

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“DR. WILMAN RUIZ VIGO”

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Maribel Pompa Ramos

Nely Malca Hernández

Asesora:

Mg. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Cajamarca – Perú

Mayo - 2019

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“DR. WILMAN RUIZ VIGO”

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Tesis presentada en cumplimiento de los requisitos para optar el Título
Profesional de Químico Farmacéutico

Bach. Maribel Pompa Ramos

Bach. Nely Malca Hernández

Asesora: Mg. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Cajamarca – Perú

Mayo - 2019

COPYRIGHT © 2019 by

Maribel Pompa Ramos

Nely Malca Hernández

Todos los derechos reservados

PRESENTACIÓN

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO EVALUADOR:

Señores del jurado evaluador, dando cumplimiento a lo establecido por Reglamento de Grados y Títulos Profesionales de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo de Cajamarca, dejamos a vuestro criterio dicho trabajo de investigación intitulado:

Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Con la cual aspiramos obtener el Título Profesional de Químico Farmacéutico.

Es propicia esta oportunidad para manifestar nuestro sincero reconocimiento y agradecimiento a nuestra Alma Mater y a todos los docentes, quienes con su capacidad y dedicación contribuyeron a nuestra formación profesional.

Señores miembros del jurado dictaminador, dejamos en sus manos el presente trabajo de investigación para su evaluación y posibles sugerencias.

Cajamarca, mayo del 2019

Maribel Pompa Ramos
BACH. EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Nely Malca Hernández
BACH. EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“DR. WILMAN RUIZ VIGO”

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**APROBACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

**Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y
*Pseudomonas aeruginosa***

JURADO EVALUADOR

Mg. Blgo. Héctor Emilio Garay Montañez
(PRESIDENTE)

Mg. Q.F. Yudith Gallardo Coronado
(MIEMBRO)

Mg. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia
(MIEMBRO)

DEDICATORIA

A Dios, por darme la vida y la oportunidad de estar conmigo día a día por fortalecer e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de mis estudios profesionales. De igual manera a mis queridos y adorables padres quienes me enseñaron los valores, como el respeto, la honestidad y la honradez; y a la vez, me inculcaron y me motivaron a seguir estudiando. Estoy tan agradecida por apoyarme de manera incondicional tanto económicamente como moralmente, para hoy lograr uno de mis sueños tan anhelados.

Maribel

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi inspirador y por darme la fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de mis sueños. A mis queridos padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ellos he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy; me siento tan orgullosa de tener unos padres tan buenos, quienes de una u otra manera supieron comprenderme y guiarme por el buen camino en los momentos más difíciles de mi vida y mi carrera profesional, pensando que las cosas eran tan difíciles y yo sería incapaz de lograr mi meta. De igual manera a todas las personas que me han apoyado y han hecho que este trabajo se realice con éxito, en especial a aquellas que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos, para hoy poder decir tarea cumplida.

Nely

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirnos llegar hasta este momento tan especial y por habernos guiado a lo largo de nuestra carrera profesional.

A nuestros apreciados y respetados padres, quienes con tanto cariño y amor nos brindaron su apoyo incondicional durante los 5 años de estudios superiores.

A nuestros queridos docentes quienes, con responsabilidad, profesionalismo y ética, nos transmitieron sus conocimientos, que nos servirán a nosotras también más adelante para ayudar a los que lo necesiten.

A nuestra asesora Mg. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia quien, con tanto esmero, cariño y con los años de experiencia como docente, fue la guía durante el proceso de realización del trabajo de investigación.

Maribel y Nely

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal determinar la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las muestras fueron el aceite esencial de tomillo y cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39327 que fueron proporcionadas por el Hospital Regional de Cajamarca. La técnica consistió en hacer diluciones del aceite esencial de tomillo al 25, 50 y 100 % en alcohol etílico de 70°; procediéndose a reactivar las cepas bacterianas en Caldo Tripticasa de Soya y utilizándose Agar Müller Hinton para el antibiograma, siguiendo el método de Kirby – Bauer. Los resultados mostraron que el aceite esencial de tomillo alcanzó, halos de inhibición con un diámetro promedio de 11,6 mm al 25 %, 17,6 mm al 50 % y 22 mm al 100 % frente a *Staphylococcus aureus*; mientras que, para *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvieron halos de inhibición de 6 mm (diámetro del disco) de diámetro a concentraciones del 25, 50 y 100 %; que de acuerdo a la prueba estadística T - Student se evidenció diferencias significativas de $p < 0,05$. Por lo que se concluyó, que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” tiene actividad antibacteriana in vitro frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, pero no frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Thymus vulgaris* “tomillo”.

ABSTRACT

The main objective of this research was to determine the in vitro antibacterial activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* “thyme” against the strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The samples were thyme essential oil and bacterial strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39327 that were provided by the Regional Hospital of Cajamarca. The technique consisted in making dilutions of thyme essential oil at 25, 50 and 100 % in 70° ethyl alcohol; proceeding to reactivate the bacterial strains in Trypticase Soya Broth and using Agar Müller Hinton for the antibiogram, following the Kirby - Bauer method. The results showed that thyme essential oil reached inhibition zones with an average diameter of 11,6 mm at 25 %, 17,6 mm at 50 % and 22 mm at 100 % against *Staphylococcus aureus*; whereas, for *Pseudomonas aeruginosa*, 6 mm inhibition rings (diameter of the disc) were obtained in diameter at concentrations of 25, 50 and 100 %; that, according to the T - Student statistical test, significant differences of $p < 0,05$ were observed. Therefore, it was concluded that the essential oil of *Thymus vulgaris* “thyme” has antibacterial activity in vitro against strains of *Staphylococcus aureus*, but not against *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: Antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Thymus vulgaris* “thyme”.

ÍNDICE

PRESENTACIÓN	iv
JURADO EVALUADOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE TABLAS	xiii
LISTA DE GRÁFICOS	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes teóricos de la investigación	5
2.2. Bases teóricas	7
2.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
2.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.2.3. <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo”	16
III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	20
3.1. Unidad de análisis, universo y muestra	20
3.2. Métodos de investigación	22
3.3. Técnicas de investigación	23

3.4. Instrumentos, equipos, materiales y reactivos	28
3.5. Técnicas de análisis de datos	29
3.6. Aspectos éticos de la investigación	29
IV. RESULTADOS	31
V. DISCUSIÓN	35
VI. CONCLUSIONES	40
VII. RECOMENDACIONES	41
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	49

LISTA DE TABLAS

TABLA N° 01: Diámetro del halo de inhibición antibacteriano del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
TABLA N° 02: Diámetro del halo de inhibición antibacteriano del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
TABLA N° 03: Halo de inhibición promedio antibacteriano del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
TABLA N° 04: Resultados de la prueba estadística T-Student de los halos de inhibición promedio antibacteriano del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 01: Diámetro del halo de inhibición antibacteriano del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
GRÁFICO N° 02: Diámetro del halo de inhibición antibacteriano del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
GRÁFICO N° 03: Halo de inhibición promedio antibacteriano del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones comunitarias siguen constituyendo hoy en día una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial; si bien es cierto, los antibióticos y mejores condiciones han permitido mejorar la esperanza de vida en muchas regiones del mundo; a la fecha, la gran mayoría de ellas sigue padeciendo problemas infecciosos como enfermedades diarreicas y respiratorias agudas, entre otras. Con el descubrimiento de los antibióticos, a comienzos del siglo XX, se dio un gran avance de la ciencia; sin embargo, por el uso irracional de los mismos, las bacterias comenzaron a adaptarse y a hacerse resistentes a los tratamientos.^{5,32}

Hoy, varios tipos de bacterianas patógenas son inmunes y sobreviven al tratamiento de los antibióticos administrados, desencadenando distintos mecanismos de resistencia bacteriana, como: expulsión de los antibióticos y no dejarlos unirse al sitio de acción, modificar la acción enzimática del antibiótico, modificar cambios en la permeabilidad de la membrana externa y alterar el sitio de acción donde actúa el antibiótico con la bacteria.^{11,15}

Otro problema que se presentó y se presenta con el uso de antibióticos e las reacciones adversas entre leves a severas y la existencia cada vez de diferentes tipos de bacterianas multirresistentes a diferentes antibióticos. Las bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Pseudomonas aeruginosa*, fueron algunas de las primeras bacterias en presentar resistencia, seguidas de las

Gram positivas, como *Streptococcus* y *Staphylococcus*, pues en los últimos años se ha encontrado que la proporción de aislamientos de *Staphylococcus aureus* *meticilinoresistente* (SAMR) he ha incrementado de 0 a 70 % en Japón y Corea, 40 % en Bélgica, 30 % en Gran Bretaña y 28 % en Estados Unidos, en solo 10 a 15 años.^{17,32}

En nuestro país se han detectado en diferentes hospitales y clínicas privadas, mas o menos un 50% de cepas se *Staphylococcus aureus* *meticilinoresistentes*, siendo el presupuesto de gasto en salud en promedio de 35 % ocasionado por la creciente resistencia a los antibióticos y el uso irracional que se les da en los centros de atención al paciente; además, esto se incrementa por la facilidad de adquirir antibióticos sin prescripción médica y la venta de dudosa procedencia.^{11,11}

Frente a este problema se optó por investigar a las plantas medicinales, especies que se han estudiado como posibles fuentes antimicrobianas, pues se reconoce que entre los principios activos que contienen muchas plantas medicinales, se encuentran a los compuestos fenólicos, flavonoides, aceites esenciales, taninos, esteroides, entre otros. Tal es el caso del tomillo, especie que contiene aceites esenciales entre el 0,7 y 0,9 %, lo que equivale a un litro de aceite esencial por cada 12 ó 13 arrobas de tomillo verde; obteniéndose por destilación (tradicionalmente al vapor de agua) de las inflorescencias, hojas y partes muy tiernas de los tallos de tomillo. El aceite de tomillo presenta una coloración entre rojo anaranjado y amarillento, viscosidad parecida a la del aceite de oliva, es neutro y de olor herbáceo, penetrante y agradable. Es un producto volátil y de

sabor ardiente; ya que entre los componentes fenólicos del aceite de tomillo se encuentran el timol en porcentajes que oscila entre 40 y 80 % y el carvacrol en un 50 %, que es un isómero del anterior. El aceite esencial del tomillo tiene varias propiedades, siendo las más resaltantes, las propiedades vermícidas y bactericidas.^{1,17}

En tal sentido la presente investigación, buscó determinar la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, con el propósito de dejar a disposición a la población en general, una alternativa terapéutica natural antibacteriana, a fin de ser utilizada para el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas producidas por estas bacterias; siendo esta especie vegetal, de fácil acceso y de bajo costo.

Por lo antes expuesto, se formuló el siguiente problema de investigación:

¿Tendrá actividad antibacteriana in vitro el aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*?

Por lo que, se planteó los siguientes objetivos:

- **Objetivo general:**

- Determinar la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

- **Objetivos específicos:**

- Determinar la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Determinar la actividad antibacteriana in vitro del a aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Establecer en cuál de las dos cepas, el aceite esencial al 25 %, 50 % y 100 % de *Thymus vulgaris* “tomillo” tendrá la mayor actividad antibacteriana in vitro.

Con el fin de dar respuesta a los objetivos planteados, se formuló la siguiente hipótesis:

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” tiene actividad antibacteriana in vitro frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes teóricos de la investigación

Montero M et al (2018)²⁷ mostraron que las concentraciones del 5 y 10 % del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” diluido en etanol al 96,8 % lograron alcanzar halos de inhibición promedio de 15,35 mm y 15,9 mm de diámetro respectivamente; que comparado con la concentración del 1 % que sólo alcanzó 12,2 mm de diámetro.

Por su lado, **Morales A (2015)**²⁸ evaluó al aceite esencial del tomillo como un aditivo alimentario, pues la finalidad fue obtener un efecto antimicrobiano prolongando en el queso Ricotta. Para ello se pudo obtener el aceite esencial a través de destilación por arrastre de vapor, obteniendo un rendimiento de 0,6 %, cuyo componente mayoritario fue el timol en un 30,97 %. En los resultados se evidenció que el aceite esencial de tomillo presentó actividad antibacteriana en concentraciones no menores del 1,6 %, mostrando halos de inhibición de 11,67 mm. El queso Ricotta, al que se agregó aceite esencial de tomillo, presentó características fisicoquímicas propias de un queso firme, semiduro y descremado; mientras que, el recuento de *Listeria monocytogenes* disminuyó después de 28 días de $1,5 \times 10^6$ UFC/g a 5000 UFC/g.

Por otra parte, **Coy C y Acosta E (2013)**¹⁰ determinaron la composición química de los aceites esenciales de romero, tomillo y cúrcuma, así como

también la actividad antibacteriana de cada uno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028. Sus resultados por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa mostraron que los componentes mayoritarios fueron: para el romero, piperitona (21,9 %), α -pineno (14,9 %) y linalol (14,9 %); para el tomillo, 1,8-cineol (21,5 %) y α -cimeno (17,9 %); y, para la cúrcuma, turmerona (36,9 %), α -turmerona (18,9 %) y β -turmerona (13,6 %). Además, se determinó que dichos aceites esenciales mostraron su actividad antibacteriana in vitro frente a cepas Gram positivas y Gram negativas, siendo la cepa de *Staphylococcus aureus*, la que resultó ser el microorganismo más sensible.

Asimismo, Solís P (2011)³³ evaluó el “Efecto antibacteriano de los aceites esenciales de orégano y tomillo como conservantes naturales”, el propósito fue reducir la carga microbiana durante el almacenamiento de la pechuga de pollo, siendo los microorganismos ensayados *Salmonella spp* y microorganismos proteolíticos; aplicándose la concentración mínima bactericida in vivo y tiempo de muerte in vitro e in situ. La concentración mínima bactericida frente a *Salmonella spp* fue de 1,56 % in vitro, el tratamiento más efectivo frente *Salmonella spp* fue obtenido con el aceite esencial de tomillo; mientras que el aceite esencial de orégano presentó una inhibición mínima. Los resultados in situ mostraron que el aceite esencial de tomillo en el almacenamiento de pechuga de pollo a temperatura de refrigeración de 4 °C, hasta 48 horas, fue el tratamiento mas efectivo para

reducir la contaminación bacteriana y la pérdida de las características de la calidad de la carne, logrando dar un producto de mejor calidad y libre de contaminación bacteriana.

Del mismo modo, **Estrada S (2010)**¹⁶ determinó la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Sus resultados mostraron actividad antibacteriana para ambos extractos, destacándose mayor actividad en la mezcla de los extractos hexánicos a concentraciones de 1000 y 10000 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*, gracias sus compuestos fenólicos como el timol, carvacrol y cineol.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es bacteria Gram positiva anaerobia productora de coagulasa y catalasa. Se encuentra distribuida en por todo el mundo, por lo que una de cada tres pacientes se encuentra colonizadas, pero no infectadas por este tipo de bacteria. Esta bacteria fue descubierta por primera vez en 1880, en la ciudad de Aberdeen Escocia, por el Médico Cirujano Alexander Ogston en un absceso infectado.^{14,22}

Staphylococcus aureus puede estar involucrado en varias enfermedades que van desde infecciones cutáneas y mucosas que generalmente son benignas, tales como: conjuntivitis, foliculitis; así como otras enfermedades mas complicadas como celulitis, abscesos infectados, meningitis, sepsis, endocarditis, neumonía, entre otras. Además, también infecta al tracto gastrointestinal, ya sea por encontrarse presente la bacteria o por la ingesta de la endotoxina estafilocócica.^{22,24} meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica.^{22,24}

a) Clasificación taxonómica^{14,24}

Reino	: Bacteria
Filo	: Firmicutes.
Clase	: Cocci
Orden	: Bacillales
Familia	: Staphylococaceae
Género	: <i>Staphylococcus</i>
Especie	: <i>Staphylococcus aureus</i> (Rosenbach 1884)

b) Morfología

El *Staphylococcus aureus* es un coco inmóvil Gram positivo, que mide de 0,8 a 1 micra de diámetro, que se divide en tres planos para

formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. Unas pocas cepas producen una cápsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo.^{15,24}

c) **Patogenia**

Esta bacteria es patógena que actúa como saprófito, pues se encuentra formando parte de la flora bacteriana del individuo sano, pero en ocasiones cuando las defensas disminuyen pueden llegar a colonizar y producir una infección ocasionando una enfermedad. La mayoría de pacientes que adquieren infección por *Staphylococcus aureus* son pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos, pues en su mayoría este tipo de bacteria infecta la piel y tejidos blandos, produce neumonía, sialoadenitis, sepsis con o sin metástasis (osteítis, endocarditis, abscesos colonizados), enfermedades por toxinas (síndrome de piel escaldada por estafilococo y gastroenteritis).^{14,26}

Otra característica de este tipo de bacteria es la resistencia a través de una betalactamasa inducible que le confiere la resistencia ante los betalactámicos como las penicilinas, cuya resistencia esta codificada

por un plásmido presente en más del 90 % de las cepas. Otra de las cualidades es la resistencia al óxido nítrico, capacidad que los distingue de otras bacterias, incluyendo a *Staphylococcus epidermitis* y *Staphylococcus saprophyticus*, observación que se logró observar en especies resistentes a la meticilina como en las que son susceptibles al antibiótico, así como en cepas presentes en hospitales y las demás adquiridas en la comunidad.^{22,26}

La variabilidad de *Staphylococcus aureus*, es la rápida respuesta adaptativa frente a cambios del medio, y su continua adquisición de determinantes de resistencia antibiótica, han hecho de éste un residente habitual del hábitat hospitalario, donde origina problemas de multirresistencia, ocasionalmente importantes. Aunque el término resistencia a meticilina incluye resistencia a derivados β -lactámicos, las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) presentan, en general, resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos. A través de diversos mecanismos, presentan resistencia al cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, aminoglucósidos e incluso, quinolonas, describiéndose cada vez con mayor frecuencia brotes de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina y sensibles sólo a los glucopéptidos.^{14,15}

d) Epidemiología

La epidemiología de las infecciones por *Staphylococcus aureus* está relacionadas con la emergencia de SARM, donde actualmente es responsable del 80% de las infecciones de piel y tejidos blandos. Según datos Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) la incidencia de infecciones invasivas por SARM-AC en el 2007 fue del 7 %. Esta incidencia es mayor que la combinada por neumococo, estreptococo del grupo A y meningococo.^{14,24}

e) Tratamiento

Esta bacteria produce la enzima beta-lactamasa, pero hay que tomar en cuenta que está logrando un alto grado de tolerancia contra penicilinas resistentes a beta-lactamasa como la oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina o metecilina *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina (SARM). Estos *Staphylococcus* resistentes a meticilina son muy peligrosos ya que provocan multitud de infecciones nosocomiales (contraídas en el hospital) y son multiresistentes a gran cantidad de antibióticos; el siguiente tratamiento usado fue vancomicina, pero incluso a éste también han desarrollado resistencia. Ahora se usan otros antibióticos con poca resistencia como levofloxacino o daptomicina.^{8,21}

Vancomicina (es el antibiótico de elección en caso de resistencia a la cloxacilina), cotrimoxazol, cefalosporina, amoxicilina asociada a

ácido clavulánico, imipenem, clindamicina, ciprofloxacino o un aminoglucósido. Es interesante la actividad de la fosfocina en tratamiento de pacientes nosocomiales alérgicos a los beta-lactámicos. Actualmente se estudia el tratamiento mediante bacteriófagos (virus capaces de eliminar a estas bacterias) para prevenir o curar infecciones, tanto localizadas como sistémicas. Tanto el cobre como los ácidos oleicos, este último contenido en el aceite de oliva resultan veneno para el *Staphylococcus aureus*, además en la actualidad se experimenta con fenoles de los cuales estos no son resistentes.^{8,21}

2.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Es una bacteria anaerobia Gram negativa, que presenta motilidad unipolar, gracias a que presenta su flagelo, siendo un microorganismo oportunista en el hombre. Como otras *Pseudomonas*, *Pseudomonas aeruginosa* secreta una variedad de pigmentos como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) y piorrubina (rojo pardo). Esta bacteria se identifica por su apariencia perlada y de olor a uvas in vitro, la identificación bioquímica de *Pseudomonas aeruginosa* frecuentemente incluye, tanto la producción de piocianina y fluoresceína como determinar la habilidad de crecer a 42 °C, ya que es capaz de crecer en combustibles derivados del petróleo. Este microorganismo es capaz de nutrirse a partir de hidrocarburos,

causando estragos de corrosión microbiana y creando una gelatina oscura que a veces se confunde como si fuera alga.^{5,6}

a) Clasificación taxonómica⁶

Reino	: Bacteria.
Filo	: Proteobacteria.
Clase	: Gammaproteobacteria.
Orden	: Pseudomonadales.
Familia	: Pseudomonadaceae.
Género	: <i>Pseudomonas</i> .
Especie	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter 1872 y Migula 1894)

b) Patogénesis

En su gran mayoría, las infecciones ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa* están relacionadas al ambiente hospitalario, constituyendo un grave problema clínico. Este patógeno oportunista de individuos inmunocomprometidos, infecta los pulmones y las vías respiratorias, las vías urinarias, los tejidos (heridas), y también causa otras sepsis (infecciones generalizadas en el organismo), puede causar neumonías, lo que en ocasiones precisa ayuda mecánica para superar dichas neumonías, siendo uno de los microorganismos más frecuentes aislados en muchos estudios. La piocianina es un factor de virulencia de la bacteria y se ha conocido que puede hasta causar

muerte por estrés oxidativo; sin embargo, el ácido salicílico puede inhibir la producción de piocianina. La fibrosis quística está también predispuesta a la infección con *Pseudomonas aeruginosa* de los pulmones. Además, produce también de dermatitis y está involucrado en foliculitis de tinas de agua caliente, en especial aquellas sin un control higiénico continuo.^{5,17}

c) Resistencia antibiótica

La habilidad de *Pseudomonas aeruginosa* para resistir su destrucción por varios antibióticos es muy conocida. Los mecanismos intrínsecos de resistencia de esta bacteria explican gran parte de la resistencia cruzada a diferentes clases de antibióticos. Un mismo evento de transferencia de genes puede explicar la aparición de fenotipos resistentes a múltiples antibióticos. Posee sistemas específicos de degradación enzimática, principalmente de beta-lactamasas. Todas las especies de esta bacteria son capaces de producir beta-lactamasas cromosomales, las cuales tienen actividad de cefalosporinas y son inducibles al exponerse a los antibióticos beta-lactámicos. *Pseudomonas aeruginosa* es el primer agente causal de neumonía nosocomial. La mortalidad de ésta es aproximadamente de 40 - 50 %, existiendo un incremento en la prevalencia de neumonía en la comunidad, en especial en pacientes con una lesión estructural previa de la vía aérea (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística o bronquiectasias). El conocimiento de la epidemiología de esta bacteria en los servicios de hospitalización

puede favorecer un mejor control de las infecciones por dicho agente ya que es fundamental identificar igualmente el patrón de resistencia antimicrobiana que prevalece, para así propiciar el control de infecciones nosocomiales.^{15,17}

d) Tratamiento

Pseudomonas aeruginosa se puede aislar con frecuencia de sitios no estériles como la boca y el esputo, entre otros, y en esas circunstancias suele representar una colonización, sin infección. El aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* de especímenes no estériles debería interpretarse con cautela y el aviso del microbiólogo o el médico infectólogo deberían corroborarse antes del comienzo del tratamiento. Cuando *Pseudomonas aeruginosa* se aísla de sitios estériles (sangre, hueso, colecciones profundas) debe tomarse con mucha seriedad y en la mayor parte de los casos requiere tratamiento rápido. *Pseudomonas aeruginosa* es naturalmente resistente a una gran cantidad de diferentes familias de antibióticos. Es indispensable usarlos con una guía de tratamiento acorde con los resultados de antibiogramas (sensibilidad de la especie de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes potentes antibióticos), más que a elegir determinado antibiótico empíricamente. Si se comienza con un antibiótico genérico empíricamente, hay que realizar lo adecuado para obtener cultivos y elegir el mejor de los resultados bioquímicos, revisando el elegido.^{6,8}

Los antibióticos que han mostrado actividad contra *Pseudomonas aeruginosa* incluyen: aminoglicósidos (gentamicina, amikacina y tobramicina), quinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino y moxifloxacino), cefalosporinas (ceftazidima, cefoperazona, cefepima, cefpiroma, cefuroxima, ceftriaxona y cefotaxima) y ureidopenicilinas (piperacilina, ticarcilina, carbenicilina). *Pseudomonas aeruginosa* es intrínsecamente resistente a todas las otras penicilinas), carbapenem (meropenem, imipenem), polimixinas (polimixina B, colistina) y monobactams (aztreonam).^{8,21}

2.2.3. *Thymus vulgaris* “tomillo”

El tomillo pertenece a la familia de las Lamiaceae, posee cerca de 215 especies, siendo el género *Thymus* uno de los más importantes. Es una planta aromática utilizada con fines medicinales y como condimento, destacándose por su aroma, así como por sus aceites esenciales volátiles que se evaporan produciendo una fragancia intensa. El tomillo es una planta perenne, que puede alcanzar hasta 50 cm de altura, clasificada como arbusto o subarbusto, o a veces como herbácea, pero leñosa en la base, tiene tallo erecto o postrado, de hojas simples, enteras o en algunos casos lanceoladas, en el extremo de las ramas las flores se agrupan en una forma de cabezuelas y tiene cáliz de color rojizo vinoso de una sola pieza.^{2,3,4}

a) Clasificación taxonómica^{7,28}

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

b) Composición química

En su composición química destacan el aceite esencial y los flavonoides. También tienen otros componentes como: ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico (ácido caféico, clorogénico y rosmarínico), triterpenos (ácido ursólico y oleanólico), saponinas, taninos y un principio amargo (serpilina).^{13,30}

- **Aceite esencial** (0,8 - 2,5 %): Presenta fundamentalmente timol (40 %), p- cimeno (15 – 50 %), alcanfor (11 – 16 %), carvacrol (2,5 – 14,6 %), linalol (4 %), 1,8- cineol (3 %), γ - terpineno (1 – 5 %), borneol, acetato de bornilo, acetato de linalino, geraniol, α y β - pineno y limoneno.^{25,31,33}

- **Flavonoides:** Principalmente heterósidos del luteol y apigenol, y en menor medida flavonas metoxiladas: cosmosiína, timonina, isotiminina, timusina, naringenina. También se ha señalado la presencia de flavanonas, flavonoles y heterósidos de luteolina.^{18,23,27}

c) Propiedades

El tomillo tiene propiedades terapéuticas, como: digestivo (cólicos, diarrea, dispepsia y flatulencia), estimulante del apetito, antiparasitario, antihistamínico, antimicrobiano, antiséptico, cicatrizante, antiespasmódico, carminativo, expectorante, mucolítico y diaforético.^{3,16}

Aún cuando no se descubrían los antibióticos, el timol era considerado como un desinfectante. En la actualidad se sabe que la propiedad antimicrobiana que tiene el tomillo se debe principalmente al aceite esencial y en especial al timol y carvacrol, que son compuestos fenólicos con similares estructuras químicas, con la única diferencia en la posición del grupo hidroxilo y siendo la presencia y la localización de este grupo de mucha importancia para dicha actividad. Los componentes fenólicos, como el timol y carvacrol, tienen efecto antibacteriano; además de tener actividad antivírica y efecto antimicótico contra *Candida albicans*.^{9,20}

El timol y el carvacrol componentes del aceite esencial presente en el tomillo, se emplean en la industria alimenticia como antibacterianos; estos aceites han mostrado un efecto frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas, con resultados similares a los dados por los antibióticos y al compararlos con el efecto del ácido láctico sobre *Listeria monocytogenes* se ha encontrado una inhibición superior al 50 % por parte de ambos aceites. Han demostrado también mayor efecto terapéutico comparativamente con el resto de los componentes del aceite esencial, puesto que las hojas de tomillo son eficaces in vitro frente a *Staphylococcus aureus* y *Helicobacter pylori*, así como su propiedad inhibitoria frente a *Listeria monocytogenes*.^{18,30}

Se ha comprobado que tanto el extracto acuoso como el acetónico de tomillo tienen actividad antibacteriana in vitro contra las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Dentro de otras propiedades medicinales que contiene esta especie; están, la acción espasmolítica, la capacidad de inhibir la disponibilidad del calcio, bloqueando de esta manera la conducción nerviosa. Por su actividad antiséptica, el tomillo también tiene interés como antibacteriano de la cavidad orofaríngea, así como para la desinfección de heridas.^{3,10}

III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Unidad de análisis, universo y muestra

3.1.1. Unidad de análisis

Aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo”.

3.1.2. Universo

Hojas de *Thymus vulgaris* “tomillo”.

3.1.3. Muestra

- Aceite esencial obtenido de 7 kg de hojas de *Thymus vulgaris* “tomillo”,
- Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39327.

a) *Thymus vulgaris* “tomillo”

Criterios de inclusión:

- Hojas frescas de *Thymus vulgaris* “tomillo”, que no fueron maltratadas durante el transporte.
- Hojas de tomillo que no fueron afectadas por algún microorganismo como hongos o bacterias.
- Hojas de tomillo que mostraron buenas características organolépticas, como color, olor, etc.

Criterios de exclusión:

- Hojas de *Thymus vulgaris* “tomillo” que estuvieron marchitas o secas.
- Hojas de tomillo que fueron afectadas por algún microorganismo como hongos o bacterias.
- Hojas de tomillo que mostraron malas características organolépticas.

b) Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39327

Criterios de inclusión:

- Cepas estándares de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39327.
- Cepas que no mostraron contaminación microbiológica con algunas otras bacterias u hongos.

Criterios de exclusión:

- Cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* que no fueron plenamente identificadas.
- Cepas que mostraron contaminación microbiológica con algunas otras bacterias u hongos.

3.2. Métodos de investigación

3.2.1. De acuerdo al fin que se persigue:

El trabajo de investigación de acuerdo al fin que se persigue fue de tipo básica, ya que la finalidad fue buscar información ya existente, resumirlo lo más importante y plantear nuevas teorías, pues fue importante conocer las teóricas anteriores para así poder generar nuevos postulados.¹⁹

3.2.2. De acuerdo al objeto de estudio:

El presente trabajo de investigación de acuerdo al objeto de estudio fue tipo explicativa, pues se encaminó a responder las fenómenos físicos, sociales y químicos, los eventos y causas que se interpusieron durante la realización de dicho trabajo. Se hizo lo posible de dar a conocer el porque ocurre un fenómeno y en qué condiciones se manifiesta.¹⁹

3.2.3. De acuerdo a la técnica de contrastación:

El trabajo de investigación de acuerdo a la técnica de contrastación fue experimental, en este trabajo se manipularon variables y se siguió una metodología, pues la finalidad fue dar a conocer sí el aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” tiene o no actividad antibacteriana in vitro frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁹

3.3. Técnicas de investigación

3.3.1. Recolección y selección de la especie vegetal:

- Para la recolección de la especie vegetal se viajó al caserío de Porcón Alto.
- Luego se comunicó a los habitantes de esa zona, sobre el motivo de la visita y los objetivos del trabajo de investigación.
- Posteriormente se identificó la especie vegetal, en compañía de los habitantes de esa zona.
- En seguida se procedió a recolectar la especie vegetal, en este caso hojas verdes y frescas de tomillo, haciendo uso de tijeras y guantes de látex.
- Una vez recolectada la especie vegetal se empacó, en bolsas de plástico.
- Luego se trasladaron a la ciudad de Cajamarca y posteriormente al Laboratorio de Biología de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo.
- En el Laboratorio de Biología, se seleccionaron todas las hojas teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión.
- Luego se dejó secar por un corto tiempo, para eliminar el agua superficial impregnada.

3.3.2. Obtención del aceite esencial:

Método de destilación por arrastre de vapor mediante caldera de acero inoxidable¹²

- Primero se colocó agua destilada en el recipiente del tanque generador de vapor y en el otro se colocó la muestra (7 kg de hojas frescas de la especie de *Thymus vulgaris* “tomillo”), además del refrigerante y un beaker donde se recibió el destilado.
- Posteriormente se acoplaron los tres componentes del equipo, dejando correr el agua por el refrigerante.
- Se procedió a extraer el aceite esencial, por un tiempo de 4 horas aproximadamente. Tiempo en el cual se obtuvo el aceite esencial destilado.
- Luego se purificó totalmente, colocándolo en un embudo de separación o decantación, separando el aceite esencial destilado de la mayor parte de la fracción acuosa.
- Paso seguido, al aceite sobrenadante se agregó 5 mL de acetato de etilo para facilitar la separación.
- La fase acuosa se desechó y al aceite esencial se colectó en un matraz Erlenmeyer y se agregó la cantidad necesaria de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua remanente, luego se colocó en un vaso de precipitación.
- Finalmente se envasó el aceite esencial en un frasco de color ámbar, previa rotulación.

3.3.3. Obtención de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39327, fueron obtenidas del Laboratorio de Análisis Clínico del Hospital Regional de Cajamarca.

3.3.4. Preparación de los medios de cultivo

Preparación del Caldo Tripticasa de Soya:

- Se pesó 15 g de Caldo Tripticasa de Soya en polvo y se suspendió en medio litro de agua destilada en un balón de fondo plano, colocando enseguida un tapón de algodón en la boca del balón.
- Luego con la ayuda de una cocina eléctrica, se calentó agitando frecuentemente hasta su ebullición y completa disolución.
- Se llevó a esterilizar en autoclave a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 minutos.
- Transcurrido este tiempo se retiró del autoclave y se dejó enfriar hasta una temperatura de 45 °C aproximadamente.
- Una vez obtenida la temperatura adecuada se encendió el mechero (barrera protección y esterilización) y se procedió a servir en tubos de ensayo con tapa rosca.
- Luego se llevaron a incubar a 37 °C por 24 horas.

Preparación del Agar Müller Hinton

- Primero se homogenizó el polvo contenido en el frasco.

- Se pesó 35 g de medio deshidratado Agar Müller Hinton y se suspendió en un litro de agua destilada en un balón de fondo plano, colocando en seguida un tapón de algodón en la boca del balón.
- Con la ayuda de una cocina eléctrica, se calentó agitando frecuentemente hasta su ebullición y completa disolución.
- Se llevó a esterilizar en autoclave a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 minutos.
- Transcurrido este tiempo se retiró del autoclave y se dejó enfriar hasta una temperatura de 45 °C aproximadamente.
- Una vez obtenida la temperatura adecuada se encendió el mechero (barrera protección y esterilización) y se procedió a servir en placas Petri, un volumen de 25 mL por placa Petri.
- Se dejó enfriar hasta su solidificación.
- Finalmente se llevó a incubar a 37 °C por 24 horas.

3.3.5. Antibiograma

Dilución del aceite esencial

- Se hicieron diluciones del aceite esencial a concentraciones de 25 % y 50 % en alcohol etílico de 70° y al 100 % fue aceite esencial puro.

Reactivación de las cepas bacterianas^{11,15}

- Las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39327 se reactivaron en Caldo Tripticasa de Soya.

- Se tomó con el asa de siembra 3 colonias de cada placa de las cepas bacterianas identificadas y estandarizadas.
- Luego se procedió a la siembra en los tubos de ensayo con medio de cultivo Caldo Tripticasa de Soya por el método de punción por estría, usando como medida de protección un mechero encendido.
- Se llevó a incubar por 2 horas a una temperatura de 37 °C.

Preparación del inóculo a la concentración estándar (0,5 Mc. Farland)¹¹

- Se aisló con el asa de siembra las bacterias previamente reactivadas y se suspendió en una porción de caldo Tripticasa Soya, hasta lograr una turbidez comparable al patrón de turbidez 0,5 de la escala de Mc Farland.
- Esta comparación se llevó a cabo visualmente, en la que se evidenció un fondo blanco con líneas negras, correspondiendo a 1×10^8 unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL).

Procedimiento para el antibiograma^{11,15}

- Del inóculo (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39327) se tomó una alícuota de 100 µL y se colocaron en las placas estériles de Agar Müller Hinton.
- Para la distribución uniforme del inóculo, se utilizó la técnica de escobillado, efectuando con un hisopo estéril un barrido en tres direcciones, girando la placa a 90 grados.

- Luego, haciendo uso de una pinza estéril y ejerciendo una ligera presión sobre la superficie del medio de cultivo, se aplicaron a cada placa, tres discos de papel de 6 mm de diámetro embebidos con el aceite esencial de tomillo al 25, 50 y 100 % (tratando de que estos guarden una distancia entre disco de 35 mm de diámetro).
- Después de 10 minutos transcurridos, se llevaron a incubar a 37 °C por 24 horas.
- Finalmente se retiraron de la incubadora y se leyeron los resultados.

3.4. Instrumentos, equipos, materiales y reactivos

Instrumentos:

- Programa estadístico Básico Excel 29013.
- Programa estadístico Software I.B.M. Statistical Package for the Social Sciences (IBM - SPSS) Versión 22,0.

Equipos:

- Autoclave Marca Memmert y Modelo ORL-AE/A 70 L.
- Equipo completo de destilación de acero inoxidable.
- Estufa Marca Med center y Modelo Merck.
- Refrigeradora 4 pies color blanco Modelo TA04Y07EXB0 y Marca General Electric.
- Balanza analítica marca Ohaus y Modelo Explorer.
- Incubadora marca Memmert y Modelo Memmert BM 400.

Materiales: Materiales de vidrio y otros de uso común del Laboratorio de Biología de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo.

Reactivos:

- Caldo Tripticasa de soya marca Merck, Proveedor: Quimelab.
- Agar Müller Hinton marca Merck, Proveedor: Quimelab.
- Acetato de etilo, Laboratorio Merck
- Sulfato de sodio anhidro, Laboratorio CIMATEC S.A.C.
- Agua destilada, Laboratorio B. Braun Medical Perú S.A.
- Alcohol 70° x 1000 mL, Laboratorio Portugal.

3.5. Técnicas de análisis de datos

Los resultados fueron ingresados a la base de datos del Programa Estadístico Software I.B.M. Statistical Package for the Social Sciences (IBM - SPSS) versión 22,0 y para contrastar los resultados se utilizó el análisis estadístico del T - Student; considerándose como base de interpretación, los siguientes valores: $p < 0,05$ como significativo; $p < 0,01$ como medianamente significativo; $p < 0,001$ como muy significativo y $p > 0,05$ como no significativo, considerando un intervalo de confianza de 95 % (IC = 95 %).

3.6. Aspectos éticos de la investigación

La presente investigación se realizó mediante el empleo de una especie vegetal, teniendo en cuenta el cuidado de la biodiversidad; por lo tanto, no requirió de consideraciones que protejan sus derechos. Además, los recursos

naturales son patrimonio del Estado, por lo que se puede aprovechar, sus frutos, semillas, raíces, flores, hojas, ramas y demás partes de la especie vegetal, salvo excepciones que estén protegidas por ley.

De otro parte, el aislamiento de las cepas bacterianas no perjudicó a ningún paciente, puesto que no se saben de qué pacientes fueron aisladas; ya que, dichas cepas bacterianas se obtuvieron por donación del Laboratorio Clínico del Hospital Regional de Cajamarca.

IV. RESULTADOS

TABLA N° 01: Diámetro del halo de inhibición antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*

Concentración del aceite esencial de tomillo (%)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Promedio del halo de inhibición (mm)
	P - 01	P - 02	P - 03	
25	11	10	14	11,6
50	23	15	15	17,6
100	34	16	16	22,0

Fuente: Elaboración propia de las tesis

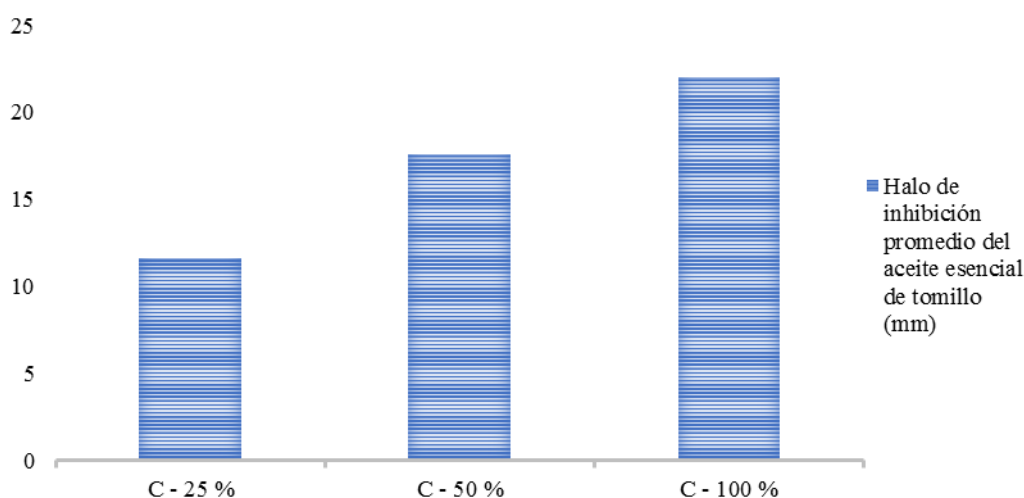


GRÁFICO N° 01: Diámetro del halo de inhibición antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*

Interpretación: En la tabla N° 01 y gráfico N° 01, se muestran los halos de inhibición del aceite esencial de tomillo al 25 %, 50 % y 100 % frente a cepas de *Staphylococcus aureus*; observándose, inhibición antibacteriana directamente proporcional a la concentración.

TABLA N° 02: Diámetro del halo de inhibición antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Concentración del aceite esencial de tomillo (%)	Diámetro del halo de inhibición (mm)			Promedio del halo de inhibición (mm)
	P – 01	P – 02	P – 03	
25	6	6	6	6
50	6	6	6	6
100	6	6	6	6

Fuente: Elaboración propia de las tesis

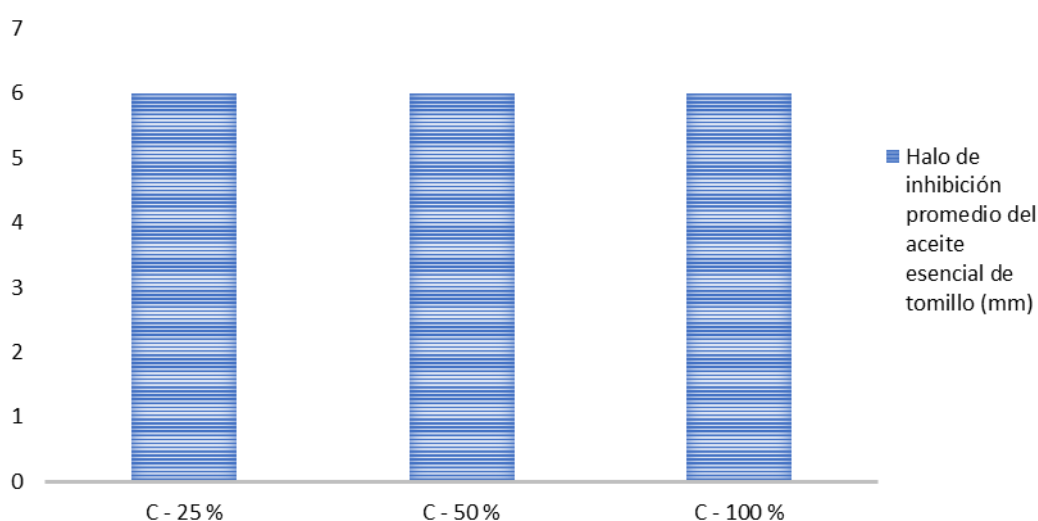


GRÁFICO N° 02: Diámetro del halo de inhibición antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

Interpretación: La tabla N° 02 y gráfico N° 02 se muestran los halos de inhibición del aceite esencial de tomillo al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, observándose que no existió inhibición en ninguna de sus concentraciones, ya que los 6 mm de diámetro reflejan el diámetro del disco de sensibilidad.

TABLA N° 03: Halo de inhibición promedio antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Concentración del aceite esencial se tomillo (%)	Halo de inhibición promedio frente a las cepas bacterianas (mm)	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
25 %	11,6	6
50 %	17,6	6
100 %	22	6

Fuente: Elaboración propia de las tesis

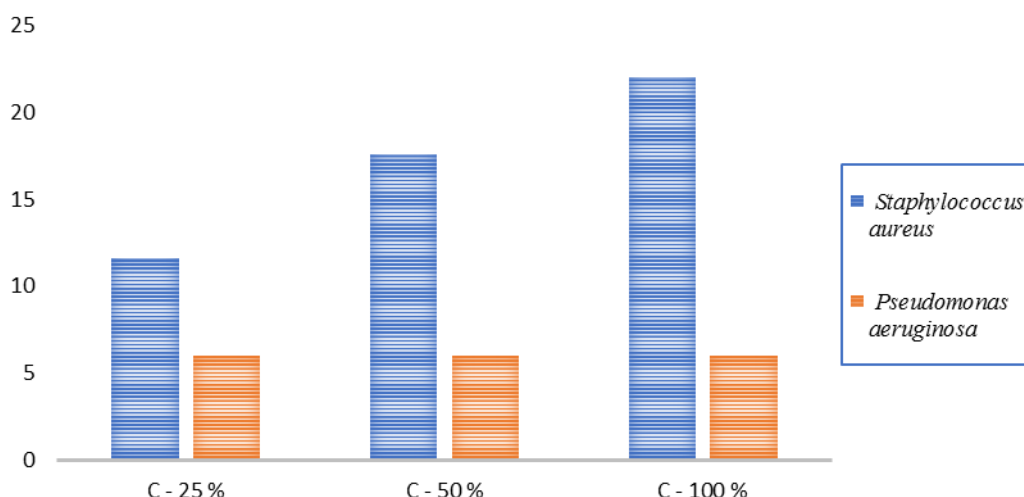


GRÁFICO N° 03: Halo de inhibición promedio antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Interpretación: La tabla N° 03 y gráfico N° 03 muestran los halos de inhibición promedio del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, observándose que no hubo inhibición frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*; mientras que, la inhibición fue evidente frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, obteniéndose mayores resultados a mayores concentraciones.

TABLA N° 04: Resultados de la prueba estadística T-Student de los halos de inhibición promedio antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Concentración del aceite esencial de tomillo (%)	Promedios		T-Student		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Valor	p-value	Decisión
25 %	11,7	6	4,71	0,005	p < 0,05: Hay diferencias significativas ($\mu_1 \neq \mu_2$)
50 %	17,7	6	4,38	0,006	p < 0,05: Hay diferencias significativas ($\mu_1 \neq \mu_2$)
100 %	22,7	6	2,50	0,033	p < 0,05: Hay diferencias significativas ($\mu_1 \neq \mu_2$)

Fuente: Elaboración propia de las tesis

Leyenda: Análisis estadístico del T - Student, valores de: p < 0,05 existe diferencia significativa y p > 0,05 no existe diferencia significativa.

Interpretación: En la tabla N° 04 se muestra el análisis estadístico de la prueba T-Student de los halos de inhibición promedio del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, observándose valores de p < 0,05 en todas las comparaciones realizadas, indicando diferencias significativas.

V. DISCUSIÓN

El Perú cuenta con una variedad de plantas medicinales que fueron y son utilizadas por gran parte de la población, sobre todo por los habitantes de las zonas rurales que hacen uso de dichas especies de manera empírica con el fin de aliviar, prevenir o curar algún problema de salud. Frente a ello y por la gran importancia que tienen las especies medicinales, se optó por desarrollar este trabajo de investigación, cuyo objetivo principal fue determinar la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para ello, se obtuvo el aceite esencial y a la vez se hicieron diluciones en alcohol etílico de 70⁰ al 25 %, 50 % y 100 %.

Para determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* se emplearon discos de sensibilidad embebidos con aceite esencial de tomillo al 25 %, 50 % y 100 %, los cuales fueron impregnados sobre placas sembradas con *Staphylococcus aureus*, incubándose a 37 °C durante 24 horas; observándose halos de inhibición promedio de 11,6 mm de diámetro para la dilución del aceite esencial al 25 %, 17,6 mm al 50 % y 22,0 mm al 100 % (tabla N° 01 y gráfico N° 01). Por lo tanto, se puede decir que el aceite esencial de tomillo tiene actividad antibacteriana in vitro frente a las cepas *Staphylococcus aureus*, incrementando dicha actividad conforme aumenta la concentración; tal y como lo confirma el estudio que realizaron Montero M et al (2018)²⁷ sobre la

“Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*”, en la que obtuvieron halos de inhibición promedio de 12,2; 15,35 y 15,9 mm de diámetro a concentraciones del 1 %, 5 % y 10 % respectivamente. Del mismo modo, Estrada S (2010)¹⁶ también realizó otro estudio titulado “Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinales*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y otras cepas bacterianas”, dando a conocer que la combinación de los extractos de romero y tomillo presentaron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y otro tipo de bacterias; confirmándose con estos estudios, la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de tomillo frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*.

Se realizó el mismo procedimiento para las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, observándose como promedio halos de inhibición de 6 mm de diámetro a las concentraciones de 25, 50 y 100 % (tabal N° 02 y gráfico N° 02); por lo que se puede decir, que el aceite esencial de tomillo no presentó actividad antibacteriana in vitro frente a ésta cepa bacteriana, ya que los 6 mm de diámetro reflejan el diámetro de los discos de sensibilidad en blanco. Este resultado negativo, se deba posiblemente a que los principios activos del aceite esencial de tomillo como el carvacrol y timol no tienen ninguna actividad antibacteriana frente a este tipo de bacteria, no logrando atravesar al polisacárido de la cual está compuesta la membrana de las bacterias Gram negativas por ningún mecanismo de acción y por ende logran una resistencia antibacteriana.

Si bien es cierto, al realizar un cuadro comparativo sobre el diámetro de los halos de inhibición promedio del aceite esencial de tomillo al 25 %, 50 % y 100 % frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, se observó que dicho aceite no logró ninguna inhibición in vitro frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*; en cambio frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* mostró inhibición en todas sus concentraciones ensayadas (tabla N° 03 y gráfico N° 03), mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$) en el análisis estadístico del T- Student (tabla N° 04). Dicha actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de tomillo frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, estaría relacionada con los componentes como el, timol (2-metil-5-(1-metiletil)-fenol) y carvacrol (2-isopropil-5-metilfenol), componentes fenólicos, con estructuras químicas similares que difieren en la posición del grupo hidroxilo, siendo la presencia y localización de este grupo hidroxilo un factor de mucha importancia sobre dicha actividad. El mecanismo de acción de dichos compuestos estaría ligado a inhibir la síntesis de la pared y membrana celular e interferir también en la en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, tal y como afirma el estudio de García M y Palou E (2008)¹⁸ titulado “Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos”, en la que manifestaron que tanto el carvacrol como timol, tendrían efecto antibacteriano frente a ciertos tipos de bacterias, cuyo mecanismo de acción sería, daño a la membrana citoplasmática, degradación de la pared celular, daño a la síntesis de proteínas, filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma y disminución de la fuerza motriz, ya que una de las características importantes de los componentes de aceite esencial del tomillo sería su hidrofobicidad,

permitiendo la separación de los lípidos de la membrana celular y de la mitocondria, desordenando la estructura y haciéndola más permeable, permitiendo de esta manera la filtración de iones y otros componentes celulares. Asimismo, Coy C y Acosta E (2013)¹⁰ en su estudio “Actividad antibacteriana y determinación de la composición de los aceites de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) en Colombia”, señalan que los componentes mayoritarios del tomillo fueron el 1,8-cineol (21,5 %) y o-cimeno (17,9 %); resultando tener actividad antibacteriana in vitro frente a cepas Gram positivas y Gram negativas, siendo la cepa *Staphylococcus aureus* la que resultó ser el microorganismo más sensible; al igual que el trabajo de investigación de Estrada S (2010)¹⁶, donde se dio a conocer también, que los componentes como el timol, carvacrol y cineol son los responsables de la actividad antibacteriana del aceite esencial frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*. Del mismo modo, Morales A (2015)²⁸ estudió el “Efecto antimicrobiano del aceite esencial del tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta”, mostrando que el componente activo mayoritario del tomillo fue el timol en un 30,97 %, relacionando a éste con la actividad antibacteriana.

Frente a los resultados obtenidos y haciendo un análisis de este trabajo de investigación, se puede decir que se contrastó la hipótesis planteada al 50 %, ya que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” mostró actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*; pero no, frente a *Pseudomonas aeruginosa*; por lo tanto, se deja en evidencia una alternativa terapéutica natural, a

fin de ser utilizada para infección producida por *Staphylococcus aureus*, siempre y cuando esté supervisada por un profesional de salud.

VI. CONCLUSIONES

- Se determinó que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” tiene actividad antibacteriana in vitro frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; pero no, frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39327.
- El aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % mostró tener actividad antibacteriana in vitro frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, alcanzando halos de inhibición promedio de 11,6 mm al 25 %, 17,6 mm al 50 % y 22 mm de diámetro al 100 %.
- El aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 25 %, 50 % y 100 % alcanzó halos de inhibición promedio de 6 mm de diámetro, no mostrando actividad antibacteriana in vitro frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39327.
- Se evidenció que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 100 % produjo un halo de inhibición promedio de 22 mm de diámetro, reflejando la mayor actividad antibacteriana in vitro frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; pero, frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 39327, alcanzó sólo 6 mm de diámetro, el cual no reflejó ninguna actividad antibacteriana.

VII. RECOMENDACIONES

1. El aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” posee importante actividad antibacteriana in vitro frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; sin embargo, para su uso se sugiere realizar estudios de acción in vivo y de toxicidad.
2. Se recomienda realizar más estudios sobre la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” frente a las cepas patógenas de *Staphylococcus aureus* con el propósito de formular alguna preparación farmacéutica.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abarca K, García P, Vial P. Microbiología Clínica. Chile: Universidad Católica de Chile; 2001. p. 79 – 115.
2. Álvarez A, Corrales A, Granda M. Plantas medicinales. Cuba: Ciencias Médicas; 2009.
3. Aspurz J. Obtención de curvas de secado de *Thymus vulgaris* “tomillo”. [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniería Agraria y Alimentaria]. Brasil: Universidad Pública de Navarra, Facultad de Ingeniería; 2011.
4. Bandoni A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Argentina: Universidad Nacional de la Plata; 2000. p. 37 - 49.
5. Batlle C, Pérez M, Verdera J, Llop A. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de pacientes con fibrosis quística. Rev Cubana Med Trop. [Revista virtual]. 2006; 58 (3): 75 – 90. [fecha de acceso 10 de junio del 2017]. Disponible en:
http://www.bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol58_3_06/mtr06306.htm
6. Bodi M, Garnacho J. *Pseudomonas aeruginosa* frente a terapia combinada. Med Intensiva. 2007; 31 (2): 83 - 87.

7. Burri A, Piarpuezán O. Evaluación agronómica de tres densidades de siembra en el cultivo de tomillo *Thymus vulgaris* “tomillo” mediante la aplicación de tres fertilizantes orgánicos, con fines de exportación, en la parroquia de Yaruqui, provincia de Pichincha. [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Agrónomo]. Ecuador: Universidad Estatal de Bolívar, Facultad de Ingeniería; 2013.
8. Brunton L, Laso J, Parker K. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11^a ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2007. p. 1052 – 1165.
9. Castillo E, Martínez I. Manual de fitoterapia. Barcelona: Elsevier- Masson; 2007. p. 16 – 28.
10. Coy C, Acosta E. 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. Rev Cubana Plant Med [Revista virtual]. 2013; 18 (2): 237 - 246. [fecha de acceso 03 de octubre del 2018]. Disponible en:
<http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962013000200007>
11. Clavell L, Pedrique M. Microbiología. Manual de Métodos Generales. 2^a ed. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia; 1992.

12. Chang R. Química. 10^a ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2010. p. 120 – 138.
13. De Souza L, Frascolla R, Santin R, Ziemann M, Costa R, Alves M. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. Revista Cubana Plant Med. [Revista virtual]. 2008; 13(4): 20 - 30. [fecha de acceso 02 de julio del 2017]. Disponible en: http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962
14. Dinges M, Orwin P, Schlievert P. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clinical Microbiology Reviews. 2000; 1 (13): 16 - 34.
15. Divo A. Microbiología médica. 4^a ed. México: McGraw Hill Interamericana; 1990. p. 158 - 179.
16. Estrada S. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*)”. [Tesis para optar el Título Profesional de Bioquímico Farmacéutico]. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias; 2010.
17. Gamero A, García F, Rodríguez A, Ibarra M. Sensibilidad y resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. Revista Española de

- Quimioterapia. [Revista virtual]. 2007; 2 (20): 230 - 254. [fecha de acceso 15 de junio del 2017]. Disponible en:
<http://www.dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2443454>
18. García M, Palou E. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. Rev sobre temas selectos de Ingeniería y Alimentos. [Revista virtual]. 2008; 2 (2): 41 -51. [fecha de acceso 06 de julio del 2017]. Disponible en:
[http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5\(1\)-Rosas-Gallo-et-al](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No5-Vol-1/TSIA-5(1)-Rosas-Gallo-et-al)
19. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 5ª ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2010. p. 1 - 23.
20. Herrera F, García R. Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. Revista BISTUA. [Revista Virtual]. 2006; 4 (2): 13 – 19. [fecha de acceso 08 de julio del 2017]. Disponible en:
http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/.../rev_bistua_vol4_num2_art_2.pdf
21. Katzung B. Farmacología Básica y clínica. México: El manual Moderno; 1998. p. 45 – 85.

22. Kraus D, Peschel A. *Staphylococcus aureus* of innate antimicrobial defense. Future Microbiol. 2008; 3 (5): 437 - 451.
23. Lagos R. Determinación de la Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial *Thymus vulgaris* L. “tomillo” frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causante de gingivitis. [Tesis para optar el título Profesional de Químico Farmacéutico]. Perú: Universidad Nacional Jorge Basadre Broman – Tacna, Facultad de Ciencias de la Salud. 2012.
24. Lowy F. Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*. Clin Infect. 2003; 111 (12): 1265 - 1273.
25. Maguna F, Romero A, Garro Oscar, Okulik N. Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. [Tesis Doctoral]. Argentina: Universidad Nacional del Noreste, Facultad de Agroindustrias; 2006.
26. Mazmanian K, Liu G, Ton-That H, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. Science. 1999; 28 (5): 760 - 763.
27. Montero M, Mira C, Avilés D, Pazmiño P, Erazo E. Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*. Rev. investig. vet. [Revista virtual]. 2018; 29 (2): 588 – 593. [Fecha de acceso 13 de octubre del 2018]. Disponible en:

<http://www.revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/articl>

28. Morales A. Efecto Antimicrobiano del aceite esencial del tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta. [Tesis para optar al Grado de Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos]. Colombia: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias; 2015.
29. Olaechea P, Insausti J, Blanco A, Luque P. Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales. Rev Med Intensiva. [Revista virtual]. 2010; 3 (4): 256 - 267. [fecha de acceso 29 de junio del 2017]. Disponible en:
<http://www.cielo.isciii.es/pdf/medinte/v34n4/puestaa2.pdf>
30. Pamplona R. Enciclopedia de las plantas medicinales. 2ª ed. Chile: Safeliz; 2007.p. 37 – 49.
31. Panchi L. 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 [Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista]. Ecuador: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Odontología; 2016.
32. Rodríguez G, Rincón M, Cortés L, Moreno A. *Escherichia coli* causante de diarrea en México, identificada por hibridación en fase sólida colony blot.

Rev Enfermedades Infecciosas y Microbiología. [Revista virtual]. 2001; 2 (1): 116 - 131. [fecha de acceso 28 de junio del 2017]. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036...

33. Solís P. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L. “orégano” y *Thymus vulgaris* L. “tomillo” como potenciales bioconservadores en carne de pollo. [Tesis para optar el Título Profesional de Bioquímico Farmacéutico]. Ecuador: Escuela superior politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias; 2011.

ANEXOS

ANEXO N° 01

GALERÍA DE FOTOS



Fotografía N° 01: Recolección de hojas frescas de tomillo.



Fotografía N° 02: Equipo de extracción del aceite esencial.



Fotografía N° 03: Extracción de las hojas de tomillo para la obtención del aceite esencial.



Fotografía N° 04: Decantación del aceite esencial de tomillo.



Fotografía N° 05: Obtención del aceite esencial de tomillo.



Fotografía N° 06: Preparación de los medios de cultivo.



Fotografía N° 07: Medios de cultivo en la autoclave.



Fotografía N° 08: Sirviendo los medios de cultivo en las placas Petri.



Fotografía N° 09: Placas Petri listas para el antibiograma.



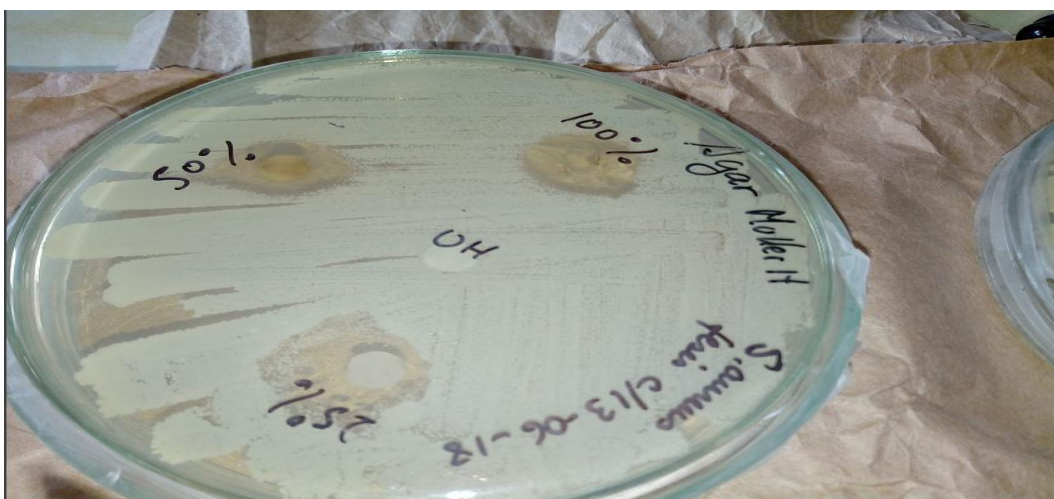
Fotografía N° 10: Antibiograma con los discos de sensibilidad embebidos con el aceite esencial a diferentes concentraciones.



Fotografía N° 11: Inhibición del aceite esencial frente a *Staphylococcus aureus* (placa N° 01)



Fotografía N°12: Inhibición del aceite esencial frente a *Staphylococcus aureus* (Placa N° 02)



Fotografía N° 13: Inhibición del aceite esencial frente a *Staphylococcus aureus* (placa N° 03)



Fotografía n° 14: Efecto del aceite esencial frente a *Pseudomonas aeruginosa* (placa N° 01, 02 y 03).