

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**



**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE  
LOS EXTRACTOS DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*)  
Y TOMILLO (*Thymus vulgaris*)”.**

**TESIS DE GRADO**

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

**PRESENTADO POR**

**SILVIA PAOLA ESTRADA OROZCO.**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2010**

## **CAPÍTULO I**

### **1. MARCO TEÓRICO**

#### **1.1 FITOTERAPIA**

##### **1.1.1 DEFINICIÓN E HISTORIA**

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen. (29) (32)

La fitoterapia es el nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas. A principio de este siglo, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica desembocaron en la puesta en marcha, por parte de la industria farmacéutica, de una nueva producción de medicamentos. Para la fabricación de muchos de ellos utilizaron los principios activos de determinadas plantas medicinales. (28)

No debemos olvidar que los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades. (28) (32) (39)

## **1.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA.**

Comprende una serie de determinaciones para establecer los diferentes tipos de actividad terapéutica de la droga. A partir de los conocimientos ancestrales de las plantas la ciencia comenzaría a investigar las virtudes terapéuticas aprovechables de la plantas, averiguar su composición química y separar sus distintos principios activos. (4) (28)

La actividad biológica de una planta depende en primer lugar del principio o principios activos mayoritarios que contiene, pero éstos suelen estar acompañados de otros principios que potencian o modulan la acción de los primeros; la proporción en la que se encuentran unos de otros es muy variable.

Una vez separados los principios activos y realizadas con éxito las pruebas pertinentes, los científicos aceptan que esa planta puede ser aplicada con finalidad curativa. (4)

## **1.3 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.**

La actividad biocida se define como: “La capacidad que posee un fármaco o compuesto natural de inhibir el crecimiento de microorganismos”. Generalmente los compuestos que poseen dicha actividad vienen a tener un gran interés a nivel mundial, ya que con ellos se puede controlar y hasta eliminar las infecciones provocadas por los microorganismos. (4)

## **1.4 ANTIBIÓTICOS NATURALES.**

Son aquellos remedios procedentes del mundo vegetal que son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos o de eliminarlos. Son aquellos remedios naturales que pueden ser capaces de evitar o curar muchas enfermedades. (9)

Los antibióticos naturales se diferencian de los antibióticos sintéticos, es decir aquellos producidos por síntesis en el laboratorio, en las siguientes características:

- No tienen efectos secundarios: En general, por ejemplo, no producen reacciones alérgicas o sensibilidad en el estómago.
- Son capaces de respetar los microorganismos beneficiosos para el organismo, por ejemplo, aquellos que son necesarios en la flora intestinal.
- No resultan peligrosos por acumulación.
- Son baratos y fáciles de conseguir. (9)

Entre los principales antibióticos naturales tenemos:

Ajo: (*Allium sativum*) Sin duda alguna el mejor bactericida y antiviral natural. Contiene más de 20 componentes con propiedades antivirales y casi 40 componentes antibacterianos (Aliicina, ácido cafeico, ácido ascórbico, ácido clorogénico, quercetina, etc.) Todo ello lo hace ideal para el tratamiento interno de enfermedades respiratorias y del aparato excretor. Usado externamente, sirve para desinfectar y prevenir infecciones en las heridas. (9)

Cebolla: (*Allium cepa*) De la misma familia que el ajo y con una composición similar la cebolla constituye otro antibiótico natural. Rica también en componentes sulfurados, ácidos y flavonoides es uno de los mejores remedios naturales para combatir procesos infecciosos del aparato respiratorio (gripe, bronquitis, faringitis, etc.) Usada externamente, se considera un buen desinfectante. (9)

Equinacea: (*Equinacea angustifolia*) La principal virtud de la equinácea radica en sus propiedades antimicrobianas en contra de bacterias, hongos y virus que la configuran como un auténtica alternativa a los antibióticos químicos. La razón de esta propiedad se debe a su capacidad para estimular el sistema inmunitario, produciendo más glóbulos blancos. (9)

Jengibre: (*Zingiber officinale*) Es su capacidad antibacteriana y su tolerancia por los microorganismos necesarios en la flora intestinal (*Lactobacillus*) la que le permite aumentar la riqueza de esta, eliminando microorganismos perjudiciales, como la *Escherichia coli*, responsable de la mayor parte de las especialmente en los niños, y

muchos casos de gastroenteritis. Su poder antibacteriano es capaz de eliminar el *Helicobacter pylori*, una bacteria, cuyas secreciones de amoniaco con las que se protege de los jugos gástricos son las responsables de la aparición de muchas úlceras. (9)

Tomillo (*Thymus vulgaris*) Son fundamentalmente los ácidos que contiene esta planta los que le proporcionan propiedades antivirales. El tomillo es un fuerte antibacteriano. Usada externamente es un potente desinfectante y ayuda a cicatrizar las heridas. (9)

Romero: (*Rosmarinus officinalis*) El romero contiene más de 40 principios antibacterianos y más de 20 antivíricos. Usado en infusiones puede ayudar a combatir los gérmenes de las enfermedades respiratorias o intestinales. Utilizado como aromatizante en la comida impide al mismo tiempo la proliferación de gérmenes patógenos. (9)

Menta: (*Mentha ssp.*) Las mentas también son muy ricas en principios antibacterianos, especialmente indicadas para prevenir putrefacciones intestinales. (9)

Tila: (*Tilia sp.*) La tila posee propiedades antivirales y antibacterianas capaces de inhibir el crecimiento de virus y bacterias, por lo que resulta muy útil su administración durante los periodos en que el organismo se ve obligado a luchar contra las infecciones. En este sentido se puede considerar esta planta como un buen antibiótico natural. (9)

## **1.5 ROMERO (*Rosmarinus officinalis*)**

### **1.5.1 HISTORIA**

El romero es una de las especies aromáticas que mayor predicamento ha tenido desde tiempos remotos, merced a sus propiedades medicinales, comestibles y aromatizantes.

El romero fue introducido a través de los Alpes por los primeros monjes cristianos, siendo muy popular en los jardines monásticos. Se solía esparcir sobre los cajones y roperos para alejar las polillas. (10) (11) (22)

En la antigua Roma se empleaba para adornar los relicarios de los espíritus protectores del hogar.

En Atenas se solía colocar las ramas de romero sobre las manos de los fallecidos, como símbolo de la inmortalidad del alma. Los jóvenes colocaban ramas entrelazadas en el pelo para estimular la memoria y el resto de actividades mentales. (11)

Por otra parte, el romero se esparcía en las habitaciones de los enfermos como desinfectante aromático. También se lo empleó para decorar las habitaciones en las festividades navideñas. El aceite esencial fue obtenido por destilación por primera vez en 1330 gracias a las investigaciones de Ramón Llull. A partir de entonces fue muy popular como ingrediente en perfumería. Entre 1820 y 1950 estuvo inscripto en la Farmacopea de los Estados Unidos. (22) (27)

### 1.5.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL ROMERO

El romero, es una especie del género *Rosmarinus* cuyo hábitat natural es la región mediterránea, sur de Europa, norte de África y también Asia Menor. En España se halla en la mayor parte de Cataluña, hasta los Pirineos en Aragón y Navarra, Castilla-La Mancha, Castilla-León, La Rioja, Madrid, Murcia, Extremadura, en las zonas montañosas de la Comunidad Valenciana, Andalucía e islas Baleares. Es muy poco frecuente en puntos del norte o noroeste de la península. (10) (40)

Se cría en todo tipo de suelos, preferiblemente los áridos, secos y algo arenosos y permeables, adaptándose muy bien a los suelos pobres. Crece en zonas litorales y de montaña baja (laderas y collados). A más altura, da menor rendimiento en la producción de aceite esencial. Forma parte de los matorrales que se desarrollan en los sitios secos y soleados en las zonas de encinar, zonas degradadas por la tala o quema y laderas pedregosas y erosionadas. Florece dos veces al año, en primavera y en otoño. (10)

Nativa del área mediterránea, el romero es actualmente ampliamente cultivado en otras partes del mundo, aunque se desarrolla preferentemente en un clima cálido y relativamente seco. La planta toma el nombre de *rosmarinus*, un término latino que significa "rocío de mar". (11)

Clasificación científica:

REINO: Plantae

SUBREINO: Tracheobionta

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Lamiales

FAMILIA: Lamiaceae

SUBFAMILIA: Nepetoideae

GÉNERO: Rosmarinus

ESPECIE: *Officinalis*

El romero es un arbusto leñoso de hojas perennes muy ramificado, puede llegar a medir 2 metros de altura. Lo encontramos de color verde todo el año, con tallos jóvenes borrosos (aunque la borra se pierde al crecer) y tallos añosos de color rojizo y con la corteza resquebrajada. (9) (43)

Las hojas, pequeñas y muy abundantes, presentan forma linear. Son opuestas, sésiles, enteras, con los bordes hacia abajo y de un color verde oscuro, mientras que por el envés presentan un color blanquecino y están cubiertas de vellosidad. En la zona de unión de la hoja con el tallo nacen los ramilletes floríferos. (7)

Las flores son de unos 5 mm de largo. Tienen la corola bilabiada de una sola pieza. El color es azul violeta pálido, rosa o blanco, con cáliz verde o algo rojizo, también bilabiado y acampanado. Son flores axilares, muy aromáticas y melíferas (contienen miel), se localizan en la cima de las ramas, tienen dos estambres encorvados soldados a la corola y con un pequeño diente. (7) (43)

El fruto, encerrado en el fondo del cáliz, está formado por cuatro pequeñas nuececitas trasovadas, en tetraquenio, de color parduzco.

Floración: En zonas templadas, prácticamente todo el año. En zonas frías, de finales del invierno a mediados de otoño. (7)



FOTOGRAFÍA No. 1 ROMERO, *Rosmarinus officinalis*.

### 1.5.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA

Terpenoides: carnosol o picrosalvina (diterpeno amargo), ácido oleánico, ácido oleanólico, ácido acetiloleanólico, ácido ursólico y ácido acetilursólico (triterpenos), ácido carnosílico, rosmaridienol, 7-metoxirosmarol,  $\alpha$  y  $\beta$  – amirenoma, etc.

Flavonoides: apigenina, diosmetina, diosmina, hispidulina, luteolina, cirsimarina, nepritina, sinensetina, cupafolina.

Ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico, labiático, neoclorogénico y rosmarínico), colina, taraxasterol, lupeol, campesterol, taninos.

Diterpenos (carnosol, rosmanol, rosmadial)

Ácidos triterpénicos (ácido ursólico) 2 a 4%

Alcoholes triterpénicos (alfa y beta-amirina, betulósido) (41) (48)

Tiene pequeñas cantidades del alcaloide rosmaricina.

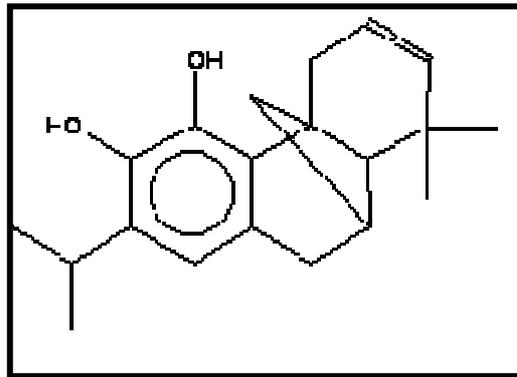


GRÁFICO No. 1 CARNOSOL

Además contiene taninos, azúcares y elementos minerales:

- 1,11% de sodio
- 1,06% de potasio
- 0,63% de calcio
- 0,23% de magnesio
- 17 partes por millón (ppm) de hierro
- 10 ppm de cobre
- 26 ppm de zinc y
- 15 ppm de manganeso.
- Aceite esencial, 1,2 a 2%

El aceite esencial es un aceite intenso, estimulante. Tiene propiedades analgésicas, antisépticas, antidiarreicos, antirreumáticas, antiespasmódicas, astringentes, es un estimulante circulatorio, sudorífico, cicatrizante, hepático y tonificante. En dosis altas puede ser toxico. (1)

2% de aceite esencial, formado principalmente por:

- Derivados terpénicos, carburos como dextro y levopireno.
- Canfeno C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>
- $\alpha$ -Pino
- 1,8 - Cineol C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O, también llamado eucaliptol, 20-32%
- Alcanfor de romero (12%)
- Limoneno
- Borneol C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O (antiséptico, antiespasmódico) 18%

- Acetato de bornilo  $C_{10}H_{17}OOC.CH_3$ , tanino (astringente), un principio amargo, saponina ácida, un glucósido, resina, ácidos orgánicos.

#### 1.5.4.- ACCIÓN FARMACOLÓGICA:

Rica en principios activos que ejercen su acción sobre numerosos órganos como: analgésica, antidiarreico, antirreumática, astringente, sudorífico, cicatrizante, tónico, estimulante, diurético, colagogo, estomacal. (48) (52)

El romero es carminativo, digestivo y antiespasmódico, y tiene propiedades hepatoprotectoras. El efecto favorable que ejerce en la digestión se produce al actuar sobre varios niveles. En primer lugar estimula la producción de jugos gastrointestinales. Además relaja el músculo liso, elimina posibles espasmos y favorece las secreciones.

En cuanto a la actividad antiinflamatoria de los principios activos del romero, se ha comprobado en animales de experimentación que el ácido rosmarínico incrementa la producción de prostaglandinas E2 y reduce la producción de prostaglandina B4 en leucocitos polimorfos nucleares humanos.(7) (48)

También se ha demostrado en ratas que el extracto hidroalcohólico de la planta tienen una actividad anti ulcerosa, efecto que algunos investigadores atribuyen a los componentes antioxidantes que contiene. (7) (50)

También es muy habitual el uso de la tintura de la planta, el extracto fluido o seco y la esencia. Esta última, asociada a otros aceites esenciales, forma parte de diversas especialidades farmacéuticas como linimentos, pomadas o geles para tratar dolores musculares y articulares, así como de preparados inhalatorios para afecciones respiratorias. (50)

La esencia sola se utiliza también para preparar el alcohol de romero, con el que se realizan fricciones en zonas doloridas. Efectos secundarios y contraindicaciones; se considera que el principio activo del romero carece de toxicidad; sin embargo, las

personas especialmente sensibles pueden experimentar reacciones alérgicas, especialmente dermatitis por contacto. (50)

Asimismo, no es recomendable que las personas con cálculos biliares recurran a esta droga sin consultar previamente con un médico. Esto es debido a que cuando existe litiasis biliar, un aumento del drenaje de la vesícula biliar puede ir acompañado de una obstrucción de los conductos biliares. Finalmente, aunque la probabilidad de presentar una intoxicación por el consumo de infusiones de romero es muy baja, una sobredosis podría derivar en un cuadro caracterizado por espasmo abdominal, vómitos, gastroenteritis, hemorragia uterina e irritación renal.

En cuanto al uso del aceite esencial, en concentraciones elevadas puede ser tóxico para el sistema nervioso central y provocar convulsiones. Por este motivo, no se recomienda su uso durante períodos de tiempo prolongados o a dosis mayores a las recomendadas y se debe tener especial cuidado cuando se usa en niños. Por vía tópica, la esencia de romero puede causar dermatitis y eritema en personas hipersensibles. (11)

El romero no debe usarse en el transcurso del embarazo, ya que existe la posibilidad de que induzca un aborto espontáneo por su posible efecto estrogénico.

Tampoco debe emplearse durante la lactancia. Aunque la probabilidad de presentar una intoxicación por el consumo de infusiones de romero es muy baja, una sobredosis podría derivar en un cuadro caracterizado por espasmo abdominal, vómitos, gastroenteritis, hemorragia uterina e irritación renal las dosis diarias recomendadas por vía interna son:

En infusión: 2-4 g de la droga al día. Se prepara echando 150 ml de agua hirviendo a la droga finamente cortada. Se deja infundir 10-15 min y se filtra. Se pueden tomar hasta 3 tazas al día, preferiblemente después de las comidas. En extracto fluido: 30 gotas, 3 veces al día. En esencia: 3-4 gotas, 3 veces al día, en un terrón de azúcar. En extracto seco nebulizado: de 0,3 a 2 g al día. Para uso externo se recomienda: Baño: es la forma tradicional, y una de las más eficaces, de emplear el romero. Tiene un efecto tónico y estimulante. Se prepara hirviendo brevemente 50 g de droga. (7)

El aceite esencial es un aceite intenso, estimulante. Tiene propiedades analgésicas, antisépticas, antidiarreicos, antirreumáticas, antiespasmódicas, astringentes, es un estimulante circulatorio, sudorífico, cicatrizante, hepático y tonificante. (1)

#### 1.5.5 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

En el romero (*Rosmarinus officinalis*) la mayor parte de la evidencia de los usos medicinales provienen de la experiencia clínica más que de estudios científicos. Sin embargo, recientes estudios de laboratorio han mostrado que el romero disminuye el crecimiento de algunas bacterias tales como *Escherichia coli* y *S. aureus*. (7)

A nivel infectológico diferentes extractos de romero han demostrado actividad inhibitoria en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium* sp., *Bacillus subtilis*, *Salmonella* sp., La tintura de hojas resultó ser activa contra *Candida albicans* y el aceite esencial frente a los insectos fitopatógenos *Attagenud piceus*. (7)

El Aceite esencial de romero presenta propiedades antimicrobiales contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Mycobacterium intracellulare*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Investigadores europeos atribuyen estas propiedades al alto contenido de 1,8-cineol, presente en la esencia (40).

En todos los casos la actividad antioxidativa de dos de sus componentes, carnosol y ácido ursólico, serían los responsables del mencionado efecto antimicrobiano.

Se ha realizado estudios de la eficacia de un extracto etanólico de romero contra *Staphylococcus aureus* en dos modelos de infección en piel de ratón, como por ejemplo infecciones producidas en heridas quirúrgicas. Los resultados evidenciaron la acción bacteriostática del extracto de *R. officinalis* que contiene 4,6 % de polifenoles activos contra la bacteria patógena *S. aureus* en la infección presente en la piel de ratón. (7)  
(11)

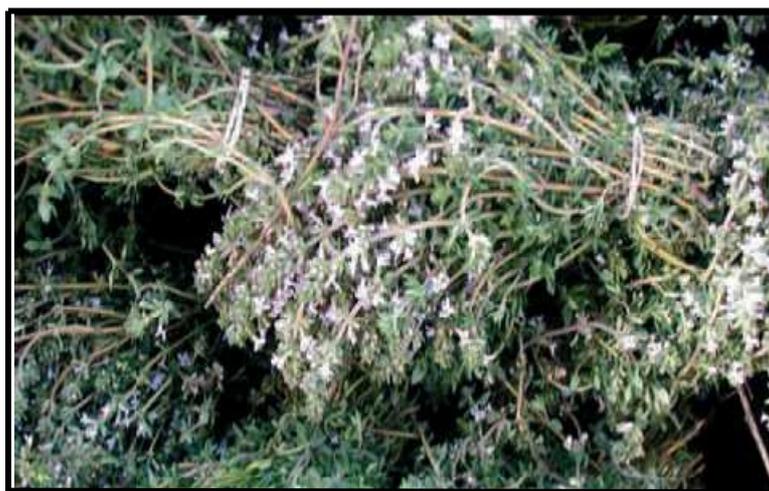
Otros usos y propiedades: Es apreciada como planta aromática, en aplicaciones culinarias y la industria de la perfumería y en conservación de alimentos. (51)

## 1.6 TOMILLO (*Thymus vulgaris*)

### 1.6.1 HISTORIA:

El uso del tomillo data de tiempos muy antiguos. Los egipcios lo empleaban como una de las sustancias aplicadas en los procesos de momificación. El nombre *Thymus* proviene del griego *thumus* que significa fuerza o coraje, ya que se empleaba principalmente como infusión energizante y como antiséptico de heridas de guerreros. Esta nomenclatura fue empleada por Teofrasto para designar tanto al tomillo como a la ajedrea. Se la recomendaba como antídoto para las mordeduras de serpientes. El propio Carlo Magno ordenó su cultivo en todos los jardines para aprovechar tanto sus propiedades medicinales como culinarias. (42) (44)

En el siglo XVI fue cultivado extensamente en toda Europa y regiones aledañas al Mediterráneo, formando parte de numerosas recetas y preparados correspondientes a las primeras farmacopeas europeas. En 1725, un boticario alemán llamado Neumann obtiene el aceite esencial, comenzando a partir de entonces su estudio con fines terapéuticos. (43)



FOTOGRAFÍA No. 2 TOMILLO, *Thymus vulgaris*.

### 1.6.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL TOMILLO:

Crece espontáneo por todo el sur de Europa, donde se reproduce bien, ya sea por semillas o, más frecuentemente por división de las matas en primavera. Prefiere los terrenos ligeros y pedregosos, y cuando es cultivado, requiere riegos repetidos durante los calores excesivos. (42) (44)

Clasificación científica:

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Lamiales

FAMILIA: Lamiaceae

GÉNERO: *Thymus*



**FOTOGRAFÍA No. 3 FLORES DE TOMILLO.**

El Tomillo pertenece a la familia de las labiadas alcanza de 15 a 30 cm. de altura, muestra hojas opuestas, lanceo-ladas, con los bordes enrollados y densamente pilosas. Las flores del Tomillo son diminutas, agrupadas en racimos terminales muy densas, rosadas o blanquecinas. Cáliz de color rojizo vinoso, con la garganta obstruida por pelitos blancos. El labio superior muestra tres dienteitos cortos, y el inferior dos largas y estrechas lacinias. La corola mide entre 7 y 8 mm y aparece dividida en dos labios: el

superior escotado y en inferior subdividido en tres lóbulos divergentes. Toda la planta desprende un fuerte aroma al estar provista de glándulas esenciales. Se recolectan primordialmente el *Thymus vulgaris* y el Tomillo salsero o blanco. Los romanos lo introdujeron en la cocina, perfumando vinos y quesos. (59)(60)

### 1.6.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA:

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%),  $\gamma$ -terpineno (1-5%), borneol, acetato de bornilo, acetato de linalino, geraniol,  $\alpha$  y  $\beta$ - pineno, limoneno.

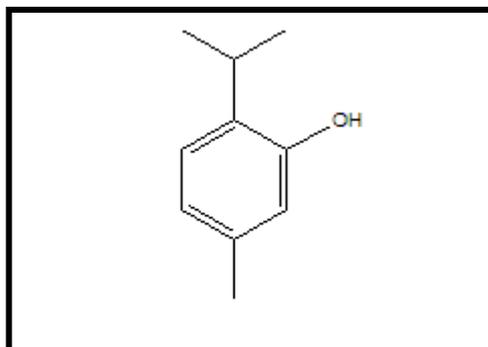


GRÁFICO No. 2 TIMOL

El rendimiento porcentual de aceite esencial del tomillo varía al método utilizado para su extracción ya sea por destilación con agua, destilación con vapor de agua o la combinación de ambas. (7)

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.

Otros: taninos (7-10%), serpilina (principio amargo), saponinas ácidas y neutras, ácido labiático, oleanólico y ursólico (1,5%), ácidos fenilcarboxílicos (clorogénico y cafeico), ácido rosmarínico (1%), ácido litospérmico, resinas. (7)

#### 1.6.4 ACCIÓN FARMACOLÓGICA:

Se lo utiliza como digestivo. Estimulante del apetito, antiparasitario, antihelmíntico, anticatarral, antimicrobiano, antiséptico, cicatrizante, antiespasmódico, carminativo, expectorante, mucolítico, diaforético. (2) (7)

Las propiedades carminativas del aceite esencial de Tomillo lo hacen un efectivo tratamiento para diferentes malestares estomacales. (7)

#### 1.6.5 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Aún cuando no se conocían los antibióticos, el tomillo era considerado como un eficaz desinfectante. Actualmente, está comprobado que sus componentes fenólicos, timol y carvacrol, tienen actividad antibacteriana frente a gérmenes gran positivos y gran negativos. Este efecto se debe a su acción sobre la membrana bacteriana. Además tiene acción anti fúngica (eficaz contra *Candida albicans*) y antivírica. (7)

El timol es un producto extraído por la industria farmacéutica y ha sido extensamente documentado por su acción antibacterial, antiviral y fungicida sobre diferentes tipos de microorganismos aún aquellos que ya son resistentes a la medicina tradicional. (7)

El agente activo del tomillo (*Thymus vulgaris*) es el timol que se caracteriza por su poder desinfectante y fungicida. Por su sabor agradable está presente en la formulación de diversos enjuagues bucales, pastas de dientes, etc. Una disolución de 5% de timol en etanol se utiliza para la desinfección dermal y contra infecciones con hongos. (7)

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 *L. monocytogenes* se ha encontrado una inhibición superior al 50% por parte de ambos aceites. (7)

Al eliminarse por vía respiratoria y renal, el tomillo produce efecto antiséptico en el árbol respiratorio y en las vías urinarias. (7)

Dentro de la actividad antimicrobiana, el timol y el carvacrol han demostrado exhibir el mayor espectro terapéutico comparativamente con el resto de los componentes del aceite esencial. Investigadores de la Universidad de Montpellier (Francia) han identificado entre seis y siete quimiotipos diferentes en ejemplares de tomillo europeos. En estudios de actividad antibacteriana se ha visto, por ejemplo, que el quimiotipo 5 es el menos activo en función de la concentración inhibitoria mínima de las cepas bacterianas, mientras que el quimiotipo 1 presenta la mayor actividad antifúngica. (6)

Frente a *S aureus* y *Helicobacter pylori* resultó activo in vitro el extracto acuoso de las hojas de tomillo. Así como la propiedad inhibitoria del aceite esencial frente a *Listeria monocytogens* (7)

Tanto el extracto acuoso como el acetónico de tomillo han desarrollado actividad inhibitoria in vitro frente a *M. tuberculosis*. (7)

El tomillo está clasificada como planta medicinal expectorante y atiespasmódica en las vías respiratorias y ejerce un efecto relajante del músculo liso bronquial que justifica su uso como antitusivo. (7)

La acción espasmolítica se debe al timol ya al carvacrol del aceite esencial, que se cree tienen la capacidad de inhibir la disponibilidad del calcio, con lo que podrían bloquear la conducción nerviosa. Por otro lado, se ha comprobado que la acción de los flavonoides derivados del luteol potencia la acción espasmolítica de los fenoles, actuando sobre todo en la tráquea. (7)

Por su actividad antiséptica, el tomillo también tiene interés como antibacteriano de la cavidad bucofaríngea, así como para el lavado de heridas.

La acción antibacteriana del tomillo se ve potenciada por la capacidad que tiene de producir una estimulación de la leucopoyesis y una elevación de los valores de

trombocitos en la sangre, por lo que también se considera su uso como potenciador de la acción de otros inmunosupresores. (7)

El aceite esencial de Tomillo actúa como tónico nervioso, y en forma similar al romero estimula el cerebro y la memoria por lo que resulta útil en casos de fatiga o debilidad. La acción primaria del aceite esencial de Tomillo es sobre el tracto genito-urinario y sobre las vías respiratorias compartiendo incluso propiedades antisépticas con el eucalipto. El aceite esencial posee timol, carvacrol,  $\gamma$ -Terpineno,  $\rho$ -Cimeno. (2)

## **1.7 ANÁLISIS DE LA DROGA CRUDA**

Mediante el empleo de los métodos físico-químicos de análisis puede determinarse y establecerse la calidad de una droga, así como, completar su identificación. (57)

La evaluación físico-química de las drogas comprende diferentes métodos de análisis que permitan la evaluación de drogas crudas, algunos de los cuales describimos a continuación:

### **1.7.1 DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES, SOLUBLES EN AGUA E INSOLUBLES EN ÁCIDO.**

Se denominan cenizas totales al residuo inorgánico que se obtiene al incinerar una droga, fundamentalmente en su determinación gravimétrica. (57)

Las cenizas solubles en agua es aquella parte de las cenizas totales que se disuelven en agua y las ácido insolubles, el residuo que se obtiene después de la disolución de las cenizas totales en ácido clorhídrico al 10%. (57)

### **1.7.2 HUMEDAD**

La presencia de exceso de agua en las drogas vegetales, puede promover el crecimiento de hongos, insectos y la hidrólisis de constituyentes que pueden provocar el deterioro de la droga.

Es por ello, que los límites en el contenido de agua debe ser determinado para las drogas vegetales, especialmente para aquellas que absorben fácilmente la humedad o en las cuales el deterioro puede ser promovido por la presencia de un exceso de agua. (57)

Los límites de agua usualmente establecidos en las farmacopeas oscilan entre 8 y 14% con pocas excepciones. Los dos métodos más usados para determinar el contenido de agua en las drogas vegetales son el gravimétrico (pérdida por desecación) y el azeotrópico (destilación con tolueno). El método gravimétrico es el más fácil, pero no es aplicable a drogas que contengan sustancias volátiles. El método azeotrópico requiere de un equipo especial, lo cual comparativamente dificulta su uso, pero es aplicable a drogas que contengan sustancias volátiles. (57)

### **1.7.3 DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS SOLUBLES.**

Se basa en la extracción de las sustancias solubles en agua, alcohol o mezclas hidroalcohólicas, mediante maceración y evaporación hasta sequedad de una alícuota del extracto. (57)

## **1.7.4 ESTUDIO QUÍMICO CUALITATIVO**

### **1.7.4.1 Tamizaje fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe permitir la evaluación rápida con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben ser interpretados en conjunto con los resultados del tamizaje farmacológico. (57)

## **1.8 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN**

Los principales activos contenidos en las plantas pueden ser extraídos mediante diversas técnicas extractivas o bien pueden ser administrados como tales, tal y como se encuentran en la planta desecada o en la planta fresca. (19)(35)

A lo largo de la historia la fitoterapia ha desarrollado diversos métodos de extracción para el mejor aprovechamiento de las virtudes terapéuticas de las plantas tratadas.

El método de extracción utilizado depende del tipo de planta a emplear (caracteres organolépticos), de la concentración de principios activos y de sus propiedades farmacológicas. (35)

El agua tiene un poder extractivo relativamente pequeño, comparada con otros disolventes también empleados. Uno de ellos y el más usado es el ALCOHOL en diversas graduaciones. Muchas de las preparaciones extractivas (extractos) se realizan con este disolvente.

Los métodos y técnicas operatorias a seleccionar para realizar la extracción y/ o aislamiento de principios activos de un material vegetal dependen de varios factores, como son:

- La cantidad de agua. Cuanto mayor sea la cantidad de agua, más elevado será el agotamiento de los principios activos dentro de la planta.
- Las influencias que entre unos y otros principios activos pueden ocurrir, una vez en solución den lugar a una mayor solubilidad o menor en otros casos.
- La temperatura. La infusión o el cocimiento a una temperatura cercana a los 100°C favorece la extracción. No obstante, a veces conviene hacer la extracción con agua fría, ya que puede interesar no extraer determinados principios activos que solamente pasarían al agua con la ayuda del calor.
- El tiempo. La duración del contacto de la planta con el agua.
- El sistema empleado para la extracción.
- El grado de pulverización de la planta. Aumenta la extracción cuanto más troceada esté la planta, pero hasta ciertos límites a partir de los cuales pueden originarse una serie de procesos físicos que dificulten el proceso. (35)

Según la textura o los componentes de la planta, existen varios procedimientos:

**INFUSIÓN:** se vierte el agua hirviendo sobre la planta colocada en un recipiente de cierre bien ajustado, a fin de evitar la pérdida de principios activos, y se deja en reposo de 5 a 15 minutos, filtrándose y tomándose inmediatamente. Generalmente se utiliza para flores, hojas y tallos tiernos. (35)

**DECOCCIÓN:** consiste en echar la planta en agua hirviendo y dejarla hervir durante 5 ó 20 minutos, a una temperatura superior al punto de ebullición, en un recipiente cerrado para evitar la evaporación. Se utiliza para raíces, tallos fuertes y cortezas.

**MACERACIÓN:** Es un proceso de extracción sólido – líquido. El producto sólido (materia prima) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante que son las que se pretende extraer. (33) (35)

Generalmente el agente extractante (fase líquida) es el agua, pero también se puede emplear otros líquidos, como: vinagre, jugos, alcoholes o aceites aderezados con diversos ingredientes que modificarán las propiedades de extracción del medio líquido. A veces el producto empleado es el extracto propiamente dicho y otras el sólido sin los citados compuestos o incluso ambas partes.

La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada así como del líquido de maceración.

**DIGESTIÓN:** se trata de macerar la planta en agua a temperatura media, alrededor de 50°C, durante un tiempo determinado. Se utiliza sobre todo para el agotamiento de las drogas resinosas o cuando los disolventes empleados son grasos (preparación de aceites medicamentosos). (36)

**PERCOLACIÓN O LIXIVIACIÓN:** en este caso el agua, alcohol u otro disolvente atravesaría una columna llena de planta pulverizada, arrastrando durante el proceso los principios activos. Ej. café.

**MACERACIÓN-DECOCCIÓN:** se utiliza para ciertas tisanas, compuestas de partes vegetales duras y tiernas, en donde está indicado ponerlas en maceración antes de cocerlas.

**DIÁLISIS.-** En la cual una membrana semipermeable permite una selección de las sustancias arrastradas por el disolvente. (35)

## **1.9 MÉTODOS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO.**

### **1.19.1 MÉTODO DE DILUCIÓN**

Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). (36)

Las primeras determinaciones se realizaron empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (macrodilución). Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización.

La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos.

La utilización de micro pipetas y de placas de micro titulación facilitó la utilización del método de microdilución con caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas (semi) automáticos de lectura e interpretación de resultados, pero con el grave inconveniente del incremento en el coste. (36)

Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo. Si se realiza un subcultivo en medio sin antimicrobiano de los medios sembrados previamente puede determinarse también la actividad bactericida.

Un ejemplo de este tipo de método es el de Mitscher; El cual consiste en mezclar en un medio de cultivo el extracto de la sustancia de ensayo y posteriormente inocular un grupo de microorganismos que deben ser representativos de los diferentes grupos existentes. (36)

### **1.9.2 MÉTODO DEL ANTIBIOGRAMA DISCO-PLACA**

El antibiograma disco-placa 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. (36)

La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. Sin embargo, los métodos disco-placa no permiten una lectura directa del valor de la CMI. Para cuantificarla, basta con haber contrastado previamente el sistema disco-placa con un gran número de cepas de CMI conocidas que han estado previamente determinadas por otros métodos de determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos (ej.: método de dilución). (36)

Esta determinación se realiza con cientos de bacterias para minimizar errores. Se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas y se grafica dicha medida frente a la CMI, obteniéndose la línea de regresión o "recta de concordancia" que proporciona la correspondencia entre las CMI y los diámetros de inhibición.

Para determinar la CMI de una cepa se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición y luego extrapolarlo en el gráfico para obtener la CMI. Existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada

antimicrobiano. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R). (36)

### **1.9.3 MÉTODO DEL EPSION TEST**

El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test podemos, mediante lectura directa, determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI). Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones.

El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira. (36)

## **1.10 DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS UTILIZADAS EN EL MÉTODO DE MITSCHER.**

### **1.10.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

#### **1.10.1.1 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS:**

El *S. aureus* es un coco inmóvil, de 0.8 a 1 micrómetro 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. El *S. aureus* es un microorganismo grampositivo, pero las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como gramnegativos. (20)  
(56)

Clasificación científica:

ORDEN: Eubacteriales

FAMILIA: Micrococacea.

GÉNERO: *Staphylococcus*.

ESPECIE: *aureus*.

### 1.10.1.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS

TABLA Nº1 PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE *S. aureus*

Prueba	Reacción
Coagulasa	(+)
Manitol	(+)
Catalasa	(+)

FUENTE: MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

### 1.10.2 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028

#### 1.10.2.1 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS:

*S. typhimurium* al igual que otros patógenos digestivos, induce a las células del huésped a englobarlos, pero parece algo diferente a la fagocitosis inducida de otros patógenos, ya descrita. Luego de adherida la bacteria a la superficie celular, se produce un pliegue en la célula, que la rodea y la introduce en una vesícula de endocitosis. Hay intensa polimerización de actina en la vecindad y luego de introducida, ésta desaparece. (20)

La bacteria no escapa de la vesícula ni entra en el citoplasma, se multiplica en este fagosoma para ser posteriormente liberada. Por otra parte, estas bacterias pueden sobrevivir a la fagocitosis, resisten la muerte por el complemento. Al menos 200 genes se encuentran involucrados. *S. typhimurium* posee un plásmido de virulencia cuya presencia otorga a la bacteria la capacidad de causar enfermedad sistémica en el ratón. (20) (54)

Clasificación científica:

ORDEN: Eubateriales.

FAMILIA: Enterobacteriaceae.

GÉNERO: *Salmonella*.

ESPECIE: *typhimurium*

#### 1.10.2.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS:

**TABLA Nº2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE *S. typhimurium*.**

<b>Prueba</b>	<b>Reacción</b>
<b>Glucosa</b>	(+)
<b>Lactosa</b>	(-)
<b>Movilidad</b>	(+)
<b>Ureasa</b>	(-)

FUENTE: MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

#### 1.10.3 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

##### 1.10.3.1 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS:

Bacilos Gram negativos, inmóviles, capsulados, productores de gas, que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y que se asocian a infecciones urinarias y respiratorias en humanos. (20) (31)

En la tinción de Gram son negativos; la asimilación y la fermentación de la lactosa se puede observar en el medio Kligler, donde son positivos y desprenden gas; y en la

fermentación acetónica o prueba de Voges Proskauer son positivos. Por último, sus condiciones óptimas de cultivo son en agar nutritivo a 37 °C, pH de 7.0, presión osmótica de 1 atm. (31)

Clasificación científica:

ORDEN: Eubacterales.

FAMILIA: Enterobacteraceae.

GÉNERO: *Klebsiella*.

ESPECIE: *pneumoniae*.

#### 1.10.3.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS:

**TABLA Nº3 PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE *K. pneumoniae*.**

<b>Prueba</b>	<b>Reacción</b>
<b>Gas glucosa</b>	(+)
<b>Producción de H<sub>2</sub>S</b>	(-)
<b>Movilidad</b>	(+)
<b>Indol</b>	(-)
<b>Ureasa</b>	(+)
<b>Citrato</b>	(+)

FUENTE: MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLINICA

#### 1.10.4 *Candida albicans* ATCC 10231

##### 1.10.4.1 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS:

El Género Cándida comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies micóticas. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular. Solamente una docena de las especies poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C y pueden ser ocasionalmente patógenas para el

hombre. Es un hongo diploide asexual (forma de levadura) saprofito de la familia de los *Sacaromicetos*. (20)(14)

Suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí. (14)

Clasificación científica:

REINO: Hongo

FAMILIA: Cryptococcaceae

GÉNERO: *Candida*.

ESPECIE: *albicans*

#### 1.10.4.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS:

**TABLA Nº4 PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE *C. albicans***

<b>Prueba</b>	<b>Reacción</b>
<b>Pseudohifas</b>	<b>(+)</b>
<b>Glucosa</b>	<b>(+)</b>
<b>Lactosa</b>	<b>(-)</b>

FUENTE: MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

#### 1.10.5 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

##### 1.10.5.1 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS:

Es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, con motilidad unipolar. Es un patógeno oportunista en humanos y también en plantas. *P. aeruginosa* es a menudo identificada, de modo preliminar, por su apariencia perlada y olor a uvas in vitro. La identificación

clínica definitiva frecuentemente incluye, tanto identificar la producción de piocianina y fluoresceína como determinar su habilidad de crecer a 42 °C. (20) (45)

Es capaz de crecer en combustibles como queroseno o gasóleo, ya que es un microorganismo capaz de nutrirse a partir de hidrocarburos, causando estragos de corrosión microbiana, y creando una gelatina oscura que a veces se identifica inadecuadamente con un alga. (45)

Clasificación científica:

ORDEN: Eubacteriales.

FAMILIA: Pseudimonadaceae.

GÉNERO: *Pseudomonas*.

ESPECIE: *aeruginosa*.

#### 1.10.5.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS:

**TABLA Nº5 PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE *P. aeruginosa*.**

<b>Prueba</b>	<b>Reacción</b>
<b>Oxidasa</b>	(-)
<b>Movilidad</b>	(+)
<b>Catalasa</b>	(+)
<b>Ureasa</b>	(-)
<b>Maltosa</b>	(-)
<b>Lactosa</b>	(-)

FUENTE: MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLINICA

## CAPITULO II

### 2. PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Recursos naturales y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

#### 2.2 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

##### 2.2.1 MATERIAL VEGETAL

Romero (*Rosmarinus officinalis*)

Tomillo (*Thymus vulgaris*)

Procedentes de JAMBI KIWA.

##### 2.2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

- *Staphylococcus aureus*. ATCC 25923
- *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
- *Klebsiella pneumoniae*. ATCC 13883
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Pseudomonas aeruginosa*. ATCC 27853

### 2.2.3 EQUIPOS Y MATERIALES

- Autoclave
- Balanza de precisión
- Cámara fotográfica
- Computadora
- Estufa de secado
- Incubadora
- Refrigeradora
- Baño María.
- Rotavapor.
- Espectrofotómetro.
- Cajas petri 140 X 15 mm
- Hisopos estériles
- Reverbero eléctrico.
- Asas de platino.
- Mechero.
- Tubos de ensayo.
- Varillas de vidrio.
- Gradilla
- Erlenmeyer 250 mL.
- Bureta 50 mL
- Caja de guantes estériles
- Caja de mascarillas
- Caja de parafilm
- Espátula
- Fundas plásticas de 10 x 15 pulgadas
- Pipetas de 1, 5 y 10 mL
- Piceta
- Pliegos de papel filtro
- Rollos de papel aluminio
- Vasos de precipitación de 100, 250, 500 y 1000 mL.

### **2.2.5 REACTIVOS**

- Agua destilada.
- Alcohol potable.
- Etanol.
- Hexano.
- Acetona.
- Éter etílico.
- Ácido clorhídrico.
- Ácido nítrico.
- Ácido sulfúrico.
- Peróxido de hidrógeno.
- Suero fisiológico.
- Vainillina.
- Safranina.
- Reactivos para Tamizaje fitoquímico.
- Solución índigo carmín.
- Solución gelatina.
- Caolín.
- Sulfato de estreptomicina.
- Sodio cloruro.
- Amoníaco.

### **2.2.6 MEDIOS DE CULTIVO**

- Caldo de soya tripticasa MERCK.
- Agar Saboraud
- Agar de soya tripticasa MERCK.
- Caldo cerebro corazón MERCK
- Agar eosina azul de metileno MERCK.

## **2.3 FACTORES DE ESTUDIO**

### **- Los extractos.**

Se elaboró extractos hidroalcohólicos y extractos hexánicos usando el método de maceración de Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*) a diferentes concentraciones y la mezcla de las plantas.

### **- Actividad antibacteriana.**

Se determinó la actividad antibacteriana frente a microorganismos ATCC como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella tiphymurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa*.

## **2.4 UNIDAD EXPERIMENTAL:**

Conformada por una muestra de extracto hidroalcohólico y hexánico.

## **2.5 MÉTODOS**

### **2.5.1 FASE EXPERIMENTAL**

#### **2.5.1.1 Pruebas de control de calidad de la especie vegetal.**

Antes de la preparación de un producto fitoterapéutico es necesario garantizar la calidad de la materia prima que se va a utilizar, evitando así efectos adversos tales como: el uso de la especie incorrecta, adulteraciones con productos sintéticos no declarados y presencia de contaminantes.

##### **2.5.1.1.1 Comprobación taxonómica e identificación botánica**

Para el análisis se utilizó Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*), la materia prima fue adquirida directamente de Jambi Kiwa.

La identificación se realizó mediante procesos directos, es decir: comparándolas con descripciones pormenorizadas de las plantas en literaturas especializadas.

Realizado por el ingeniero Jorge Caranqui, encargado del Herbario de la ESPOCH

#### **2.5.1.1.2 Estudio macroscópico. Por observación directa .Metodología OMS (1998).**

Se observó claramente a ojo descubierto y con una lupa de mano las características morfológicas que le son propias a las dos plantas motivo de estudio.

#### **2.5.1.2 Análisis fisicoquímico cuantitativo**

Las especies fueron identificadas de acuerdo a la forma de las hojas, tallos y flores.

#### **A. DETERMINACIÓN DE CENIZAS (Técnica NTE INEN 401)**

##### **Principio**

Se lleva a cabo por medio de incineración seca y consiste en quemar la sustancia orgánica de la muestra problema en la mufla a una temperatura de  $550^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$ ., con esto la sustancia orgánica se combustiona y se forma el  $\text{CO}_2$ , agua y la sustancia inorgánica (sales minerales) se queda en forma de residuos, la incineración se lleva a cabo hasta obtener una ceniza color gris o gris claro.

##### **Procedimiento**

- El material a utilizarse (crisoles), luego de permanecer en una solución de dicromato de potasio, se procedió a enjuagar por tres veces consecutivas con agua de la llave y de la misma forma se procedió a enjuagar con agua destilada luego se metió los crisoles a la mufla por un tiempo de 4 horas por lo mínimo para que se efectúe el tarado del material.

- Después se enfrió los crisoles en un desecador durante media hora como mínimo al cabo de lo cual se procede a pesar los crisoles en la balanza analítica y se registró este peso en el cuaderno respectivo.
- Luego se pesó alrededor de 2.5 g de la muestra problema con una aproximación de 0.1 mg, en el crisol que se encuentra en la balanza analítica. Y se registró el peso.
- Luego se pasó los crisoles a la plancha precalcinadora y se lo mantuvo allí hasta que las muestras estén previamente calcinadas.
- Posteriormente se trasladó los crisoles con la muestra previamente calcinada a la mufla a una temperatura de 550 a 700 °C por el tiempo de 8 horas como mínimo.
- Luego se sacó los crisoles de la mufla y se los colocó en el desecador por un tiempo de media hora como mínimo para su enfriamiento.
- Luego se procedió a pesar los crisoles con las cenizas y se registró su peso.

### Cálculos

Porcentaje de Ceniza:

$$C(\%) = \frac{(m2 - m)}{(m1 - m)} * 100$$

Donde:

%C = contenido de cenizas en porcentaje de masa

m = masa de la cápsula vacía en g

m1 = masa de cápsula con la muestra húmeda en g

m2 = masa de la cápsula con las cenizas en g

## B. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD (Técnica NTE INEN 382)

### Principio.

Conocida también como humedad tal como ofrecido (TCO), y consiste en secar la muestra en la estufa a una temperatura de 70 °C hasta peso constante, el secado tiene una duración de 24 horas. Esta muestra posteriormente se lleva a la molienda si el caso requiere el análisis proximal.

### Procedimiento.

- De la muestra a analizar, con el grado de trituración que determine la norma específica se pesó 2 g con desviación permisible de 0.5 mg.
- Se colocó la muestra en una cápsula de porcelana previamente tarada y disecada a 105 °C hasta masa constante.
- Se desecó a 105 °C durante 3 horas.
- La cápsula se colocó en la desecadora donde se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pesó.
- Se colocó nuevamente en la estufa durante 1 h, se volvió a pesar hasta obtener una masa constante.

### Cálculos

$$SS(\%) = \frac{(m2 - m)}{(m1 - m)} * 100$$

Donde:

SS=sustancia seca en porcentaje en masa

m=masa de la capsula en g

m1=masa de la cápsula con la muestra en g

m2=masa de la cápsula con la muestra después del calentamiento en g

### **C. DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS SOLUBLES:**

#### **Principio**

Se basa en la extracción de las sustancias en agua, alcohol o mezclas hidroalcohólicas, mediante maceración y evaporación hasta sequedad de una alícuota de extracto.

#### **Procedimiento**

- Se pesó 4g de la muestra previamente pulverizada y se colocó en un erlenmeyer de boca esmerilada de 250 mL.
- Se añadió 100 mL del disolvente y se pesó para obtener el total del peso, incluyendo el frasco, se tapó y se agitó bien y se dejó en reposo por 1 h.
- Se conectó el condensador de reflujo y se calentó a ebullición durante 1 h, luego se enfrió y pesó el frasco, reajustando al peso inicial con el disolvente empleado.
- Luego se pasó 25 mL de la muestra filtrada a una cápsula de porcelana previamente tarada y se evaporó a sequedad en baño de agua.
- Se secó a 105 °C hasta peso constante, pesando después de enfriar en desecadora.

#### **Cálculos**

Se calcula el contenido de sustancias extraíbles en mg de droga seca.

### **D. CUANTIFICACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL:**

#### **Principio**

La destilación por arrastre con vapor es una técnica para la separación de sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles de otros productos no volátiles.

Las sustancias arrastrables con vapor son inmiscibles en agua, tienen presión de vapor baja y punto de ebullición alto.

La pureza y el rendimiento del aceite esencial dependerán de la técnica que se utilice para el aislamiento.

### **Procedimiento**

- Se colocó la muestra y agua destilada en un matraz y se agregó cuerpos porosos. Luego se armó el equipo de destilación por arrastre de vapor (utilizando un balón de 500 mL, tubo refrigerante y 1 equipo dean start).
- Se sometió a calentamiento.
- Luego se recogió el exceso de agua destilada en un vaso de precipitación y se dejó acumular el aceite.
- Al final se recogió todo el exceso de agua destilada y se recogió el aceite aromático acumulado.

### **E. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES**

Los productos fitoterapéuticos son obtenidos a partir de plantas cultivadas o silvestres, por tal motivo las posibilidades de contaminación microbiana son altas. Un apropiado proceso de recolección, cultivo, cosecha, secado, corte y almacenamiento es esencial para garantizar la calidad de los mismos.

Se realizó las siguientes determinaciones:

- Determinación de Coliformes fecales.
- Conteo en placa de aerobios mesófilos.
- Determinación de *salmonella*.
- Conteo de mohos y levaduras.

### **2.5.1.3 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICO Y HEXÁNICO.**

#### **Principio**

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (materia prima) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante que son los que se pretende extraer.

#### **Procedimiento**

- Pesar 50 g de la planta a analizar en la balanza.
- Colocar el contenido en un vaso de precipitación de 250 mL.
- Anadir 150 mL de etanol al 40 %.
- Trasvasar la mezcla a un frasco ámbar.
- Dejar reposar 72 horas en un lugar con poca iluminación, y remover constantemente.
- Filtrar la mezcla.

### **2.5.1.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICO Y HEXÁNICO.**

El empleo de métodos físico – químicos, permite establecer la calidad de los extractos obtenidos a partir de drogas crudas, así como controlar su estabilidad.

#### **A. DETERMINACIÓN DE LOS REQUISITOS ORGANOLÉPTICOS**

Determinación de olor: Se toma una tira de papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con la característica del producto.

Determinación del color: Se toma un tubo de ensayo bien limpio y seco y se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observa el color. Se informa los resultados.

## **B. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD RELATIVA**

### **Principio**

Se entiende por densidad relativa a la relación entre la masa de un volumen de la sustancia a ensayar a 25°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico.

### **Procedimiento**

- Pesar el picnómetro vacío y seco a 2°C.
- Llenar el picnómetro con la porción de ensayo y mantenerlo a temperatura de 25°C durante 15 min.
- Ajustar el líquido al nivel empleado, si es preciso usar una tira de papel para extraer el exceso y secar exteriormente el picnómetro.
- Se pesa cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo y se repite la operación con el agua destilada a 25 °C, después de limpiar el picnómetro.

### **Cálculos**

La densidad relativa a 25 °C se calcula por la siguiente fórmula:

$$D_{25} = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

Donde:

$M_1$  = peso del picnómetro con la muestra (g).

$M_2$  = peso del picnómetro con el agua (g).

$M$  = peso del picnómetro vacío (g).

## C. DETERMINACIÓN DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN.

### Principio

El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio.

Esta relación viene dada por la siguiente ecuación:

$$\text{Sen } i / \text{Sen } r = n$$

Así los refractómetros utilizan como principio de medición, la determinación del ángulo límite el cual presenta en el campo visual un contraste claro y otro oscuro. La línea de separación entre ambos campos establece el ángulo límite de la luz incidente.

### Procedimiento

- Se coloca sobre el prisma de medición una gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos.
- Se ajusta el equipo seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.
- Después de haber realizado el ajuste del refractómetro, se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición.
- Se cierra el termoprisma y se enfoca la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición y se proceda de la misma forma que con el agua.

### Cálculos

Se hacen tres lecturas y se calcula el promedio de las mismas. Dos o más lecturas no deben diferir en más de 0.002.

Si las determinaciones no se efectúan a la temperatura de referencia se emplea la fórmula siguiente:

$$N_d^{25} = N_d^t + (t - 25)$$

Donde:

$N_d^{25}$  = índice de refracción a 25 °C

$N_d^t$  = valor leído en la escala del aparato a la temperatura t.

t = valor de la temperatura a que se realiza la medición (°C)

0.00044 = factor de corrección por grado Celsius.

Los valores se aproximan hasta las milésimas.

#### **D. DETERMINACIÓN DEL pH de EXTRACTOS.**

##### **Principio**

La acidez o la alcalinidad de las soluciones acuosas se caracterizan por el valor del índice de hidrógeno. El pH es por tanto un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógeno.

En la práctica, la medición de pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea digital o análogo. Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando como solución de ajuste de la escala del medidor de pH, una solución reguladora del mismo.

##### **Procedimiento**

- Ajustar el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se va a realizar la determinación.

- Determinar el valor de pH de la muestra.

## **E. DETERMINACIÓN DE LOS SÓLIDOS TOTALES.**

### **Principio**

La determinación de la variación de la masa, debido a la pérdida o eliminación de sustancias volátiles por acción del calor, mediante un proceso de evaporación de la porción de ensayo y secado del residuo en estufa, hasta masa constante, se le asigna como sólidos totales.

### **Procedimiento**

- 5.0 mL del producto se llevan a una cápsula previamente tarada a 105 °C.
- Se evapora sobre baño de agua hasta que el residuo esté aparentemente seco.
- Se pasa entonces hacia una estufa y se deja hasta peso constante (aproximadamente 3 h).
- Se retira la cápsula de la estufa y se coloca en una desecadora hasta que alcance la temperatura ambiente.
- Para obtener la masa constante entre una pesada y otra se mantendrá un tiempo de secado de 60 minutos.

### **Cálculos**

$$St = Pr - P * 100 / V$$

Donde:

Pr = masa de la cápsula más el residuo.

P = masa de la cápsula vacía.

V = volumen de la porción de ensayo.

100 = factor matemático para el cálculo.

### **2.5.1.5 ANALISIS FISICOQUÍMICO CUALITATIVO**

#### **REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN:**

##### **A. Ensayo de Baljet**

Una alícuota del extracto que se encuentra en alcohol, se evaporó en baño de agua y se re disolvió en 1 mL de alcohol. En estas condiciones se adicionó 1 mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo.

##### **B. Ensayo de Dragendorff**

Para este ensayo, la alícuota del extracto que está disuelta en un solvente orgánico, se evaporó en baño de agua y el residuo se redisolvió en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua.

Se añadió 3 gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia, turbidez definida ó precipitado se considera positivo.

##### **C. Ensayo de Mayer.**

Para este ensayo, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa se añade una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer si se observa opalescencia, turbidez definida o precipitado coposo es positivo.

#### D. Ensayo de Wagner

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.

#### E. Ensayo de Liebermann – Burchard

Para este ensayo, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adicionó 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de color.

#### F. Ensayo de Shinoda.

A la alícuota del extracto que se encuentra en alcohol, se diluyó con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se esperó 5 minutos, se añadió 1 mL de alcohol amílico, se mezcló las fases y se dejó reposar hasta que se separen. El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja o rojo.

#### G. Ensayo de Borntrager

Si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 % en agua. Se agitó mezclando las fases y se dejó en reposo hasta su separación. Si la fase acuosa alcalina se colorea de rosado o rojo el ensayo se considera positivo.

#### H. Ensayo de Kedde

Una alícuota del extracto se mezcló con 1 mL del reactivo y se dejó reposar durante 5 a 10 minutos. Un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violácea persistente durante 1 a 2 horas.

### 2.5.1.6 CUANTIFICACIÓN DE TANINOS

#### MÉTODO DEL PERMANGANATO DE POTASIO.

##### Procedimiento.

- Adicionar 25 mL de solución de índigo carmín y 750 mL de agua a 2 mL de extracto acuoso. Añadir solución de permanganato lentamente con una bureta y con agitación hasta obtener coloración verde claro.
- Continuar la valoración hasta cambio de color a amarillo brillante con el borde rosado débil.
- Designe los mL de  $\text{KMnO}_4$  utilizados como "a". Mezcle 20 mL del extracto, 80 mL de agua destilada, 50 mL de solución de gelatina, 100 mL de solución ácida de NaCl y 10 g de Caolín polvo en un frasco. Tape el frasco y agite durante unos minutos. Deje sedimentar y filtre a través de papel de filtro.
- Mezcle 25 mL de filtrado, con 25 mL de solución de índigo carmín y 750 mL de agua. Valorar con  $\text{KMnO}_4$ ; designe los mL consumidos como "b"

##### Cálculos

$$\% \text{ de Taninos} = \frac{(a-b) \cdot \text{equiv. KMnO}_4 \cdot 0,0042}{\text{mL de alícuota tomada del extracto}}$$

### **2.5.1.7 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO:**

#### **A. CROMATOGRAFÍA PARA IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.**

A partir de los extractos obtenidos de romero y tomillo se realizó una cromatografía con el fin de identificar flavonoides presentes en los mismos, para ello se emplea como Sistema de solventes: Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:27), sobre sílica gel – 60, y como revelador una solución de vainillina en ácido sulfúrico.

#### **B. CROMATOGRAFÍA PARA ACEITES ESENCIALES**

Utilizando los extractos de romero y tomillo se realizó una cromatografía para la detección de la presencia de aceites esenciales, para lo cual se empleó como Sistema de solventes: Tolueno: Acetato de etilo (93:7) sobre sílica gel – 60, y como revelador Vainillina- ácido sulfúrico.

### **2.5.1.8 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA (TÉCNICA DE MITSCHER).**

#### **MÉTODO DE MITSCHER**

##### **Día 1**

#### **1. PREPARACIÓN DE CALDO SOYA TRÍPTICASA (TSB)**

Se preparó cantidad suficiente de caldo de Soya Trípica (TSB) y se repartió 25 ml en erlenmeyer individuales de 125 mL de capacidad. Se autoclavaron a 121 °C por 15 minutos. Los erlenmeyer con TSB pueden mantenerse en refrigeración hasta el momento de usar.

## **2. PREPARACIÓN DE SUERO FISIOLÓGICO**

Se prepara 100 mL de solución salina al 0.9% y se repartieron 10 ml en tubos de ensayo tapa rosca 150 x 15. Se autoclavaron a 121 °C por 15 minutos. Los tubos de ensayo con solución salina pueden mantenerse en refrigeración hasta el momento de usar.

## **3. PREPARACIÓN DE AGUA ESTÉRIL**

Se prepararon 100 ml de agua estéril, que se mantuvieron en refrigeración hasta el momento de usar.

### **Día 2**

## **1. PREPARACIÓN DE LAS SUSPENSIONES DE MICROORGANISMOS**

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Salmonella typhimurium* ATCC 14028

*Candida albicans* ATCC 10231

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Se llevó a temperatura ambiente 5 erlenmeyer que contenían 25 mL de TSB estéril y se codificó con el nombre de los microorganismos ATCC y la fecha.

Utilizando una asa esterilizada a la llama y enfriarla se tomó una asada de los microorganismos ATCC de los tubos inclinados que los contienen y se transfirieron independientemente a los erlenmeyer codificados.

Los erlenmeyer se incubaron a 37°C por 24 horas.

## **2. PREPARACIÓN DE AGAR SOYA TRÍPTICASA (TSA)**

Se disolvió 40g de TSA en un litro de agua destilada. Esta cantidad es suficiente para aproximadamente 100 cajas.

Se realizó una disolución en caliente. Luego se repartió a tubos de ensayo con tapa 150 X 15. Se autoclavarón a 121°C por 15 minutos. Los tubos de ensayo se sacaron del autoclave y se mantuvieron en baño María a 45°C hasta el momento de usar.

## **3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ENSAYO**

### **A. Extractos crudos o totales**

Un vial limpio, seco y estéril, se codificó con el nombre del extracto de la planta. Con precisión se pesó 50 mg del extracto crudo o total y se disolvió en 500 mL DMSO (Se anotó en el libro de record la cantidad exacta pesada).

La disolución del extracto se puede realizar con la ayuda de ultrasonido. La concentración final de extracto fue 100000 µg/mL.

Se realizó una disolución al décimo, utilizando tubos de ensayo 100 x 13 limpios, secos y estériles a los que se añadió 900 µL de DMSO y 100 µL del extracto de la concentración 10000 µg/ml. La concentración final de esta disolución fue 1000 µg/ml.

Se codificó 6 cajas Petri estériles con el nombre del extracto y la concentración final (tres cajas para la concentración 1000 µg/ml y tres cajas para la concentración 100 µg/ml).

Se pipeteó separadamente 100 µL de las soluciones del extracto total (concentración 100000 µg/ml y 10000 µg/ml) a los tubos de ensayo que contenían 10 ml de TSA 45oC. La concentración final de los extractos fue 1000 y 100 µg/ml respectivamente.

Se mezclaron con la ayuda de un vortex e inmediatamente se pasaron a las cajas Petri previamente codificadas con el nombre del extracto y de la concentración de 1000 µg/ml y 100 µg/ml respectivamente.

Las cajas Petri una vez solidificado el medio de cultivo que contienen los extractos se invirtieron y se dejaron a temperatura ambiente por 18-24 horas.

### **B. Solución Control de Sulfato de Estreptomicina**

Con precisión se pesaron 100 mg de sulfato de estreptomicina y se disolvieron con agua estéril en un balón de 10 ml limpio, seco y estéril. Esta solución no se esteriliza en autoclave, si es necesario una esterilización adicional, se puede realizar por ultrafiltración. La concentración final fue de 10000 µg/ml.

Utilizando tubos de ensayo 100 x 13 limpios, secos y estériles se realizaron 8 diluciones sucesivas (Ej. 500 µL de solución de sulfato de estreptomicina + 500 µL de agua estéril).

Concentración finales 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.2, 78.1 y 39 µg/ml.

Se codificaron 27 cajas petri estériles con el nombre de control estreptomicina y las concentraciones finales: 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.5, 7.8 y 3.9 µg/ml.

Se pipetearon separadamente 100 µL de las disoluciones de estreptomicina a los tubos de ensayo que contienen 10 ml de TSA a 45°C. Las concentraciones finales son 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.5, 7.8 y 3.9 µg/ml respectivamente.

Se mezclaron con la ayuda de un vortex e inmediatamente se pasaron a las cajas Petri previamente codificadas con el nombre de control de Estreptomicina y de las concentraciones respectivas.

Las cajas Petri una vez solidificado el medio de cultivo que contiene las diluciones de los controles de estreptomicina se invirtieron y se dejaron a temperatura ambiente por 18-24 horas.

### **C. Compuestos Puros**

Con precisión se pesó 2.0 mg de muestra pura y se disolvió con 0.2 ml de DMSO en tubos 100 x 13 limpios, secos y estériles. Concentración final 10000 µg/ml.

Utilizando tubos de ensayo 100 x 13 limpios, secos y estériles se realizaron 8 diluciones sucesivas (Ej 100µl de extracto puro + 100 µL de DMSO). Concentraciones finales 5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.2, 78.1 y 39 µg/ml.

Se codificaron 27 cajas petri con el nombre del extracto puro y las concentraciones finales 500, 125, 62.5, 31.2, 15.5, 7.8 y 3.9 µg/ml.

Se pipetearon separadamente 100 µL de las soluciones del extracto puro y se pasaron a los tubos de ensayo con 10 ml de TSA a 45 °C. Las concentraciones finales son 500, 125, 62.5, 31.2, 15.5, 7.8 y 3.9 µg/ml respectivamente.

Se mezclaron con la ayuda de un vortex e inmediatamente se pasaron a las cajas petri previamente codificadas con el nombre del extracto puro y de las concentraciones respectivas.

Las cajas petri una vez solidificado el medio de cultivo que tiene las diluciones de los extractos puros se invirtieron y se dejaron a temperatura ambiental por 18-24 horas.

Se debe realizar blanco de reactivos y de DMSO.

### **Día 3**

#### **1. Preparación de las cajas petri**

Las cajas petri preparadas en el día 2 no deben tener contaminación, si la tienen, se desechan y se debe repetir su preparación con más cuidado.

Todas las cajas petri se dividieron con marcador en siete partes iguales y se marcaron del 1 al 7.

#### **2. Preparación de las suspensiones salinas de los microorganismos**

Los tubos 150 x 15 que contiene 10 ml de solución salina estéril se llevaron a temperatura ambiente y codificaron con el nombre de cada microorganismo.

La dilución se realiza con la ayuda de una pipeta graduada en  $\mu\text{L}$  añadiendo en la cámara de flujo laminar el volumen requerido para cada microorganismo.

Todos los erlenmeyer que contienen los microorganismos para el ensayo deben estar visiblemente turbios y a partir de estos se realizan las siguientes suspensiones en los tubos con solución salina estéril.

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

100  $\mu\text{L}$  susp./10 mL sol. Salina

*Salmonella typhimurium* ATCC 14028

100  $\mu\text{L}$  susp./10 mL sol. Salina

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031

100  $\mu\text{L}$  susp./10ml sol. Salina.

*Candida albicans* ATCC 10231

1 mL susp./10mL sol .Salina

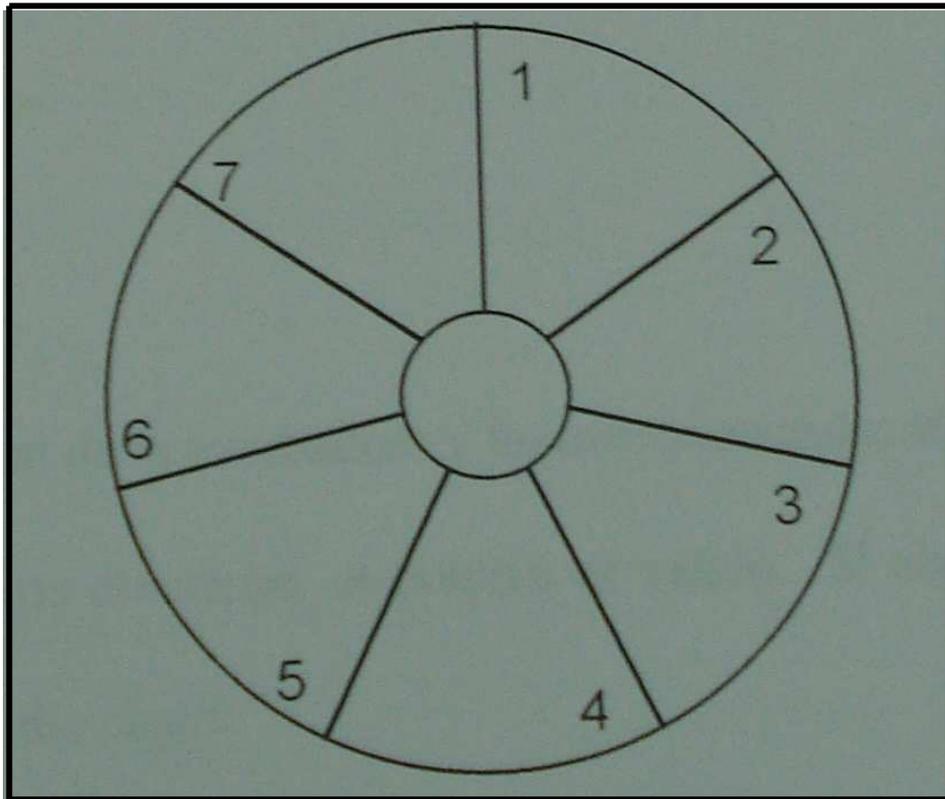
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

100  $\mu\text{L}$  susp./ 10 ml sol. Salina

Todas estas suspensiones se deben mezclar bien utilizando vortex, especialmente la de *Candida albicans*.

### **C. Estriado de los microorganismos**

A partir de las suspensiones de los microorganismos en la solución salina y utilizando una asa de platino (asa de Henle con una capacidad de 5  $\mu\text{L}$ ) esterilizada y enfriada entre un estriado y otro, se tomó una asada de cada microorganismo en su turno y se estrió en un patrón radial en cada caja petri siguiendo la plantilla.



**Figura N°1 PATRÓN RADIAL PARA EL RAYADO DE MICROORGANISMOS.**

Las suspensiones de los microorganismos deben ser agitadas de tiempo en tiempo para evitar la sedimentación.

El estriado es más seguro si se lleva a cabo desde el límite de las cajas petri hasta el centro de la caja sin llegar exactamente al centro.

Si se va a compartir la labor del estriado un investigador debe estriar todas las cajas Petri con un microorganismo dado.

Cuando todas las cajas Petri hayan sido estriadas con todos los microorganismos se invierten y se incuban a 37 °C por 24-48 horas. Se incuban boca abajo para evitar que gotas de agua condensada puedan caer sobre los microorganismos y dispersen su crecimiento.

## Día 4 y 5

### 1. LECTURA DE RESULTADOS

Las cajas se sacan de la incubadora y fueron examinadas el día cuatro.

Si todos los cultivos crecieron, el examen es válido. Si alguno no creció se debe, reincubar y leer el día cinco.

Las cajas Petri se sacan de la incubadora y se examinan, es más apropiado realizar la lectura al quinto día.

Hay actividad antibiótica cuando no hay crecimiento visible en las cajas rayadas. La concentración inhibitoria mínima (CIM) es la menor concentración de las diluciones en la cual no hay crecimiento del microorganismo.

A = Activo

P= Parcialmente Activo

I= Inactivo

Si el microorganismo es morfológicamente alterado, por ejemplo si *P. aeruginosa* no muestra su pigmento verde característico, o si no crece bien, la caja puede ser registrada como P.

Las cajas Petri de control debe tener la apariencia esperada (crecimiento en todas las líneas en las cajas de control negativo y la potencia apropiada en las cajas de control positivo de sulfato de estreptomicina), de no ser así, el experimento ha fallado y debe ser repetido.

La presencia de pocas colonias en una raya es señal de resistencia. La presencia de pocas colonias aisladas en la caja lejos de la línea rayadas, es señal de contaminación se pueden generalmente ignorar.

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 3.1 ANÁLISIS DE LA ESPECIE VEGETAL

##### 3.1.1 PRUEBAS DE CONTROL DE CALIDAD DE LA ESPECIE VEGETAL

Para el análisis de control de calidad, se utilizó Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*), la materia prima fue adquirida directamente de Jambi Kiwa.

##### 3.1.1.1 COMPROBACIÓN TAXONÓMICA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA:

La identificación se realizó mediante procesos directos de hojas y tallos de las plantas, es decir: comparándolas con descripciones pormenorizadas de las plantas en literaturas especializadas de las especies vegetales usadas.

Estas dos plantas son introducidas una de las cuales es *Rosmarinus officinalis* y la otra planta es *Thymus vulgaris* y ambas pertenecen a la familia las Lamiaceae.

##### 3.1.2 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO CUANTITATIVO

Mediante el empleo de los métodos físico-químicos de análisis puede determinarse y establecerse la calidad de una droga, así como completar su identificación.

**CUADRO Nº 1 DETERMINACIÓN DE CENIZAS TOTALES, HUMEDAD Y SUSTANCIAS SOLUBLES DE ROMERO Y TOMILLO. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>ROMERO</b>	<b>TOMILLO</b>	<b>LIMITE</b>
CENIZAS TOTALES (%)	8.25	9.23	Max. 12%
HUMEDAD (%)	12.69	13.18	8-14%
SUSTANCIAS SOLUBLES (mg/g)	0.3778	0.560	-

Al obtener los resultados de estandarización de la droga cruda (Cuadro Nº 1) el cual se realizó en hojas y tallos previamente secados se obtuvo porcentajes que se encuentran dentro de los valores normales según la OMS proporcionando así un alto porcentaje de confiabilidad en la materia prima tratada.

El porcentaje de Humedad para el romero es del 12.69 % y para el tomillo 13.18 % resultados que se encuentran dentro de los rangos establecidos lo cual disminuye la aparición de contaminación principalmente por hongos debido al alto contenido de agua.

La cantidad de cenizas totales para el romero y para el tomillo es baja debido a que el contenido de agua ha disminuido permitiendo que los elementos minerales se encuentren en mayor concentración según Solís P. 2004 (57).

### **3.1.3 CUANTIFICACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL:**

**CUADRO Nº 2 DETERMINACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO Y TOMILLO. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

<b>DETERMINACIÓN</b>	<b>ROMERO</b>	<b>TOMILLO</b>
CUANTIFICACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL (%)	0.41	0.82

En el tomillo el aceite esencial se encuentra en un rango de 0,8 – 2,5 % y presenta fundamentalmente timol (40%), alcanfor (16%) y carvacrol (14.6%), mientras que en el romero el aceite esencial se encuentra en un 0,5 -2% compuesto principalmente por hidrocarburos monoterpénicos tales como el  $\alpha$  pineno 25%, alcanfor (25%) y ésteres terpénicos (50%) según Alonso, J. 2004 (7).

Según los resultados obtenidos en el Cuadro N° 2 la cantidad de aceite esencial en el tomillo es la apropiada a comparación del romero cuyo porcentaje de aceite esencial es bajo con respecto a los datos de referencia. esta cantidad depende de distintos factores como las condiciones agronómicas del suelo, las malezas presentes que compiten por nutrientes con la planta, el momento en el que se cosechan y las partes usadas para la extracción según la OMS 2009 (46).

### 3.1.4 DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES

CUADRO N° 3 DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES DE ROMERO Y TOMILLO. LABORATORIO DE MICOBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.

DETERMINACIÓN	ROMERO	TOMILLO	LIMITE
AEROBIOS TOTALES	407 UFC /g	328 UFC /g	Max. $1 \times 10^7$ UFC/ g
MOHOS Y LEVADURAS	15 UFC /g	12 UFC /g	Max. $1 \times 10^4$ UFC/ g
COLIFORMES TOTALES	Ausencia	Ausencia	100 – 400 NMP/g
SALMONELLA	Ausencia	Ausencia	----

En el Cuadro N °3 se indica si existe contaminación de la droga cruda antes de su utilización y procesamiento además permite evaluar las condiciones higiénicas de cultivo, cosecha y almacenamiento de las plantas para de esta manera detectar una posible contaminación o alteración de las mismas según Solís P. 2004 (57).

El estudio del número y tipo de microorganismos nos demuestra que la materia prima utilizada para los estudios se encuentra dentro de los parámetros establecidos según la OMS y la FAO

### 3.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICO Y HEXÁNICO.

CUADRO Nº 4 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE ROMERO Y TOMILLO. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.

PLANTA	EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO	EXTRACTO HEXÁNICO
ROMERO	290 mL	120mL
TOMILLO	143mL	87mL

En el Cuadro Nº4 se especifica la cantidad de extracto que se obtuvo para el análisis mediante el método de maceración a partir de 100 g de muestra reducida a pedazos de tamaño apropiado de romero y tomillo.

#### 3.2.1 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICO Y HEXÁNICO.

DETERMINACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS EXTRACTOS DE *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris*.

CUADRO Nº 5 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS EXTRACTOS DE ROMERO. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.

PLANTA	EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO	EXTRACTO HEXÁNICO
ASPECTO	Líquido	Líquido
COLOR	Café oscuro	Café claro
OLOR	Característico	Característico
DENSIDAD RELATIVA	0.999	0.615
pH	7.47	7.10
INDICE DE REFRACCIÓN	1.346	1.407

**CUADRO N° 6 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS EXTRACTOS DE TOMILLO. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

<b>PLANTA</b>	<b>EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO</b>	<b>EXTRACTO HEXÁNICO</b>
ASPECTO	Líquido	Líquido
COLOR	Café claro	Verde claro
OLOR	Característico	Característico
DENSIDAD RELATIVA	0.973	0.628
pH	6.69	6.62
INDICE DE REFRACCIÓN	1.370	1.363

Dentro de los procesos directos de identificación de la materia utilizada están las características organolépticas, y se indica en los Cuadros N° 5 y 6.

De las hojas y tallos de romero y tomillo se obtuvo extractos hidroalcohólicos y hexánicos y se evidencia una clara diferencia en el color de los extractos hidroalcohólicos y hexánicos.

El olor en ambos extractos es el característico de la planta, el pH es ligeramente ácido para los extractos de tomillo y el pH de los extractos de romero son neutros.

### 3.3 ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO CUALITATIVO

#### 3.3.1 REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN:

**CUADRO Nº 7 REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN PARA DETERMINAR GRUPOS FITOQUÍMICOS EN EXTRACTOS HIDROALCÓLICOS DE Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

DETERMINACIÓN	GRUPO FITOQUÍMICO	E. HIDROALCOHÓLICO DE ROMERO	E. HIDROALCOHÓLICO DE TOMILLO
Dragendorff	Alcaloides	+	+
Mayer	Alcaloides	+	+
Sudán	Aceites y grasas	+++	+++
Borntrager	Quinonas	+	+
Lieberman-Buchard	Triterpenos-esteroides	+	+
Resinas		+	++
Fehling	Azúcares reductores	+	+
Espuma	Saponinas	+	+
Cloruro férrico	Fenoles – taninos	+	++
Shinoda	Flavonoides	+++	++

+++ Muy positivo o evidente. ++ Positivo, + Ligeramente positivo. - Negativo.

**CUADRO Nº 8 REACCIONES DE CARACTERIZACIÓN PARA DETERMINAR GRUPOS FITOQUÍMICOS EN EXTRACTOS HEXÁNICOS. DE Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*). LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

DETERMINACIÓN	GRUPO FITOQUÍMICO	E. HEÁNICO DE ROMERO	E. HEXÁNICO DE TOMILLO
Dragendorff	Alcaloides	+	+
Mayer	Alcaloides	+	+
Sudán	Aceites y grasas	+++	+++
Borntrager	Quinonas	+	+
Lieberman-Buchard	Triterpenos-esteroides	++	++
Baljet	Lactonas y cumarinas	+	+

+++ Muy positivo o evidente. ++ Positivo, + Ligeramente positivo. - Negativo.

En los Cuadros N° 7 y 8 se puede observar los resultados de los principales grupos fitoquímicos o metabolitos secundarios investigados en las hojas y tallos de romero y tomillo determinados en los extractos hidroalcohólicos y hexánicos.

Se han analizado cualitativamente mediante pruebas colorimétricas y precipitación los cuales permiten una rápida identificación con reactivos sensibles y reproducibles.

Se obtuvieron respuestas positivas para una gran diversidad de grupos funcionales; se comprobó la presencia de flavonoides y aceites en mayor cantidad en los extractos de ambas plantas estos resultados que coinciden con los reportados en la literatura para cada una de estas especies Según Alonso, J. 2004. (7).

También se determinó que los extractos de romero tienen poca evidencia de taninos, alcaloides y saponinas y para el extracto de tomillo se identificó una mínima cantidad de quinonas, alcaloides y azúcares.

### **3.3.2 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO:**

#### **A. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA FLAVONOIDES.**

Se realizó una cromatografía en capa delgada para identificar flavonoides en extractos hidroalcohólicos y hexánicos de romero y tomillo de acuerdo a las siguientes condiciones:

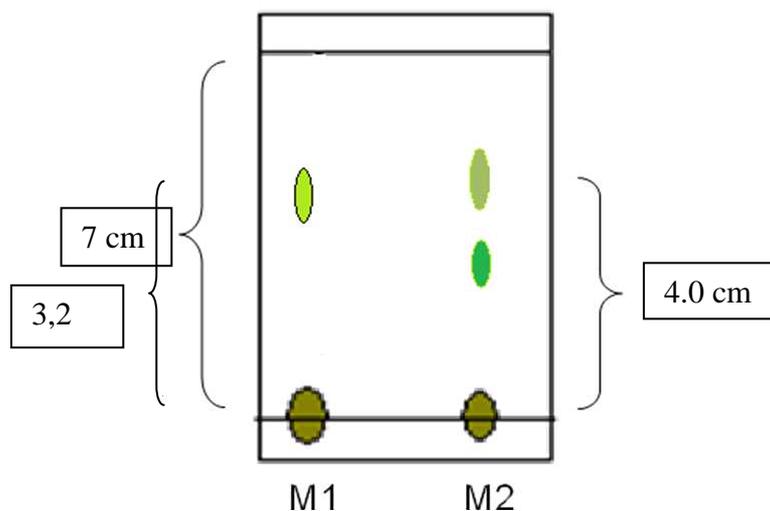
ADSORBENTE: Sílica gel 60F<sub>254</sub>

SISTEMA DE SOLVENTES PARA CROMATOGRAFÍA:

Acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:27)

REVELADOR: Sulfato de vainillina.

Se analizaron las diferentes fracciones obtenidas en extractos hidroalcohólicos de romero y tomillo.



**GRAFICO N° 3. CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE ROMERO Y TOMILLO.**

**M1.-** Residuo del extracto hidroalcohólico de romero.

**M2.-** Residuo del extracto hidroalcohólico de tomillo.

Como podemos observar no hubo una buena separación de los productos tanto para los extractos de romero y tomillo.

Para el caso del extracto hidroalcohólico de romero se obtuvo un  $R_f=0.45$ , lo que asegura que se trata del ácido clorogénico compuesto presente en el romero según Alonso, J. 2004 (7).

Para el caso del extracto hidroalcohólico de tomillo.  $R_f= 0.57$  podemos apreciar una mancha, de coloración amarillo- verdusco al revelar con Sulfato de Vainillina.

## **B. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA ACEITES ESENCIALES.**

Se realizó una cromatografía en capa delgada para identificar la presencia de aceites esenciales en extractos hidroalcohólicos y hexánicos de romero y tomillo de acuerdo a las siguientes condiciones:

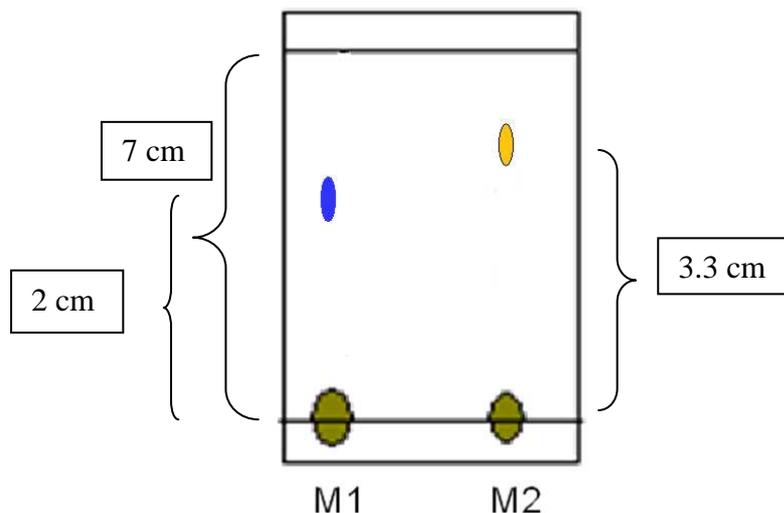
ADSORBENTE: Sílica gel 60F<sub>254</sub>

SISTEMA DE SOLVENTES PARA CROMATOGRAFÍA:

Tolueno: Acetato de etilo (93:7)

REVELADOR: Vainillina- ácido sulfúrico.

Se analizaron las diferentes fracciones obtenidas en extractos de romero y tomillo.



**GRAFICO N° 4. CROMATOGRAMA OBTENIDO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE EXTRACTOS DE ROMERO Y TOMILLO.**

**M1.-** Residuo del extracto hexánico de romero.

**M2.-** Residuo del extracto hexánico de tomillo.

En el caso de las fracciones de los extractos M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>, podemos apreciar la aparición de manchas bastante definidas, de coloración azul intenso al revelar con Vainillina: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; se determina un R<sub>f</sub>= 0,28 para el extracto hexánico de romero lo cual indica que es 1,8-cineol cuyo R<sub>f</sub> = 0,25 – 0,45 según Wagner (61). Para el extracto de tomillo se identificó un R<sub>f</sub> = 0,47 que corresponde al compuesto activo timol

### 3.3.3 CUANTIFICACIÓN DE TANINOS

Por medio del método del permanganato de potasio se pudo obtener el porcentaje de taninos presentes en los distintos extractos de romero y tomillo, cuyos resultados se especifican en el Cuadro N° 9 y 10

**CUADRO Nº 9 CUANTIFICACIÓN DE TANINOS EN EXTRACTOS DE ROMERO. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

DETERMINACIÓN	E. HIDROALCOHÓLICO DE ROMERO	E. HEXÁNICO DE ROMERO
PORCENTAJE DE TANINOS	0.0145	0.0342

**CUADRO Nº 10 CUANTIFICACIÓN DE TANINOS EN EXTRACTOS DE TOMILLO. LABORATORIO DE FITOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

DETERMINACIÓN	E. HIDROALCOHÓLICO DE TOMILLO	E. HEXÁNICO DE ROMERO
PORCENTAJE DE TANINOS	0.0373	0.081

Los taninos son sustancias de alto peso molecular, complejos polímeros de ácidos fenólicos, algunos contienen además azúcares; su presencia en el tomillo es de 7 – 10 % por lo que los datos obtenidos demuestran una mínimo porcentaje de taninos según Alonso, J. 2004 (7).

### 3.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA:

**CUADRO Nº 11. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL SULFATO DE ESTREPTOMICINA FRENTE A LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

MICROORGANISMOS	5000 µg/ml	2500 µg/ml	1250 µg/ml	625 µg/ml	312.5 µg/ml	156.2 µg/ml	78.1 µg/ml	39 µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	P	P	P	P	P	P	P	P
<i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 14028	P	P	P	P	P	P	P	P
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	A	A	A	A	A	A	P	P
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	A	A	A	A	A	P	P	P
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	A	A	A	A	A	P	P	P

Interpretación: A (activo), P (parcialmente activo), I (inactivo)

En el cuadro N° 11 se indica la actividad inhibitoria en el control positivo con el sulfato de estreptomicina dando como resultado actividad parcial para *S. aureus* y *S. tiphymurium* en todas las concentraciones y mayor actividad frente a *K. pneumoniae*, *C. albicans* y *P. aeruginosa*.

**CUADRO N° 12 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE ROMERO. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

<b>MICROORGANISMOS</b>	<b>10000</b> µg/ml	<b>1000</b> µg/ml	<b>100</b> µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	P	I	I
<i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 14028	I	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	I	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	P	P	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	P	P	I

A =Actividad P= Parcialmente activo I= Inactivo

**CUADRO N° 13 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE ROMERO. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

<b>MICROORGANISMOS</b>	<b>10000</b> µg/ml	<b>1000</b> µg/ml	<b>100</b> µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	I	I	I
<i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 14028	P	P	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	P	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	P	P	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	P	P	I

A =Actividad P= Parcialmente activo I= Inactivo

Como se puede observar en los Cuadros N °12 y 13 la mayor capacidad de inhibición en ambos extractos se encuentra en la concentración de 10000(µg / mL). Para el caso del extracto hidroalcohólico se observó una actividad parcial frente a *C. albicans* y *P. aeruginosa*, mientras que el extracto hexánico a más de los microorganismos antes mencionados posee una actividad parcial frente a *S. tiphymurium* y *K. pneumoniae*.

Estudios realizados demostraron que los solventes orgánicos tienen mayor extracción de los componentes activos de las plantas en general, encontrando mayor actividad antimicrobiana en los extractos obtenidos con hexano según la OMS 2009 (46).

**CUADRO N° 14 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE TOMILLO. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

<b>MICROORGANISMOS</b>	<b>10000 µg/ml</b>	<b>1000 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	P	P	I
<i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 14028	P	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	P	P	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	P	I	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	P	I	I

A =Actividad    P= Parcialmente activo    I= Inactivo

**CUADRO N°15 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE TOMILLO. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

<b>MICROORGANISMOS</b>	<b>10000 µg/ml</b>	<b>1000 µg/ml</b>	<b>100 µg/ml</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	P	I	I
<i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 14028	P	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	P	P	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	P	P	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	P	P	I

A =Actividad    P= Parcialmente activo    I= Inactivo

En los cuadros 14 y 15 se pudo observar que la actividad inhibitoria se encuentra entre el rango de concentración de 10000 y 1000 (µg / mL), ambos extractos presentan mayor inactividad frente a *S. aureus* y *C. albicans*.

Del Tomillo se conoce que su extracto acuoso actúa frente a *S. aureus* y su aceite esencial presenta actividad frente a *E. coli* y *C. albicans* según Alonso J. 2004(7).

Otros estudios han concluido que el efecto antimicrobiano está asociado con aceites esenciales que contengan carvacrol y timol los cuales tienen mayor rendimiento antibacterial según la OMS 2009 (46).

**CUADRO Nº 16 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MEZCLA DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS DE ROMERO Y TOMILLO. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

<b>MICROORGANISMOS</b>	<b>10000</b> µg/ml	<b>1000</b> µg/ml	<b>100</b> µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	P	I	I
<i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 14028	P	I	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	P	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	P	P	I
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	P	P	I

A =Actividad    P= Parcialmente activo    I= Inactivo

**CUADRO Nº 17 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MEZCLA DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICOS DE ROMERO Y TOMILLO. LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS. ESPOCH.**

<b>MICROORGANISMOS</b>	<b>10000</b> µg/ml	<b>1000</b> µg/ml	<b>100</b> µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	P	P	I
<i>Salmonella tiphymurium</i> ATCC 14028	P	P	I
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	P	I	I
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	P	P	P
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	P	P	I

A =Actividad    P= Parcialmente activo    I= Inactivo

En los cuadros 16 y 17 se realiza un comparación entre la eficacia de la mezcla de los extractos de las dos plantas.

La actividad antibacteriana se le atribuye a sus distintos componentes para el caso del romero sus compuestos fenólicos como el ácido carnósico, carnosol y ácido rosmarínico y a los principales agentes activos contenidos en el aceite esencial como son: pineno,

canfeno, 1,8 cineol, limoneno, alcanfor, linalol, D-linalol, borneol y su acetato, terpeno y cariofileno. En el tomillo el poder antibacteriano se lo atribuye al timol y carvacrol presentes en el aceite esencial según Alonso J. 2004(6).

A partir de los resultados obtenidos se puede afirmar entonces que la mezcla de los extractos hexánicos poseen mayor actividad inhibitoria que la mezcla hidroalcohólica debido a la mayor concentración de aceites esenciales que actúan disminuyendo el crecimiento de *S. aureus*, *S. tiphymurium*, y *C. albicans* o alterando las características propias del microorganismo como es el caso de *P. aeruginosa* que pierde su pigmento verde .

## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES

1. Mediante el tamizaje fitoquímico realizado a las dos plantas se identificó la presencia de flavonoides, taninos, saponinas y terpenoides entre los compuestos representativos tanto en el romero como en el tomillo.
2. Por medio del método de destilación por arrastre de vapor se pudo determinar que el tomillo contiene 0.82 % de aceite esencial y se estableció el timol como componente representativo con un  $R_f = 0,47$  y para el romero un 0.41 % de aceite esencial y se identificó el 1,8 – cineol con un  $R_f = 0,28$
3. Al establecer una comparación general de la capacidad inhibitoria de los extractos se pudo determinar que los extractos de tomillo presentan mayor actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* y a concentraciones de 10000 y 1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$
4. Al realizar la determinación de la capacidad antibacteriana se establece que la mezcla de los extractos hexánicos a las concentraciones de 10000 y 1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  poseen mejor actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* esto se debe a la presencia de una mayor concentración de aceite esencial.

## **CAPÍTULO V**

### **5. RECOMENDACIONES**

1. Realizar una investigación que permita conocer con mayor detalle el porcentaje de actividad e inactividad de los extractos frente a los distintos microorganismos.
2. Conociendo la actividad inhibitoria de los extractos realizar un seguimiento con la investigación mediante la elaboración de un fitofármaco capaz de poseer propiedades antisépticas contra enfermedades infecciosas.

## CAPITULO VI

### 6. RESUMEN

La investigación de la actividad antibacteriana “*in vitro*” de los extractos de Romero y Tomillo frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Klebsiella pneumoniae*. ATCC 13883, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Pseudomonas aeruginosa*. ATCC 27853 se realizó en los laboratorios de Fitoquímica y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Para el efecto se obtuvo los extractos por maceración de las hojas y tallos en un balón aforado con hexano y alcohol – agua luego se realizó el control de calidad y se evaporó el solvente a baño María. Posteriormente se usó tres concentraciones diferentes y la mezcla de los extractos blandos frente a las distintas bacterias y se comprobó sus propiedades antimicrobianas utilizando el método de Mitscher el cual consiste en la determinación del crecimiento de los microorganismos en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano en este caso los extractos, que se encuentran diluidos en el medio de cultivo.

Luego de 24 y 48 horas de incubación; se observó que los extractos de ambas plantas presentan actividad antibacteriana destacándose la mezcla de los extractos hexánicos a concentraciones de 10000 y 1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  frente a *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* debido a los compuestos fenólicos como el timol, carvacrol y cineol presentes en el aceite esencial por lo que se recomienda la utilización

de la mezcla de los extractos de Romero y Tomillo en infecciones causadas por bacterias y hongos.

## SUMMARY

This investigation is about an antibacterial activity “in vitro” of extracts of rosemary and thyme in front of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Candida albicans* ATCC 10231 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 it was done at the phytoquimics laboratory of microbiology of the Science Faculty at the Politecnics of Chimborazo.

We got the extracts of maceration from the leaves and stems in an hexagon ball with alcohol-water, then we did the quality control and the solvent was evaporated. Then we use 3 different concentration and the mixture of soft extract in front of distinct bacteria, we proved their antimicrobial properties using the Mitscher method which consist in determining the microorganisms growing in presence of growing concentrations of antimicrobial, in this case the extracts are dissolved in cultivate mean.

24 and 48 hours later of incubation we saw that the extract of both plants present antibacterial activity, being outlined the mixture of hexanics extracts in concentrations of 10000 and 1000  $\mu\text{g} / \text{ml}$  in front of *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* due the fenolics components with timol, carvacrol y cineol presents in the essential oil, for this reason we suggest the use of the mixture of rosemary and stem extracts in infections caused for bacterial and fungi.

## **CAPÍTULO VII**

### **7. BIBLIOGRAFÍA**

#### **1. ACEITE ESENCIAL DEL ROMERO.**

<http://somniaaturset.com/familia/4-aceites-esencialespuros?>

2008/12/13

**2. ACEITE ESENCIAL DEL TOMILLO**

[http://www.telefonica.net/web2/applewoods/aceites\\_esenciales.htm](http://www.telefonica.net/web2/applewoods/aceites_esenciales.htm)

2009/03/16

**3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

[http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Biological\\_activity](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Biological_activity)

**4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

[http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Biological\\_activity](http://www.worldlingo.com/ma/enwiki/es/Biological_activity)

2010-04-25

**5. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ROMERO.**

<http://74.125.47.132/seactividad+antibacteriana+del+rosemary+officinali&cd=20&hl=es&ct=clnk&gl=ec&lr=langes>

2008/09/27

**6. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A BACTERIAS GRAM NEGATIVAS DE VOLATILES DE ESPECIES AROMATICAS ADAPTADAS EN JUJUY.**

<http://www.idecefyn.com.ar/clf12002/archivos/064GonzalezCAR.doc>

**7. ALONSO J.** Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos. 1ª ed. Argentina. 2004.  
Pp. 928 - 230 , 1037-1041

**8. ÁLVAREZ, C. y LOCK, O.** Taninos. Revista Química. Perú. Pontificia Universidad Católica del Perú. Pp. 47-63.

**9. ANTIBIÓTICOS NATURALES**

<http://www.botanical-online.com/medicinalsan Antibioticosnaturales.htm>

2008/07/16

**10. APLICACIONES DEL ROMERO.**

<http://www.ecoaldea.com/plmd/romero.htm>

**11. APLICACIONES Y USOS DEL ROMERO.**

<http://www.internatura.org/guias/plantas/romero.html>

2206/05/12

**12. BRACK, A.** Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Cusco PNUD. 1999.

**13. CÁCERES, A.** Plantas de Usos medicinal en Guatemala: Universidad de San Carlos. 1996.

**14. CANDIDA ALBICANS**

[http://es.wikipedia.org/wiki/Candida\\_albicans](http://es.wikipedia.org/wiki/Candida_albicans)

2009/10/22

**15. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE SALMONELLA**

<http://martinez-roberto.blogspot.com/2009/06/caracteristicas-coloniales-y.html>

**16. CORREA, JE Y BERNAL, HY.** Especies Vegetales Promisorias de los Países Suramericanos.

**17. CYTED.** Directorio de la Red Iberoamericana de Productos Fito farmacéuticos de Guatemala. 2002. Pp. 3-10.

**18. DEMUESTRAN LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANAS DEL ROMERO**

[http://www.diarioc.com.ar/salud/Demuestran\\_las\\_propiedades\\_antioxidantes\\_y\\_antibacterianas\\_del\\_romero/116574](http://www.diarioc.com.ar/salud/Demuestran_las_propiedades_antioxidantes_y_antibacterianas_del_romero/116574)

2009/04/17

19. **DÍAZ, R., GAMAZO, C.** Manual de Técnicas de Investigación. Subprograma X. Química Fina Farmacéutica. 1995 Pp. 63-67.
20. **DIVO, A.** Microbiología médica. 4<sup>a</sup> ed. México. Interamericana. 1990. Pp. 158,159.
21. **DOMÍNGUEZ, X.** Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Limusa. 1979. Pp. 243.
22. **EL ROMERO (*ROSMARINUS OFFICINALIS*)**  
  
<http://www.medizzine.com/plantas/romero.php>  
2008/12/24
23. **ENFERMEDADES BACTERIANAS**  
  
<http://es.wikipedia.org/wiki/Bacteria>  
2009/10/22
24. ***ESCHERICHIA COLI***  
  
[http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](http://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)  
2009/10/20
25. **ESPECTRO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *ROSMARINUS OFFICINALIS L***  
  
[http://bases.bireme.br/=LILACS&nextAction==448215&label=Espectro antimicrobiano do óleo essencial de Rosmarinus officinalis LÇ](http://bases.bireme.br/=LILACS&nextAction==448215&label=Espectro+antimicrobiano+do+óleo+essencial+de+Rosmarinus+officinalis+LÇ)  
2007/09/16
26. **ESTUDIO DE LA EFICACIA ANTIBIÓTICA DE UN EXTRACTO ETANÓLICO DE *ROSMARINUS OFFICINALIS L*. CONTRA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN DOS MODELOS DE INFECCIÓN EN PIEL DE RATÓN**

<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Pr9Z4yUKXFUJ:redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/856/85611774009.pdf>

**27. ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE EL ROMERO**

<http://www.inta.gov.ar/info/intainfo/doc/caracteristicas.pdf>.

2002/07/23

**28. FITOMEDICINA: PASADO Y PRESENTE.**

<http://web.sinectis.com.ar/fitomedicina/Introfito.html>.

2006/05/28.

**29. FONNEGRA, R. JIMÉNEZ, S.** Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 1999 Pp. 172, 173, 174.

**30. KINGBUEG, D. Manual de microbiología médica. 1991**

**31. *KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

[http://es.wikipedia.org/wiki/Klebsiella\\_pneumoniae](http://es.wikipedia.org/wiki/Klebsiella_pneumoniae)

**32. LA FITOTERAPIA.**

<http://www.salud.net/index.php?optiofitoterapia=192.html>

**33. MACERACIÓN**

<http://es.wikipedia.org/wiki/Maceraci%C3%B3n>

2008/11/20

**34. MARCANO, D.** Fitoquímica Orgánica. Caracas. Litopar. 1991. Pp. 258.

**35. MÉTODOS DE OBTENCIÓN**

[http://www.natureduca.com/med\\_usos\\_extraccion2.php](http://www.natureduca.com/med_usos_extraccion2.php)

**36. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN ANTIBACTERIANA**

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap11.htm>

**37. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO (*Thymus vulgaris*) UTILIZADO EN BIODIVERSIDAD DE PRODUCTOS FITOFARMACÉUTICOS.**

[http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/investigacio\\_files/INFORMES/PUIDI/INF-2001-075.pdf](http://digi.usac.edu.gt/bvirtual/investigacio_files/INFORMES/PUIDI/INF-2001-075.pdf)

2010/09/21

**38. PLANTAS MEDICINALES**

[http://www.elicriso.it/es/plantas\\_medicinales/romero/#impiego](http://www.elicriso.it/es/plantas_medicinales/romero/#impiego)

2007/07/11

**39. PLANTAS MEDICINALES**

<http://plantasquecuran.com/plantas-medicinales/romero.html>

2008/11/03

**40. PROPIEDADES CURATIVAS DEL ROMERO.**

<http://www.nutricion.pro/12-02-2008/suplementos-dietarios/las-propiedades-curativas-del-romero>

2008/02/12

**41. PROPIEDADES DEL ROMERO.**

<http://www.alimentacionsana.com.ar/Informaciones/novedades/romero.htm>

2009/10/22

**42. PROPIEDADES DEL ACEITE DE TOMILLO**

<http://propiedadesdelaceite.jaimaalkauzar.es/propiedades-del-aceite-de-tomillo.html>

2007/05/30

**43. PROPIEDADES Y BENEFICIOS DEL ROMERO.**

<http://saludydietas.com.ar/2008/05/14/las-propiedades-y-beneficios-del-romero/>

2008/11/24

**44. PROPIEDADES DE LA PLANTA TOMILLO**

<http://propiedadesplantas.jaimaalkauzar.es/propiedades-de-la-planta-tomillo.html>

2007/06/18

**45. PSEUDOMONA AERUGINOSA**

[http://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas\\_aeruginosa](http://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa)

2009/07/22

**46. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS Y ENSAYO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *A. sativum*, *C. sativum*, *R. officinalis*, *T. vulgaris*, *E. Caryophyllata* y *O. vulgare* FRENTE A *Clostridium perfringens*.**

[http://200.21.104.25/biosalud/downloads/Revista%208\\_6.pdf](http://200.21.104.25/biosalud/downloads/Revista%208_6.pdf)

2009/01/08

**47. PREPARCIÓN Y USOS DEL TIMOL**

[http://74.125.47.132/search?q=cache:K1qi7dqHZgJ:www.agomeat.com/attachm3nt5/ApiculturaTmol.doc+THYMUS+VULGARIS\\_es](http://74.125.47.132/search?q=cache:K1qi7dqHZgJ:www.agomeat.com/attachm3nt5/ApiculturaTmol.doc+THYMUS+VULGARIS_es)

**48. ROMERO**

<http://cromatografia.uis.edu.co/cromatografia/investigacion/cibimol/tesis%20cibimol/Edwin%20Bottia%20y%20Adriana%20Vargas.pdf>

2009/09/28

**49. ROMERO (*Rosmarinus officinalis*)**

<http://www.ecoaldea.com/plmd/romero.htm>

2004/05/28

50. ***Rosmarinus officinalis***

<http://www.euroresidentes.com/Alimentos/hierbas/romero.htm>

2000/11/17

51. ***Rosmarinus officinalis***

<http://www.zonaverde.net/rosmarinusofficinalis.htm>

2008/07/11

52. **ROMERO, ROSMARINO**

<http://articulos.infojardin.com/aromaticas/Fichas/Romero.htm>

2009/01/13

53. ***SALMONELLA TIPHYMURIUM***

[http://www.vet-uy.com/articulos/artic\\_avic/010/avic010.htm](http://www.vet-uy.com/articulos/artic_avic/010/avic010.htm)

[2004/03/01](http://www.vet-uy.com/articulos/artic_avic/010/avic010.htm)

54. ***SALMONELLA***

<http://martinez-roberto.blogspot.com/2009/06/caracteristicas-coloniales-y.html>

55. **SAMANIEGO, M.** Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de Matico para la elaboración de un fitofármaco, Tesis Doc. Bioquímica Farmacéutica. Riobamba Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. 2007 Pp. 63 -69

56. ***STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

<http://staphylococcus-aureus.blogspot.com/>

57. **SOLIS P. GUERRERO N. GATTUSO M. CÁCERES A.** Manual de caracterización y análisis de drogas vegetales y productos fitoterapéuticos. Pp 16,43-91.
58. **THYMUS VULGARIS**  
<http://www.interhiper.com/medicina/fitoterapia/tomillo.htm>  
2003/10/15
59. **TOMILLO**  
<http://www.todamedicinaalternativa.com/hierbas-medicinales/tomillo.html>
60. **TOMILLO (THYMUS VULGARIS)**  
[http://www.natureduca.com/med\\_espec\\_tomillo.php](http://www.natureduca.com/med_espec_tomillo.php)
61. **WAGNER.** Plant Drug Analysis. Berlin: Springer – Verlag, 1983

## ANEXOS

**ANEXO N°.1** FICHA BOTÁNICA DEL ROMERO (*Rosmarinus officinalis*)



Las hojas, las flores y los frutos contienen una esencia compuesta principalmente de pineno, canfeno y cineol. El romero tiene propiedades estimulantes y antiespasmódicas, facilita la secreción biliar, es tónico, estomacal, algo diurético y regulariza la menstruación. En uso externo tiene aplicaciones en los casos de reumatismos articulares, contusiones, heridas y eccemas.

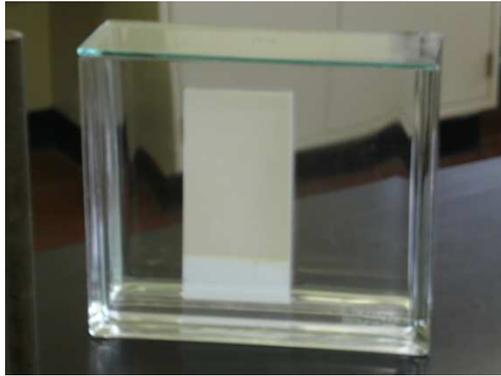
**ANEXO N° 2      RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO  
SEGÚN EL MÉTODO DE EXTRACCIÓN.**

<b>REPETICIÓN</b>	<b>DESTILACIÓN CON AGUA</b>	<b>DESTILACIÓN CON VAPOR DE AGUA</b>	<b>DESTILACIÓN CON AGUA Y VAPOR DE AGUA</b>
1	0.036	0.1757	0.2543
2	0.0715	0.1698	0.226
3	0.0978	0.1206	0.1966

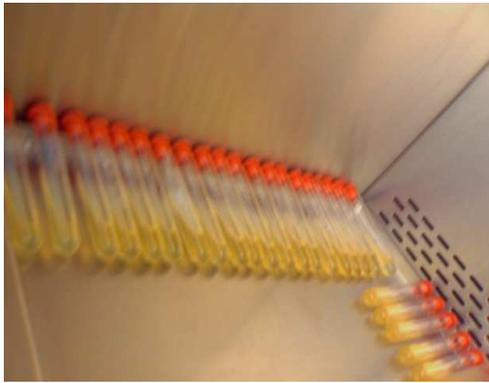
**ANEXO N° 3 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DETOMILLO**

<b>Composición Química del Aceite Esencial de Tomillo</b>			
<b>Métodos</b>	<b>%Timol</b>	<b>%Carvacrol</b>	<b>%p-cimeno</b>
Destilación Con Agua	23.55	4.71	16.26
	25.96	5.05	14.73
	26.24	5.56	16.1
Destilación Con Vapor de Agua	31.38	4.99	15.77
	24.72	2.34	12.46
	34.31	6.47	14.59
Destilación Con Agua y Vapor de Agua	25.19	4.94	16.25
	32.25	5.49	13.26
	23.14	4.03	18.65

**ANEXO N° 4 CROMATOGRAFÍA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES EN LOS EXTRACTOS**



**ANEXO N° 5 TÉCNICA DE MITSCHER PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIA IN VITRO.**



**ERLENMEYER CON TSB**



**TUBOS INCLINADOS CON TSA**



**PREPARACIÓN DE AGAR TSA EN CAJAS PETRI Y SUSPENSIONES DE MICROORGANISMOS**



**ESTRIADO DE LOS MICROORGANISMOS Y LECTURA DE LOS  
RESULTADOS**