayoría de las bacterias (Casado et al., 2012).
- **Agar Mueller Hinton.-** es un medio utilizado para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en microorganismos aeróbicos por el método de Bauer-Kirby. Debido a su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente (Rivas, Miliwebsky, & Deza, 2007).

#### 2.2.4 MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD

- **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Es la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos, cuando la CMI sea menor, la susceptibilidad del microorganismo será mayor al fármaco usado (Botana, 2002).

- **Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

Corresponde a la mínima concentración de antibiótico que elimina el 99,9 % del número original de bacterias. Refleja la capacidad de un fármaco de disminuir de forma sustancial el número de bacterias (Botana, 2002).

- **Prueba de difusión por disco**

Consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Estrada, 2010).

## CAPITULO III

### 3.1 HIPÓTESIS

Los extractos de mastuerzo y tomillo presentan diferente sensibilidad antimicrobiana sobre la cepa certificada de *Staphylococcus aureus*

### 3.2 OBJETIVOS

#### 3.2.1 Objetivo General

- Evaluar in vitro la eficacia antimicrobiana del extracto de mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre cepa certificada de *Staphylococcus aureus*

#### 3.2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar las concentraciones 1%, 5%, 10%, 30%, 50%, 70% y 90% del extracto de mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*)
- Comparar la eficacia de los extractos de mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre cepa certificada de *Staphylococcus aureus* mediante la medición del diámetro del halo de sensibilidad
- Determinar la concentración mínima bactericida de los extractos de mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*)

## CAPÍTULO IV

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

La presente investigación se realizó en la Universidad Técnica de Ambato, laboratorio Facultad de Ciencias Agropecuarias en el Campus Querochaca ubicado a 1km de la vía Cevallos- Quero, provincia de Tungurahua cuyas coordenadas geográficas son: Latitud 1°22'3.45"S, Longitud 78°36'30.75"O y una altitud de 2883 msnm.

#### 4.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

La investigación se desarrolló en el laboratorio de bacteriología de la carrera de medicina veterinaria y zootecnia, en el que se maneja un ambiente controlado con condiciones ambientales de 19 °C y 40 % de humedad. Las condiciones meteorológicas del campus Querochada se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1. Condiciones meteorológicas**

PARÁMETRO	VALOR
Temperatura:	13°C
Humedad relativa:	78 %
Precipitación:	10 mm
Vientos:	11 Km/hora

## **4.3 EQUIPOS Y MATERIALES**

### **4.3.1 Material vegetal**

Hojas de mastuerzo

Hojas de tomillo

### **4.3.2 Material biológico**

Cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1026™\*

### **4.3.3 Reactivos**

Agar Mueller Hinton

Agar Salt Manitol

Caldo Cerebro-Corazón

Tubo de MacFarland N°5

### **4.3.4 Materiales de Laboratorio**

Agua destilada

Algodón

Asa de platino

Cajas Petri.

Discos de sensibilidad antimicrobiana marca OXOID

Espátula

Gasa

Gradillas porta tubos

Guantes N° 6

Mandiles

Papel aluminio

Pinzas

Pipetas de 25 ml

Pipetas de 10 ml

Vaso de precipitación de 600 ml

#### **4.3.4 Equipos**

Agitador magnético con calentador StableTemp

Autoclave

Balanza electrónica Distecnis

Cabina de flujo laminar Biobase

Incubadora red Line by Binder

Refrigeradora Feda

#### **4.4 FACTORES DE ESTUDIO**

La investigación se tuvo como factores de estudio los siguientes:

##### **a) Material biológico**

*Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1026™\*

##### **b) Material vegetal**

Mastuerzo (Extracto acuoso)

Tomillo (Aceite esencial)

##### **c) Dosis de los extractos**

- 1.** 0%
- 2.** 1%
- 3.** 5%
- 4.** 10 %
- 5.** 30 %
- 6.** 50%
- 7.** 70%
- 8.** 90%

## 4.5 TRATAMIENTOS

La investigación evaluó la eficacia antimicrobiana de dos extractos sobre una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1026™\* utilizando siete dosis diferentes de extracto de mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) (1%, 5%, 10%, 30%, 50%, 70% y 90%). En el cual se evaluó a un total de 60 cultivos con 5 repeticiones en cada uno y en cada placa Petri se utilizó 4 discos de sensibilidad impregnados con 0,2 ml de cada concentración de cada extracto; los tratamientos observados se presentan en la tabla 2.

**Tabla 2. Tratamientos**

Tratamientos	Discos de sensibilidad	Nº Repeticiones por tratamiento	Total de discos de sensibilidad en placa Petri
Extracto de mastuerzo ( <i>Tropaeolum majus</i> )			
0%	4	5	20
1%	4	5	20
5%	4	5	20
10%	4	5	20
30%	4	5	20
50%	4	5	20
70%	4	5	20
90%	4	5	20
Extracto de Tomillo ( <i>Thymus vulgaris</i> )			
0%	4	5	20
1%	4	5	20
5%	4	5	20
10%	4	5	20
30%	4	5	20
50%	4	5	20
70%	4	5	20
90%	4	5	20
<b>Total</b>			<b>380</b>

## **4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El diseño experimental aplicado fue el de bloques al azar en arreglo factorial 2X7+1 con 5 repeticiones.

Se realizó el análisis de varianza según el diseño planteado y la prueba de TUKEY al 5% para comparar los tratamientos que resultaron estadísticamente significativos.

## **4.7 MANEJO DE LA INVESTIGACIÓN**

### **4.7.1 Obtención del material biológico.**

La cepa certificada *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1026™\* se adquirió del laboratorio MEDIBAC.

### **4.7.2 Obtención de los extractos**

Se adquirió 5 Kg de hojas de mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y de tomillo (*Thymus vulgaris*) las cuales fueron lavadas con agua destilada y secadas en un lugar ventilado y oscuro por 24 horas. Obteniendo los extractos en el equipo de destilación tipo Clevenger, para lo que se añadió 1,5 litros de agua destilada por cada kilo de material vegetal. Obteniéndose extracto acuoso y aceite esencial de mastuerzo y tomillo respectivamente. Siguiendo el mismo proceso.

### **4.7.3 Elaboración de las concentraciones de extracto acuoso de mastuerzo**

Se usó agua destilada como solvente para el extracto acuoso de mastuerzo, las concentraciones se calcularon mediante el método de dilución, las diluciones fueron calculadas en 5 ml de volumen, como se presenta en la tabla 3.

**Tabla 3. Concentraciones y diluciones de agua destilada y extracto acuoso de mastuerzo (*Tropaeolum majus*)**

Sustancia	Concentraciones						
	1%	5%	10%	30%	50%	70%	90%
Agua destilada	4,95 ml	4,75 ml	4,5 ml	3,5 ml	2,5 ml	1,5 ml	0,5 ml
Extracto acuoso de mastuerzo	0,05 ml	0,25 ml	0,5 ml	1,5 ml	2,5 ml	3,5 ml	4,5 ml

#### 4.7.4 Elaboración de las concentraciones de aceite esencial de tomillo

Se utilizó etanol al 96,8% como solvente, las concentraciones se calcularon mediante el método de dilución, las diluciones fueron calculadas en 5 ml de volumen, como se observa en la tabla 4

**Tabla 4. Concentraciones y diluciones de agua destilada y aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*)**

Sustancia	Concentraciones						
	1%	5%	10%	30%	50%	70%	90%
Etanol al 96, 8%	4,95 ml	4,75 ml	4,5 ml	3,5 ml	2,5 ml	1,5 ml	0,5 ml
Aceite esencial de tomillo	0,05 ml	0,25 ml	0,5 ml	1,5 ml	2,5 ml	3,5 ml	4,5 ml

#### 4.7.5 Elaboración de los medios de cultivo

En el caso del agar Manitol Salado se siguió las especificaciones de Laboratorios Himedia, se suspendió 111.02 g por cada 1000 ml de agua destilada en agitación constante, para luego esterilizar la solución a 121° C en autoclave por 15 minutos. Para el agar Mueller Hinton se siguió el procedimiento de laboratorios Difco, se diluyó 38 g en 1000 ml de agua con agitación constante para luego ser esterilizado en autoclave a 121° C por 15 minutos. Mientras que para elaborar el caldo Cerebro - Corazón de acuerdo a la casa comercial OXOID se usó 37 g por cada 1000 ml de agua destilada.

#### **4.7.6 Activación de la cepa**

Para la activación de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1026™\* se siguieron las indicaciones del manual de activación; iniciando con la hidratación de la cepa, apretando con la yema de los dedos la ampolla que se encuentra en la parte superior del hisopo, con el fin de liberar el fluido de hidratación. Una vez hidratada la cepa se procedió a realizar la siembra en la caja Petri debidamente rotulada, y se colocó el inóculo en agar Manitol y con un asa bacteriológica se realizó el estriamiento por el método escocés e incubando a 37°C durante 24 horas.

### **4.8 VARIABLES RESPUESTA**

#### **4.8.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas bacterianas mediante el método de microdilución en caldo.**

Se realizó de acuerdo con la metodología usada por García, (2006) en donde se tomaron cinco colonias bien aisladas de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1026™ con la ayuda de un asa bacteriológica y se las transfirió a 5 ml de caldo Cerebro-Corazón. Los caldos de cultivo se dejaron incubar a 35°C de 2 a 3 horas hasta que aparezca una turbidez ligeramente visible, una vez alcanzada esta turbidez se realizaron mediciones en el espectrofotómetro con el fin de obtener un valor de 0,4 y 0,5 de absorbancia. La solución resultante tuvo  $1 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y se realizó el siguiente procedimiento.

- En el tubo N° 1 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de mastuerzo al 1 %.
- En el tubo N° 2 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de mastuerzo al 5 %.
- En el tubo N° 3 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de mastuerzo al 10 %.
- En el tubo N° 4 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de mastuerzo al 30 %.
- En el tubo N° 5 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de mastuerzo al 50 %.

- En el tubo N° 6 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de mastuerzo al 70 %.
- En el tubo N° 7 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de mastuerzo al 90 %.

Para el aceite esencial de tomillo se tomó la dilución de caldo Cerebro-Corazón y se transfirió a otros 7 tubos de ensayo con la cepa bacteriana: *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1026™\* de la siguiente manera:

- En el tubo N° 1 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de Tomillo al 1 %.
- En el tubo N° 2 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de Tomillo al 5 %.
- En el tubo N° 3 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de Tomillo al 10 %.
- En el tubo N° 4 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de Tomillo al 30 %.
- En el tubo N° 5 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de Tomillo al 50 %.
- En el tubo N° 6 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de Tomillo al 70 %.
- En el tubo N° 7 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml del extracto de Tomillo al 90 %.

Todos los tubos fueron incubados a 37° C por 24 horas, transcurrido este tiempo se observó la turbidez de las concentraciones usadas.

#### **4.8.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).**

Se tomó como referencia el procedimiento realizado por Sadiki et al. (2014) donde para establecer la CMB, se tomaron los tubos que no presentaron turbidez en la Concentración mínima inhibitoria y se sembró en agar Mueller dejando incubar a 37°C por 24 horas.

### **4.8.3 Prueba de difusión por disco.**

Con un asa bacteriológica se tomó cinco colonias de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1026™\*\* cultivada previamente por 24 horas en agar Manitol salado y se inocularon en 5 ml de caldo Cerebro-Corazón y se incubaron a 37°C de 2 a 3 horas hasta que apareció una turbidez semejante al tubo N° 0.5 de la escala de MacFarland. La solución resultante tiene  $1 \times 10^8$  de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Una vez estandarizada la cepa se procedió a cultivar con ayuda de un hisopo estéril por estriado múltiple en agar Mueller Hinton, dejando reposar por 10 minutos antes de colocar los discos de sensibilidad OXOID con dosis de los extractos e impregnándolos en el agar Mueller.

Con ayuda de una pinza estéril colocó 4 discos de sensibilidad en la superficie del agar de cada placa sembrada, distribuidos de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se midieron los halos de inhibición usando una regleta.

## **4.9 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN**

El análisis estadístico, se realizó utilizando el Programa INFOSTAT versión 2016

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 RESULTADOS

##### 5.1.2 Concentración mínima inhibitoria

Tabla 5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de Mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y del aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*)

Concentraciones	CMI del extracto de Mastuerzo sobre <i>S. aureus</i>	CMI del aceite de Tomillo sobre <i>S. aureus</i>
1%	+	-
5%	+	-
10%	+	-
30%	+	-
50%	+	-
70%	+	-
90%	+	-
<b>Control negativo Etanol al 96 %</b>	+	+

Positivo (+), Negativo (-)

De acuerdo a la tabla 5 el extracto de mastuerzo si presentó turbidez en todas las concentraciones refiriendo que existe crecimiento bacteriano positivo, por lo tanto dicho extracto no presenta actividad antimicrobiana, mientras que el comportamiento de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1026™\* frente al incremento en las concentraciones de tomillo, tiene actividad específica observada en la turbidez de cada

una de las muestras realizadas; demostrando así, que desde el 1% en adelante no presenta turbidez y por tanto no existe crecimiento bacteriano.

### 5.1.3 Concentración bactericida mínima (CBM)

**Tabla 6. Determinación de la concentración concentración bactericida mínima (CBM) del extracto acuoso de Mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y del aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*)**

Concentraciones	CBM del extracto de Mastuerzo sobre <i>S. aureus</i>	CBM del aceite de Tomillo sobre <i>S. aureus</i>
1%	+	-
5%	+	-
10%	+	-
30%	+	-
50%	+	-
70%	+	-
90%	+	-
<b>Control negativo Etanol al 96 %</b>	+	+

Positivo (+), Negativo (-)

Con respecto a la concentración bactericida mínima en la tabla 6 no se apreció crecimiento de colonias en agar Mueller Hinton, por lo tanto las concentraciones de aceite de tomillo al 1%, 5%, 10%, 30%, 50%, 70% y 90% no permitieron el desarrollo bacteriano de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC® BAA-1026™\*\*, en el caso del mastuerzo hubo crecimiento en todas las concentraciones.

### 5.1.3 Prueba de difusión por disco.

**Tabla 7. Halos de sensibilidad (mm) del aceite esencial de Tomillo (*Thymus vulgaris*)**

TRATAMIENTOS						
Concentración	1%	5%	10%	E.E	CV	Valor de P
<i>Staphylococcus aureus</i>	12.2 <sup>b</sup>	15.35 <sup>a</sup>	15.9 <sup>a</sup>	0,48	7,38	0.0003

ab = Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). E.E= Error Estándar. CV= coeficiente de variación.

En la tabla 8 se observa que las diluciones de los tratamientos al 5% y 10% no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) siendo estadísticamente iguales con valores de 15.35 mm y 15.9 mm respectivamente, en relación a 1% con 12.2 mm en halos de inhibición. Mientras que en concentraciones al 30%, 50%, 70%, 90% no fue posible medir sensibilidad ya que el crecimiento bacteriano se inhibe por completo en placa

En el caso del extracto de mastuerzo no hubo formación de halos de inhibición sobre la cepa *Staphylococcus aureus* por lo tanto no existe efecto antimicrobiano sobre esta cepa.

## 5.2 DISCUSIÓN

Un sin número de estudios se han realizado en todo el mundo sobre las propiedades antimicrobianas de los extractos obtenidos de diversas plantas clasificadas como medicinales o como especias. Existen varios métodos para la obtención de extractos siendo unos más eficaces que otros en dependencia del material vegetal usado. En la presente investigación se usó el método de destilación por arrastre de vapor para obtener aceite esencial de tomillo el cual resultó altamente eficaz sobre la cepa *Staphylococcus aureus* al igual que en las investigaciones realizadas por (Coy & Acosta, 1996; Fahimi et al., 2014; Imelouane et al., 2009; Sartoratto et al., 2004) al usar aceite esencial de *Thymus vulgaris* como antimicrobiano contra *S. aureus*; por otro lado en el estudio de Herrera & García (2006) el extracto acuoso de tomillo no

fue efectivo y manifiesta que este tipo de extracto funciona mejor cuando las condiciones son anaerobias, mientras que Hammad, Sallal, & Darmani (2007) revelaron que la efectividad antimicrobiana del tomillo en estado acuoso varía en función de la concentración.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) evidenció un efecto claramente marcado del aceite esencial de tomillo sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* desde el 1 % siendo estos resultados similares a los obtenidos por De Souza et al. (2008) de 1,23 %, en el mismo tipo de cepa; mientras que Hammer, Carson, & Riley (1999) utilizaron aceite comercial obteniendo una CMI de 0,3 % sobre *S. aureus*, mismo valor que es reportado en la investigación de (Sadiki et al., 2014). García (2006) al realizar un estudio con extracto alcohólico determinó la CMI de 2.77 %, el autor manifiesta que la variación se debe a que los extractos alcohólicos necesitan de mayor concentración para inhibir el crecimiento bacteriano. La comparación de datos obtenidos en este estudio con respecto a artículos previamente publicados resulta compleja, Hammer et al. (1999) mencionan que, la composición de aceites y extractos del *Thymus vulgaris* cambia según las condiciones climáticas y ambientales de cada región, otro factor que influye en esta variación de datos es la metodología usada en la evaluación de la actividad antimicrobiana.

La prueba de sensibilidad antimicrobiana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre *Staphylococcus aureus* determinó valores de 12,2 mm, 15,35 mm y 15,9 mm en concentraciones al 1 %, 5 % y 10 % respectivamente, datos que se asemejan a los obtenidos por Zeghad & Merghem, (2013) quien utilizó aceite esencial al 30% de *Thymus vulgaris* obteniendo diámetros entre 10 mm a 15 mm de halos de inhibición. De igual manera Acosta, Castro, Roque, & Felix, (2000) reportaron datos de 8 mm y 20 mm en concentraciones al 5% y 10%.

El extracto acuoso de *Tropaeolum majus* no mostró ningún efecto inhibitorio sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* al igual que en el ensayo realizado por Bazylko et al. (2013) en el cual ninguna concentración presentó actividad antimicrobiana, del mismo

modo Acosta (2006) concluye que los extractos de mastuerzo obtenidos por arrastre de vapor no tuvieron efecto antimicrobiana debido a que los compuestos que le atribuyen dicha actividad son de difícil extracción con agua como solvente, también menciona que es necesario tomar en cuenta los factores determinantes en el momento de elaboración de los extractos, como son: la temperatura de extracción, el pH y la coexistencia con otras sustancias como proteínas, lípidos y minerales que puede afectar la actividad biológica de los fenoles presentes en la planta.

## CAPITULO VI

### CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

#### 6.1 CONCLUSIONES

- Al evaluar la eficacia antimicrobiana in vitro del extracto de mastuerzo (*Tropaeolum majus*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la cepa de *Staphylococcus aureus*, demostró que el extracto de tomillo fue altamente eficaz inhibiendo el crecimiento bacteriano, mientras que el mastuerzo no dio ningún resultado favorable.
- El extracto más eficaz sobre cepa de *Staphylococcus aureus* fue de tomillo (*Thymus vulgaris*) con valores comprendidos entre 12,2 mm, 15,35 mm y 15,9 mm de diámetro del halo de sensibilidad en concentraciones al 1%, 5% y 10% respectivamente. A partir de diluciones al 30 % en adelante se inhibió totalmente el crecimiento bacteriano.
- Se determinó la concentración mínima bactericida del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) desde el 1% el cual impidió el desarrollo de colonias bacterianas.

## 6.2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-shanab, B. (2004). Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Utilized in Popular Medicine in Palestine. *Turkish Journal of Biology*, 28, 99–102.
- Acosta, L. (2006). *Exploración de las propiedades antimicrobianas de extractos vegetales a partir de y su uso potencial en la industria de alimentos y cosmética (Tesis pregrado)*. Universidad de la Sabana. Bogotá-Colombia.
- Acosta, O., Castro, A., Roque, M., & Felix, L. (2000). Composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L “Tomillo”, por cromatografía de gases-espectrometro de masa GC/MS y análisis de su actividad antimicrobiana. *Ciencia E Investigación*, 3(2), 69–78.
- Al-Bayati, F. A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), 403–406.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.12.003>
- Almeida, C. (2013). *Incidencia Staphylococcus aureus en la carne de pollo faenado que se expende en el mercado municipal del cantón Quevedo. (Tesis pregrado)*. Universidad de Guayaquil. Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/2390/1/ALMEIDA LAZ CINTHYA 225.pdf>
- Alonso, J. (2008). *Tratado de fitofármacos y Natrucéuticos*. Buenos Aires: Corpus.
- Ardila, M. I., Vargas, A. F., Pérez, J. E., & Mejía, L. F. (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*, 8(enero), 47–57.
- Bae, T., Banger, A. K., Wallace, A., Glass, E. M., Aslund, F., Schneewind, O., & Missiakas, D. M. (2004). *Staphylococcus aureus* virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(33), 12312–12317.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0404728101>
- Bastidas, C., Llacua, Y., & Lousset, F. (2016). *Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de las flores de la especie vegetal mastuerzo (Tompaeolum majus L.) frente al crecimiento del microorganismo Penicillium sp. (Tesis pregrado)*. Universidad Nacional del Centro del Perú. Huacayo-Perú.
- Bazylko, A., Granica, S., Filipek, A., Piwowarski, J., Stefańska, J., Osińska, E., & Kiss, A. K. (2013). Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L. *Industrial Crops and Products*, 50, 88–94.  
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.003>
- Botana, L. (2002). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Getafe: McGRAW-HILL.
- Bravo, E. (2013). *Apuntes sobre la Biodiversidad del Ecuador. Abya-Yala (Vol. 28)*.

Quito-Ecuador: Abya-Yala. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Brondani, J. C., Cuelho, C. H. F., Marangoni, L. D., Lima, R. de, Guex, C. G., Bonilha, I. de F., & Manfron, M. P. (2016). Traditional usages , botany , phytochemistry , biological activity and toxicology of *Tropaeolum majus* L . - A review. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 15(4), 264–273.
- Burt, S. ., & Reinders, R. . (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils agains *Escherichia coli* 0157:H7. *Letter in Applied Microbiology*, 36, 162–167.
- Cabezas, G. D. (2014). *Evaluación del efecto cicatrizante de extractos a base de mastuerzo (Tropaeolum majus) en ratones (Mus musculus)*. (Tesis pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador.
- Cano, T. M., Godínez, J. E., Chávez, B. L., & Barrientos, C. E. (2001). *Obtención y caracterización del aceite esencial de tomillo (Thymus vulgaris) cultivado en Guatemala, utilizado en diversidad de productos fitofarmacéuticos*. (Tesis maestría). Universidad de San Carlos de Guatemala. México. Retrieved from <http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/informes/puidi/INF-2001-075.pdf>
- Casado, C., Torrico, G., & Medina, M. (2012). Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología. Retrieved July 19, 2017, from <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
- Castro A. (2014). *Bacteriología Médica Basada en Problemas* (2 edición). México: El Manual Moderno. Retrieved from [https://www.researchgate.net/profile/Ana\\_Castro14/publication/264310930\\_Enfermedades\\_bacterianas\\_del\\_tracto\\_respiratorio\\_superior/links/53d81d100cf2631430c1785c.pdf#page=324](https://www.researchgate.net/profile/Ana_Castro14/publication/264310930_Enfermedades_bacterianas_del_tracto_respiratorio_superior/links/53d81d100cf2631430c1785c.pdf#page=324)
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Pa- Tología Clínica Y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28–40. Retrieved from [www.medigraphic.com/patologiaclinica](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica)
- Coy, A., & Acosta, G. (2013). Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2), 237–246. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962013000200007&script=sci\\_arttext&tlng=en](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962013000200007&script=sci_arttext&tlng=en)
- De Souza Prestes, L., Frascolla, R., Santin, R., Ziemann dos Santos, M. A., Costa Schram, R., Alves Rodrigues, M. R., ... Araújo Meireles, M. C. (2008). Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13(4), 0–0. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962008000400003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400003)
- Estrada, S. P. (2010). *Determinación de la actividad antibacteriana In Vitro de los extractos de romero (Rosmarinus officinalis) y tomillo (Thymus vulgaris)*. (Tesis

- pregrado*). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/699/1/56T00229.pdf>
- Fahimi, S., Hajimehdipoor, H., Shabanpoor, H., Bagheri, F., & Shekarchi, M. (2014). Synergic antibacterial activity of some essential oils from lamiaceae. *Research Journal of Pharmacognosy*, 2(3), 23–29.
- Folcarà, S., & Vanaclocha, B. (2000). Usos terapéuticos del tomillo. *Revista de Fitoterapia*, 5–13.
- García, C. (2006). *Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de Staphylococcus aureus con resistencia múltiple (Tesis pregrado)*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torrión-México.
- García, C., Alonso, S., Rodríguez, R., Martínez, A., Ramírez, P., & Moreno, A. (2009). Susceptibilidad in vitro de una Cepa de Staphylococcus aureus Resistente a Diferentes Extractos Vegetales. *Revista Agraria*, 6(1), 19–24.
- Gimeno, J. (2001). Tomillo (*Thymus vulgaris*). *Medicina Natural*, 3, 173–175.
- Gualavisí, L. M. (2008). *Creación e introducción del manejo de la historia clínica, el parte diario y el concentrado mensual de Medicina Tradicional Andina, en un servicio de salud del Ministerio de Salud Pública. (Tesis pregrado)*. Universidad San Francisco de Quito. Quito-Ecuador. Retrieved from <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/698/1/90047.pdf>
- Haddadin, A. S., Fappiano, S. A., & Lipsett, P. A. (1998). Revised guidelines for the control of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in hospitals. British Society for Antimicrobial Chemotherapy, Hospital Infection Society and the Infection Control Nurses Association. *The Journal of Hospital Infection*, 39(4), 253–90. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(98\)90293-6](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(98)90293-6)
- Hammad, M., Sallal, A.-K., & Darmani, H. (2007). Inhibition of Streptococcus mutans adhesion to buccal epithelial cells by an aqueous extract of Thymus vulgaris. *International Journal of Dental Hygiene*, 5(4), 232–235. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2007.00266.x>
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985–990. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>
- Herrera, F., & García, R. (2006). Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. *Bistua: Revista de La Facultad de Ciencias*, 4, 13–19. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/903/90340202.pdf>
- Holden, M. T. G., Feil, E. J., Lindsay, J. A., Peacock, S. J., Day, N. P. J., Enright, M. C., ... Parkhill, J. (2004). Complete genomes of two clinical Staphylococcus aureus strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(26), 9786–91. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402521101>
- Imelouane, B., Khedid, K., Bachiri, A., Ankit, M., Amhamdi, H., & Wathelet, J. .

- (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of thyme (*Thymus vulgaris*) from Eastern Morocco. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11(5), 205–208. Retrieved from [http://www.partochemi.com/userfiles/uploads/GC-MS\\_Thymus\\_vulgaris\\_2012\\_01.pdf](http://www.partochemi.com/userfiles/uploads/GC-MS_Thymus_vulgaris_2012_01.pdf)
- Ingalo, I. (2014). *Determinación de la actividad antimicótica in vitro del extracto de tomillo (Thymus vulgaris) en comparación con la nistatina y el gluconato de clorhexidina al 0,2% sobre cepas de Candida albicans. (Tesis pregrado)*. Universidad Central Del Ecuador. Quito-Ecuador.
- Kalembe, D., & Kunicka, A. (2003). Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 813–829. <https://doi.org/10.2174/0929867033457719>
- Lourenço, E. L. B. E. A. (2011). Atividade de *Tropaeolum majus* L. sobre a mobilização e migração leucocitária em modelo de bolsão inflamatório. *Ciênc. Saude UNIPAR*, 15(3), 247–256.
- Nuñez, L., Moro, A., & D'Aquino, M. (2007). Enterotoxinas y enzimas estafilococcicas en presencia de aceites esenciales. *Ars Pharmaceutica*, 48(2), 175–185.
- O'Connell, D. (2006). Bacterial evolution. *Natrure Reviews*, 4, 84.
- OMS. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Retrieved from <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
- Panchi, L. (2016). *Efecto antimicrobiano de los extractos de las hojas de tomillo (Thymus vulgaris) y de las pepas de ajo (Allium sativum) sobre las cepas de Enterococcus faecalis. Estudio In Vitro*. Unversidad Central del Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/5682/1/T-UCE-0015-240.pdf>
- Perazzi, B., Camacho, M., Bombicino, K., Flores, Z., Vay, C., & Famiglietti, A. (2010). Staphylococcus aureus: nuevos y antiguos antimicrobianos. *Revista Argentina de Microbiología*, 42, 199–202. Retrieved from <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v42n3/v42n3a10.pdf>
- Restrepo, M., Quintero, P. R., Fraume, N. J., & Palomino, A. (2005). *El milagro de las plantas : aplicaciones medicinales y orofaríngeas*. Fundación Hogares Juveniles Campesinos. Retrieved from [http://sanpablo.co/libreria/libros/ecologia/el\\_milagro\\_de\\_las\\_plantas](http://sanpablo.co/libreria/libros/ecologia/el_milagro_de_las_plantas)
- Rivas, M., Miliwebsky, E., & Deza, N. (2007). Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de Escherichia coli O157 productor de toxina Shiga a partir de especimenes clínicos. Retrieved March 13, 2017, from <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=NmZogH4P%2Bmk%3D&tabid=120&mid=460&language=es-ES>
- Rosas, A., & López, A. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de tomillo. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5(1), 41–45.
- Sadiki, M., Balouiri, M., Barkai, H., Maataoui, H., Koraichi, S. I., & Elabed, S. (2014). Synergistic antibacterial effect of *Myrtus communis* and *Thymus*

vulgaris essential oils fractional inhibitory concentration index. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(6), 121–124.

Santos, J., Aparecida, E., Felgueira, M., & Broetto, A. (2016). Influência do extrato hidroetanólico das folhas de *Tropaeolum majus* na restauração tecidual em lesões cutâneas. *Revista Saúde E Pesquisa*, 9, 101–109.

Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., & Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 275–280.

Solano, C. (2005). Microbiología general (Prácticas). Retrieved March 13, 2017, from <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/manual practicas micagral.pdf>

Zanetti, G. D., Manfron, M. P., Hoelzel, S. C. D. V. M., Pagliarin, V. P., & Morel, A. F. (2003). Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 22(2), 159–162.

Zeghad, N., & Merghem, R. (2013). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus vulgaris* L. *Medicinal and Aromatic Plant Research Journal*, 58(1), 27–35.

Zeller, G., & Schneeberger, H. (1982). *Abc de la salud: medios naturales de prevención y curación*. Barcelona: Blume.

### 6.3 ANEXOS



**Anexo 1. Obtención de los extractos por el método de destilación por arrastre de vapor en equipo Clevenger**



**Anexo 2. Concentraciones del aceite de *Thymus vulgaris***



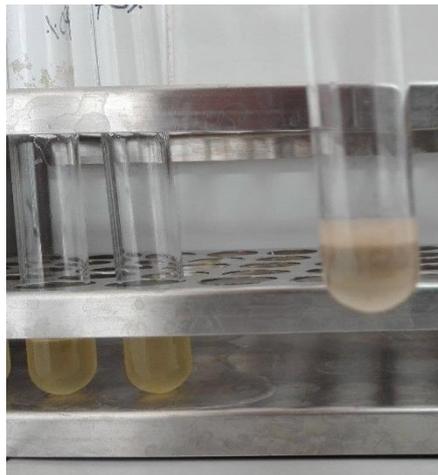
**Anexo 3. Cepa certificada de *Staphylococcus aureus***



**Anexo 4. Siembra de la cepa activada de *Staphylococcus aureus***



**Anexo 5. Ajuste del inculo al tubo N° 5 de la escala Mc Farland**



**Anexo 6. Concentración Mínima Inhibitoria al 1 % del aceite de Tomillo**



**Anexo 7. Halos de sensibilidad al 1% de aceite de Tomillo**



**Anexo 8. Halos de sensibilidad al 5 % de aceite de Tomillo**



**Anexo 9. Halos de sensibilidad al 10 % de aceite de Tomillo**



**Anexo 10. Prueba de halos de sensibilidad en extracto de Mastuerzo**

**Anexo 11. Diámetro de halos de inhibición *Staphylococcus aureus* (mm) usando aceite de Tomillo**

Tratamientos	I	II	III	IV	V
1%	12.5	11.25	11.75	12.75	12.75
5%	13.75	16.25	16	14	16.75
10%	14.75	15	16.5	16	17.25

**Anexo 12. Análisis de varianza para la variable sensibilidad antimicrobiana en *Staphylococcus aureus* usando aceite de Tomillo**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	39.86	2	19.93	17.46	0.0003
TRATAMIENTOS	39.86	2	19.93	17.46	0.0003
Error	13.70	12	1.14		
Total	53.56	14			

**Anexo 13. Prueba de Tukey al 5% para la variable sensibilidad antimicrobiana en *Staphylococcus aureus* usando aceite de Tomillo**

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
T3	15.90	5	0.48	A
T2	15.35	5	0.48	A
T1	12.20	5	0.48	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

## **CAPÍTULO VII**

### **PROPUESTA**

Elaboración de crema a de aceite esencial de tomillo para tratamientos de heridas post quirúrgicas de caninos.

#### **7.1. DATOS INFORMATIVOS**

Las instituciones involucradas en la presente propuesta será la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia y Hospital Docente Veterinario de la Universidad Técnica de Ambato.

#### **7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA**

El *Staphylococcus aureus* generalmente se encuentra colonizando la piel y es la principal causa de infecciones bacterianas, en este trabajo se comprobó la actividad antimicrobiana del aceite esencial de tomillo, demostrando que su CMI es del 1% al igual que la CBM y formó halos de sensibilidad de 12.2 a 15.9 mm.

#### **7.3. JUSTIFICACIÓN**

La aplicación de aceite de tomillo en crema al 1 % en heridas post quirúrgicas de caninos tiene como fin prevenir infecciones por bacterias que generalmente se encuentran colonizando la piel como el *Staphylococcus aureus*, el uso de una crema lipolitica tiene como propósito diluir el aceite esencial de tomillo hasta obtener la concentración deseada y facilitar la absorción en la piel, evitando así el uso de antibióticos sintéticos.

#### **7.4. OBJETIVO**

Manejar las infecciones post quirúrgicas causadas por *Staphylococcus aureus* en caninos, utilizando crema a base de aceite de tomillo.

#### **7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD**

La obtención de aceite de tomillo es de fácil de extracción, el material vegetal se puede obtener en todos los mercados del país. Las propiedades terapéuticas de este producto no han sido difundidas en la sociedad por lo que no hay gran demanda por este producto, su actividad antimicrobiana cuenta con grandes propiedades para ser usado como: conservante de alimentos, desinfectante y fitoterapéutico.

#### **7.6. FUNDAMENTACIÓN**

Las infecciones nosocomiales producidas en la clínica en su mayoría son causadas por bacterias oportunistas de amplia proliferación como es el caso de *Staphylococcus aureus*, al usar el aceite de tomillo en crema al 1 % en heridas se puede evitar la proliferación bacteriana en tejidos expuestos al medio exterior, las propiedades antimicrobianas del tomillo inhiben el crecimiento bacteriano evitando así infecciones y el uso de antibióticos.

#### **7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO**

Promover el uso de aceites esenciales de plantas mediante métodos de fácil obtención y accesibilidad. De igual manera elaborar un producto fitofarmacéutico seguro para evitar infecciones post quirúrgicas.

La obtención de aceite esencial de Tomillo se hace mediante destilación por arrastre de vapor en equipo Clevenger, en el que se obtienen extracto acuoso y aceite, con

ayuda de un tubo de separación se toma el aceite, para la formulación de la crema se utilizará crema liposoluble de fácil difusión para el aceite hasta obtener la concentración deseada.

## **7.8. ADMINISTRACIÓN**

La Universidad Técnica de Ambato mediante la Facultad de Ciencias Agropecuarias, así como Director del Hospital Docente Veterinario, médico residente y estudiantes serán responsables de la realización de esta propuesta que pueda llevar a una adecuada utilización de aceites mediante investigaciones que complementen el uso de aceites en animales.

## **7.9 PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN**

Mediante la realización de esta propuesta se podrá evitar infecciones post quirúrgicas en caninos sin el uso de antibióticos además de reducir costos, se observará la evolución de los pacientes y se deberá tener en cuenta las posibles reacciones secundarias de los pacientes al aceite ya que los aceites esenciales pueden poseer cierto grado de toxicidad dependiendo la dosis usada.