



---

UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES  
CHIMBOTE

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y**  
**BIOQUÍMICA**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DE LOS**  
**ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS DE *Thymus***  
***vulgaris* (TOMILLO) Y *Rosmarinus officinalis* (ROMERO)**  
**FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli*.**

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

**AUTOR**

**CARRILLO SANTISTEBAN, JAVIER**

**ASESOR**

**Mgtr. LEAL VERA, CÉSAR ALFREDO**

**TRUJILLO - PERÚ**

**2018**

JURADO EVALUADOR DE TESIS.

Dr. Jorge Luis Díaz Ortega

**Presidente**

Mgtr. Nilda María Arteaga Revilla

**Miembro**

Mgtr. Luisa Olivia Amaya Lau

**Miembro**

Mgtr. César Alfredo Leal Vera

**Asesor**

## AGRADECIMIENTO

*A Dios, por guíame en cada paso de mi vida, por darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentan y sobre todo por estar siempre conmigo y bendecirme cada día de mi vida.*

*A mis tíos Elena y Eladio que siempre estuvieron brindándome su apoyo y enseñándome a nunca darme por vencido.*

*A la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote por abrirme las puertas para formarme profesionalmente.*

## DEDICATORIA

*A mi madre por su apoyo, comprensión, consejos y ese gran amor que me tiene. Además por ayudarme en los momentos más difíciles de mi vida.*

*A mis abuelos Manuel y María que las personas que más se preocupan por mí y que me enseñaron muchas cosas vitales para la vida.*

*A mi familia por estar siempre conmigo mostrándome el camino de la superación.*

***“El único modo de hacer un gran trabajo es amar lo que haces”***

***Steve Jobs.***

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar el efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de las hojas de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), frente a cepas de *Escherichia-coli*. Mediante el método de difusión de disco se conoció el grado de sensibilidad en función al tamaño de halo de inhibición de los aceites esenciales frente al microorganismo. Como resultados se determinó que los aceites esenciales de las hojas de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero) a distintas concentraciones (5%, 10%, 25% y 100%) mostraron tener efecto antibacteriano según la escala de Duraffourd para inhibir el crecimiento y desarrollo de la cepas de *Escherichia-coli*, sin embargo a las pruebas de significancia estadística se le atribuye mayor poder antibacteriano a *Rosmarinus officinalis* (romero). Se concluye que los aceites esenciales de las hojas de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), si presentan poder antibacteriano sobre a cepas de *Escherichia coli*.

**Palabras claves:** Aceites esenciales, *Escherichia coli*, halo de inhibición, tomillo, romero.

## ABSTRACT

The objective of this research is to evaluate the in vitro antibacterial effect of the essential oils of the leaves of *Thymus vulgaris* (thyme) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary), against strains of *Escherichia coli*. By means of the disc diffusion method, the degree of sensitivity according to the size of the inhibition zone of the essential oils against the microorganism was known. As results it was determined that the essential oils of the leaves of *Thymus vulgaris* (thyme) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary) at different concentrations (5%, 10%, 25% and 100%) showed to have antibacterial effect according to the Duraffourd scale to inhibit the growth and development of the strains of *Escherichia coli*, however, to the tests of statistical significance is attributed greater antibacterial power to *Rosmarinus officinalis* (rosemary). It is concluded that the essential oils of the leaves of *Thymus vulgaris* (thyme) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary), if they have antibacterial power on strains of *Escherichia coli*.

**Key words:** Essential oils, *Escherichia coli*, inhibition halo, thyme, rosemary.

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTO.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	8
III. HIPÓTESIS.....	21
IV. METODOLOGÍA.....	22
4.1 Diseño de investigación.....	22
4.2 Población y muestra.....	22
4.3 Definición y operacionalización de variables e indicadores.....	24
4.4 Técnica e instrumentos de recolección de datos.....	25
4.5 Plan de análisis.....	31
4.6 Matriz de consistencia.....	32
4.7 Principios éticos.....	34
V. RESULTADOS.....	35
5.1 Resultados.....	35
5.2 Análisis de resultado.....	38
VI. CONCLUSIONES.....	42
VII. RECOMENDACIONES.....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS.....	53

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 01.</b> Actividad antibacteriana in vitro por diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de <i>Thymus vulgaris</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas expresados en halo de inhibición (mm).....	35
<b>Tabla 02.</b> Actividad antibacteriana in vitro por diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas expresados en halo de inhibición (mm).....	36
<b>Tabla 3.</b> Sensibilidad in vitro de <i>Escherichia coli</i> frente a diferentes concentraciones de los aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i> las 24 horas según la escala de Duraffourd .....	37
<b>Tabla 04.</b> Comparación de la actividad antibacteriana in vitro entre diferentes concentraciones de los aceites esenciales de las hojas de <i>Thymus vulgaris</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i> sobre <i>Escherichia coli</i> a las 24 horas mediante el análisis de la varianza	37
<b>Tabla 05.</b> Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo) al 5% frente <i>Escherichia coli</i> .....	53
<b>Tabla 06.</b> Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo) al 10% frente <i>Escherichia Coli</i> .....	53
<b>Tabla 07.</b> Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo) al 25% frente <i>Escherichia Coli</i> .....	54
<b>Tabla 08.</b> Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo) al 100% frente <i>Escherichia Coli</i> .....	54
<b>Tabla 09.</b> Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) al 5% frente <i>Escherichia Coli</i> .....	55
<b>Tabla 10.</b> Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) al 10% frente <i>Escherichia Coli</i> .....	55
<b>Tabla 11.</b> Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) al 25% frente <i>Escherichia Coli</i> .....	56
<b>Tabla 12.</b> Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero) al 100% frente <i>Escherichia Coli</i> .....	56



## ÍNDICE DE CUADROS Y GRÁFICOS.

<b>Cuadro 01.</b> Análisis de varianza de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a nivel <i>in vitro</i> a las 24 horas.....	57
<b>Cuadro 02.</b> Comparación de medias por el método LSD de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a nivel <i>in vitro</i> a las 24 horas.....	57
<b>Cuadro 03.</b> Análisis de varianza de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a nivel <i>in vitro</i> a las 24 horas.....	58
<b>Cuadro 04.</b> Comparación de medias por el método LSD de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a nivel <i>in vitro</i> a las 24 horas.....	58
<b>Cuadro 05.</b> Comparación de medias por el método LSD de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a nivel <i>in vitro</i> a las 24 horas.....	59
<b>Cuadro 06.</b> Comparación de medias por el método LSD de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> a nivel <i>in vitro</i> a las 24 horas.....	60
<b>Gráfico 01.</b> Comparación de promedios de la actividad antibacteriana y su significancia de los aceites de <i>Thymus vulgaris</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i> sobre <i>Escherichia coli</i> a nivel <i>in vitro</i> .....	61

## **I. INTRODUCCIÓN.**

Los seres humanos siempre han buscado hallar la terapéutica en los productos de origen natural, logrando de ellos el vigor suficiente para solucionar sus desordenes sistemáticos y especulativos, es así que el empleo de productos de la naturaleza viene de tiempos muy antiguos desde el inicio de los diferentes géneros. La sugerencia inesperada de una hojuela colocada encima de una lesión puede ocasionar sosiego y un alivio inmediato, por lo cual no pasó desapercibida al ser primario <sup>(1)</sup>.

El uso de las plantas medicinales desde tiempos remotos fueron la principal fuente de obtención de nuevas fórmulas terapéuticas, siendo la atracción de las industrias farmacéuticas, posteriormente esta vanguardia desplazo las utilidades de las mismas ya que pasaron de la utilidad natural a sintetizada. Hoy en día se ve “vuelta a la naturaleza” con la mayor demanda de la utilización de productos medicinales de origen vegetal con fines terapéuticos que ayuden a prevenir, curar, tratar distintas patologías ya que presenta menor agresividad, tienen menor efectos adversos, contraindicaciones e interacciones y es mejor tolerada <sup>(1)</sup>.

Alrededor de los últimos años un 80% de la población mundial ha recurrido a las plantas medicinales para tratar diversas enfermedades o afecciones, porque son accesibles y más baratos que los productos farmacéuticos. En nuestro país la riqueza de las plantas medicinales es muy amplia y está enmarcada dentro de más de 4400 especies de usos conocidos por las poblaciones locales, de las cuales un gran porcentaje se presenta en la región andina <sup>(2)</sup>.

Hoy en día la investigación referente a la medicina tradicional mediante la utilización de vegetales en su hábitat natural así como en forma farmacéutica conlleva a fortalecer la medicina empleada anteriormente por nuestros antepasados y que hoy viene ganando campo en las ciencias.

Conforme a las organizaciones de la salud, la utilización de las vegetales con propiedades medicinales ejercen aproximadamente un porcentaje de mayor los 70 % a su uso, teniendo mayor tendencia en su uso en las zonas de pocos recursos económicos, así mismo reside en sus propiedades terapéuticas que tiene para contrarrestar efectos que ejercen distintas patologías, así mismo determinó en 1978 “planta medicinal es aquella que en uno o más órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o son precursoras de fármacos. Droga vegetal es la parte de la planta medicinal en la que encontramos mayor concentración de principios activos, puede ser la hoja, la flor, la raíz, etc” <sup>(1),(3)</sup>.

La incógnita de vitalidad y la dificultad consecutiva de fármacos especulativos, están remolcando otra vez a la averiguación de diferentes medicamentos tradicionales mediante la utilización y conducción de los vegetales. Estas ejercen un papel muy importante en el crecimiento y la indagación empírica, es así que estos se pueden utilizar como trazo de salida para el incremento y originalidad en la producción de preparados medicinales; es así que el entendimiento de los vegetales con propiedades medicinales han tenido un apogeo rápido y cada momento se sitúa en un relevante espacio como uno de los productos sanitarios alternos en un futuro que promete utilidad y seguridad <sup>(3)</sup>.

Lo primero a destacar en la utilización de plantas medicinales es que cada vez son más las personas interesadas en el abandono de los productos obtenidos a través la manipulación química y buscan remedios exclusivamente naturales. Esta situación ha surgido en parte debido a que cada vez es mayor el contacto que tiene la sociedad con la naturaleza y al hecho de que las plantas han sido en todas las épocas un patrimonio muy importante utilizado por el hombre tanto a modo de alimento, como curativo o incluso se le ha dado un uso cosmético. Así que la utilización de estos vegetales con propiedades terapéuticas ejerce utilidades desde épocas remotas <sup>(4)</sup>.

Desde épocas la medicina natural, siendo principalmente la utilización de plantas con propiedades curativas los principales recursos que tenían los galénicos de esos tiempos, aunque no existían conocimientos para realizar los estudios de manipulación química. Siendo la principal medida que condujo a las indagaciones de aquellos productos medicinales con distintos principios activos, incrementando la producción de nuevas moléculas para usos benéficos de nuestra población <sup>(4),(5)</sup>.

Nuevas exploraciones de nuevos principios activos relacionados como los aceites esenciales los cuales mencionados en la diferentes bibliografías por sus propiedades antimicrobianas, antimicóticas, antioxidantes, etc, siendo capaces también de actuar contra las plagas originarias en las producción de alimentos, con las grandes ventajas de no ocasionar daño a nuestro ecosistema. Los aceites esenciales son de suma importancia ya que la gran mayoría son fáciles de extraer mediante diferentes métodos <sup>(5)</sup>.

Las plantas y sus constituyentes ocupan una posición importante en el conocimiento de nuevas sustancias y principios activos. En nuestro planeta se está optando por la utilización de “productos vegetales”, siendo cada vez menos utilizados los productos de origen sintéticos como manera de no afectar el medio que nos rodea, teniendo mayor relevancia la utilización de plantas medicinales para usos terapéuticos <sup>(5)</sup>.

*Escherichia coli* es una clase bacteriana de notable significación, cómoda y terapeuta. La mayoría de las cepas intestinales de *E-coli*, no son patógenas y coexisten en armonía con el hospedador, no obstaculiza, algunas clases son perjudiciales y pueden causar infecciones intestinales o extra intestinal (infecciones urinarias, septicemia, meningitis, peritonitis, abscesos, mastitis, infecciones pulmonares). *Escherichia coli*, incita en la humanidad de disposición de 360 millones de sucesos de cólicos (diarrea) en el planeta y más de 700.000 muertos alrededor del año, afligiendo básicamente a la humanidad infantil de ciudades en vías de crecimiento. Igualmente, es el agente infeccioso más aprovechador muy frecuente en asociación con infecciones de tracto urinario (ITU) y sepsis generalizada. <sup>(6)</sup>.

En el mundo, se han desarrollado numerosas investigaciones enfocadas a la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades terapéuticas de importancia para el ser humano, se asumen que para las futuras generaciones los aceites esenciales cumplirán papeles importantes en el desarrollo de la salud. Ante esta situación, es conveniente fomentar la búsqueda de nuevos principios activos a partir de fuentes naturales, Por ello la identificación y evaluación de moléculas con actividad biológica, aisladas de fuentes naturales, es cada vez más relevante en los estudios modernos a nivel mundial <sup>(7)</sup>.

La búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana, dentro de la medicina herbolaria tradicional, representa un factor determinante para el tratamiento de las infecciones producidas por microorganismos. Esta situación así como la aparición de efectos indeseables e inesperados de ciertos antibióticos, ha llevado a los científicos a investigar nuevas sustancias antimicrobianas a partir de plantas consideradas popularmente medicinales. Los ensayos realizados hasta el momento revelan que las plantas representan un potencial fuente de nuevos agentes antimicrobianos <sup>(7), (8)</sup>.

Según señala la Organización Mundial de la Salud (OMS) un aproximado del 80% de la población de personas utiliza las plantas con propiedades terapéuticas como principal remedio medicinal, teniendo en los últimos años mayor tendencia e interés por los fitomedicamentos, la medicina tradicional que incluye terapias con medicación basadas en plantas medicinales, se ha incrementado considerable, por lo que se ha tomado la decisión de ocuparse de las formas tradicionales, llegándola a considerar como pilar principal de las presentación de servicio de salud <sup>(9),(10)</sup>.

Las plantas medicinales han adquirido gran importancia en terapias alternativas o complementarias en varias partes de nuestro país y el mundo, tanto *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), tiene características comunes que nos permiten su utilización con fines terapéuticos, estas plantas cuyas propiedades cubren estos aspectos y que más investigaciones ha generado dado a que sus propiedades químicas y sus posibles aplicaciones medicinales para contrarrestar molestias fueron y son empleadas hasta la actualidad.

La inquietud por este problema conlleva a realizar estudios que demuestren efecto terapéutico semejante, iguales o superiores utilizando la medicina tradicional aplicada al uso de plantas con propiedades terapéuticas, en este caso en relación con propiedades antimicrobianas.

Por dicha razón en el presente estudio se planteó la siguiente interrogante.

¿Los aceites esenciales de las hojas de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), tendrán actividad antibacteriana in vitro frente a cepas de *Escherichia coli*?

El propósito del presente estudio es demostrar el efecto antibacteriano in vitro que presentan los aceites esenciales de las hojas de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), frente a cepas del microorganismo *Escherichia coli*, la cual nos permita su utilización con fines terapéuticos (antimicrobianos) como terapia alternativa o complementaria; basándose a los resultados obtenidos los aceites esenciales *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), demuestren tener importantes compuestos biológicos que hagan que sea de mayor interés para los siguientes estudios o formulaciones aplicadas en la medicina.

## OBJETIVOS.

### Objetivo general.

- Demostrar el efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), frente a cepas de *Escherichia-coli*.

### Objetivo específico.

- Determinar la actividad antibacteriana in vitro por las concentraciones de 5%, 10%, 25% y 100% del aceite esencial de *Thymus vulgaris* sobre las cepas de *Escherichia-coli*.
- Determinar la actividad antibacteriana in vitro por las concentraciones de 5%, 10%, 25% y 100% del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre las cepas de *Escherichia-coli*.
- Determinar la sensibilidad in vitro de *Escherichia-coli* frente a diferentes concentraciones de los aceites esenciales *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* según escala de Duraffourd.
- Comparar la actividad antibacteriana in vitro entre diferentes concentraciones de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* sobre *Escherichia-coli* a las 24 horas.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA.

### 2.1 Antecedentes.

Iseppi R, et al, en 2018 Italia, determinaron en su estudio in vitro realizado que los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* L y *Thymus vulgaris* L, presentaron actividad antibacteriana y su combinación frente a las bacterias alimentarias y de descomposición como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas* spp. Obteniendo como resultado que la concentración inhibitoria mínima (C.M.I) más bajos se obtuvieron con los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Thymus vulgaris* (tomillo) contra *Escherichia coli*, y fueron (4 y 8 µL/mL, respectivamente) <sup>(11)</sup>.

Coy et al, en el 2013 Colombia, determinaron La evaluación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de romero, tomillo y cúrcuma, teniendo en cuenta sus patrones utilizados se observaron que existen porcentajes de inhibición altos, incluso comparables con la ampicilina; de acuerdo a ello, de los aceites evaluados frente a la cepa de *S. aureus*, se observaron porcentajes de inhibición de 60 % para el caso del aceite de romero y 70 % en los aceites de tomillo y cúrcuma, respectivamente. Resultando interesante ver que estos dos últimos aceites esenciales se caracterizaron por poseer un porcentaje representativo de mayor índice, con respecto al aceite de romero. Los aceites evaluados presentaron poca o nula inhibición frente a las cepas gramnegativas *E-coli* y *S. tiphy* <sup>(12)</sup>.

Solís, en el 2011 Ecuador, en su estudio realizado busco determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* (orégano) y *thymus vulgaris* (tomillo), como potenciales bioconservadores en carne de pollo, determinando así que los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* L (tomillo) en concentración total sin diluir, presentó un efecto antibacteriano sobre Salmonella y en otras dosis probadas no inhibió a Salmonella <sup>(13)</sup>.

Montoya en el 2017, Lambayeque, en su estudio para determinar el efecto antibacteriano in vitro sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, realizó extractos alcohólicos de *Rosmarinus officinalis*, obteniendo como resultados de mayor relevancia frente a su control positivo Gluconato de clorhexidina al 0,12% que a la misma llegó a superar, presentando la concentración mínima inhibitoria (CMI) del colutorio elaborado a base de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), sobre *Streptococcus mutans* de 2 mg/mL y sobre *Enterococcus faecalis* fue de 5 mg/mL<sup>(14)</sup>.

Rocha, en el 2016 Trujillo, en su estudio “Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre el *Streptococcus mutans* atcc 25175” determinó mediante el método de difusión de discos que los aceites esenciales de romero poseen propiedades antibacterianas sobre el crecimiento de *S mutans*, además de tener dicha facultad en su estudio realizado tuvo relación directa con su concentración por lo cual entendemos que a mayor concentración de aceites esenciales de romero mayor efecto antibacteriano <sup>(15)</sup>.

Lagos, en el 2012 Tacna, realizó un estudio para determinar la eficacia del efecto antimicrobiano en vitro del aceite esencial *Thymus vulgaris* L (tomillo) frente a *Porphyromas gingivalis*. Mediante el método de difusión de disco determinó que el nivel de sensibilidad bacteriano de *Porphyromas gingivalis*, es solamente a concentraciones de 2.76 mg/ml y que las manifestaciones mayores a 3,22 mg/ml los halos de inhibición rebasaron las medidas de las placas en la cual se realizó el estudio. Encontrando así CMI que ejerció *Thymus vulgaris*, fue de 0.31mg/ml. Y la concentración mínima bactericida (CMB), fue de 0.37mg/ml, todo gracias a las concentraciones que obtuvieron de sus componentes, timol 36.50%, carvacrol (1.55%) a quien se le atribuyeron los efectos antimicrobiano <sup>(16)</sup>.

## **2.2. Bases teóricas.**

### **Aceites esenciales.**

Los aceites esenciales son productos caracterizados por fuertes aromas, constituidos por mezclas complejas, siendo su principal característica su gran olor que emite, se encuentran constituidas por componentes sumamente volátiles las cuales son obtenidas de cualquier parte del vegetal mediante métodos de extracción que pueden ser extraídas por la aplicación solvente. Los aceites esenciales son fuentes los olores que emiten pueden ser de cualquier parte de la planta siendo de mayor proporción aquellas aromáticas <sup>(5),(17)</sup>.

### **Localización de los aceites esenciales.**

Los aceites esenciales se pueden encontrar en las diferentes partes de la planta como en las flores, hojas, frutos, corteza, raíces, madera de plantas aromáticas, además en cavidades secretoras, pelos glandulares, en las células de la cascara de cítricos, glándulas, sacos, conductos etc <sup>(5),(17)</sup>.

### **Composición química de los aceites esenciales.**

La composición de los aceites esenciales están relacionadas al vegetal, por lo general estas contienen hidratos de carbonos, monoterpénicos, sesquiterpénicos, terpenoides, no terpenoides, otros contribuyentes comunes son fenilpropanoides, bencenoides, en algunos vegetales los aceites esenciales poseen compuestos azufrados, nitrogenado, etc <sup>(5),(16),(17)</sup>.

### **Extracción de los aceites esenciales.**

#### **Destilación.**

La destilación es un proceso físico de separación que usa el calentamiento de materiales líquidos hasta el punto donde uno o varios de sus componentes más volátiles pasan a la fase de vapor y, a continuación, enfriando este vapor, se pueden separar componentes líquidos a través de la condensación. Procedimiento muy utilizado para extraer aceites esenciales de las flores, frutos, hojas, raíces, semillas y corteza de los vegetales, exponiendo sus deshechos a la acción del vapor de agua <sup>(18)</sup>.

### **Destilación con alcohol.**

La metodología que nos menciona en esta parte está basada en la solubilidad de ciertos componentes de aceites esenciales como los hidratos de carbonos, monoterpenos, compuestos polares, los aceites esenciales que se destilan emiten proporciones de 3-4 veces su volumen en relación a su solvente diluido a 35 % (etanol); siendo una de sus principales ventajas que nos ofrece este método que trabaja a temperaturas bajas los que favorecen obtener una mejor calidad de aceites esenciales <sup>(5),(18)</sup>.

### **Extracción con fluidos supercríticos.**

Los fluidos supercríticos tienen la capacidad de extraer sustancias químicas mediante el uso de determinados solventes, a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. El CO<sub>2</sub> es el fluido con mayor uso debido a sus ventajas de no ser tóxico, corrosivo, inflamable y sobre todo se elimina con facilidad, la extracción con FSC no deja residuos químicos <sup>(19)</sup>.

### **Metodología de extracción por arrastre de vapor.**

Este método se realiza mediante un hidrodestilador, donde parte del vegetal es sumergido a este equipo. Su estado puede ser molido, cortado, entero o la combinación de éstos. El vapor de agua es inyectado mediante un distribuidor interno, que va desde su base y con la presión suficiente para reducir la fuerza hidráulica del lecho. Cuando los vapores ingresan y hacen el contacto, la materia prima al ser calentada ejerce liberación de aceites esenciales. Este producto por su forma viable en el vapor circundante es “arrastrado” y separado en un decantador <sup>(20)</sup>.

## ***Thymus vulgaris* (Tomillo).**

### **Descripción.**

Menciona un arbusto perenne, aromático, oriundo a la familia Labiadas, caracterizada por presenta una altitud variante entre 10 y 40 cm aproximadamente; tallo leñoso tortuoso y grisáceo; hojas opuestas, verdes grisáceas, elípticamente de 15 mm de longitud, con envés tomentosa; flores de pequeñas bilabiadas de color característico lila, o blanco, que llegan a aparecer en periodos de verano hasta finales del periodo de otoño. Además su fruto es aquenio ovoide liso pequeño <sup>(21), (22)</sup>.

En nuestro país el tomillo es un arbusto que se desarrolla en suelo pedroso, arcilloso de nuestra serranía manteniendo sus características de las mismas.

### **Clasificación taxonómica** <sup>(16), (21),(22)</sup>.

- Reino: *Plantae*.
- División: *Magnoliophyta*.
- Clase: *Magnoliopsida*.
- Orden: *Lamiales*.
- Familia: *Lamiaceae*.
- Subfamilia: *Nepetoideae*.
- Tribu: *Mentheae*.
- Género: *Thymus*.
- Especie: *Thymus vulgaris* L.

### **Otros nombres.**

- Tomillo común, Tomello, Tremoncillo, Estremoncillo Tomillo, etc <sup>(16),(21)</sup>

### **Hábitat y distribución geográfica.**

Tomillo crece silvestre en matorrales secos, suelos rocosos, pero bien drenados y soleados. Se cultiva extensamente en casi todos los países como planta aromática culinaria. Este espécimen vegetal es originario de la región mediterránea occidental, en especial del sur de Italia, siendo posteriormente distribuido en todas las regiones y países del mundo <sup>(16),(22)</sup>.

### **Composición química.**

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* contiene timol (40%), alcanfor (11-16%), p-cimeno (15-50%), carvacrol (2.5-14.6%), linalol (4%),  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno, terpineno (1-5%), limoneno, 1,8-cineol (3%), acetato de bornilo,  $\gamma$ - borneolacetato de linalilo, geraniol,  $\alpha$ -terpineol, etc, siendo los más contribuyentes el timol, carvacrol, aunque existen otras especies de tomillos donde los componentes mayoritarios son el acetato de terpinilo, geraniol <sup>(21),(22)</sup>.

### **En referencia a los flavonoides.**

Presenta esencialmente heterósidos del luteol y apigenol y en menor esencia flavonas.

Metxiladas: 8-dimetil-timonina, cosmosíña, naringenina, timusina, eriodictiol, etc.

Además se ha señalado flavonoides, flavonas y heterósidos de luteolina <sup>(21),(22)</sup>.

### **También se ha identificado**

Taninos, saponinas ácidas, serpilina (principio activo amargo), oleanólico neutras, ácido labiático, ursólico (1,5%) ácido fenil carboxílico, ácido rosmarínico, resinas, etc <sup>(22),(23)</sup>.

### **Componentes con carácter de estudio.**

#### **Timol o isopropilmetacresol.**

Ha sido reportado por varios autores como los mejores agentes antimicrobianos más eficaces de los componentes de los aceites esenciales. Están presentes en el aceite esencial del tomillo, su configuración química es idéntica a la del Carvacrol, intercambiando la posición de su grupo hidroxilo. No es considerado para la salud. La acción del timol es idéntica a la del carvacrol, debido a su estructura química idéntica. El timol es competente de disociar la membrana externa de la bacteria gran (-) <sup>(23)</sup>.

El principio activo del *Thymus vulgaris* que se identifica por su acción antimicrobiana y antimicótico. Por su atractivo sabor está presente en la representación de numerosos enjuagatorios bucales, pastas dentales, etc. Una disolución de 5% de timol en alcohol se usa para la desinfección dental y como fungicida <sup>(23)</sup>.



### **Carvacrol o (2-metil-5-(1-metiletil) fenol).**

Es un componente que se encuentra en todos los aceites esenciales del tomillo su configuración química esta simbolizada por un grupo fenólico con un gran poder hidrófobo. De manera de que todos los agentes antimicrobianos naturales, carvacrol es un componente que ha recibido en su mecanismo de acción; tiene la capacidad de descomponer la membrana externa de la bacterias gran negativas, accediendo la salida de liposacaridos aumentado la permeabilidad de la membrana citoplasmáticas estimulando la salida del ATP, impidiendo la actividad del ATP-asa y la descenso de la fuerza motriz <sup>(23,24)</sup>.

### ***Rosmarinus officinalis* (romero).**

#### **Descripción.**

Se trata de un arbusto aromático perenne, perteneciente a la familia de las Labiadas (Lamiáceas), caracterizado por presentar una altura cercana al metro (aunque existen ejemplares que pueden alcanzar hasta dos); ramas jóvenes pubescentes que se tornaron leñosas al madurar, hojas simples, opuestas, sésiles, lineales y coriáceas, hasta 3,5 cm de longitud, flores pequeñas labiadas de color azulado (rara vez rosadas), agrupadas en densos racimos auxiliares o terminales, haciendo su aparición desde fines de la primavera hasta el principio del verano. El fruto es tetraquenio brillante de color marrón oscuro <sup>(21,23,24)</sup>.

### **Hábitat y distribución geográfica.**

La especie es originaria de las tierras del mediterráneo, probablemente nativo de Irán, donde es cultivada desde tiempos remotos, fundamentalmente en Grecia, Italia, España y Portugal. Se encuentra cultivada por sus propiedades ornamentales y medicinales por casi todo el mundo <sup>(14),(21),(24)</sup>.

### **Nombres comunes:**

- Romero, romaní, rosmarín, hombre viejo, planta solar, rosa marina <sup>(14),(23),(24)</sup>.

### **Clasificación taxonómica <sup>(24),(26),(27)</sup>.**

- REINO: *Plantae*
- DIVISIÓN: *Magnoliophyta*
- ORDEN: *Lamiales*
- FAMILIA: *Lamiaceae*
- SUBFAMILIA: *Nepetoideae*
- GENERO: *Rosmarinus*
- ESPECIE: *Officinalis*

### **Composición química.**

Los componentes principales de esta planta son el ácido caféico y sus derivados tales como el ácido rosmarínico <sup>(24, 26, 27)</sup>.

Los aceites esenciales representan el (0.5-2%) y presentan como componente principales hidrocarburos monoterpénicos tales como la  $\alpha$ -pineno (25%),  $\beta$ -pineno, mircenolimoneno, y canfeno, éteres terpenicos; alcanfor 10-25%), linalol, verbinol, etc <sup>(24, 26, 27)</sup>.

Entre los terpenoides se encuentran la pirosalvina (diterpeno amargo), ácido oleánico, ácido 2- $\beta$ -OH-oleanólico, ácido 3-O-acetilursólico, ácido arnosílico, rosmaridienol, 7-metoxi-rosmarol, etc <sup>(24), (27)</sup>.

**En referencia al grupo de flavonoides *Rosmarinus officinalis* contiene.**

Apigenina, disometia, luteolina, hispidulina, cirisimarina, nepriteina, simensetina, cupafolina, 7-metoxi-fegopolina <sup>(24, 26, 27)</sup>.

**También se han identificado en *Rosmarinus officinalis*.**

Ácido fenólico, colina, taraxasterol, lupel, estigmasterol, campesterol, taninos, entre otros compuestos <sup>(24), (26),(27)</sup>.

**Propiedades medicinales.**

Cicatrizante, afecciones bacteriana de la boca, para aliviar los espasmos musculares viscerales en el cólico renal, dolor menstrual, asma bronquial y cólico gastrointestinal. También tiene algún valor terapéutico en el tratamiento de trastornos como, úlceras pépticas, enfermedades inflamatorias, hepatotoxicidad, aterosclerosis, enfermedad isquémica del corazón, cataratas, y cáncer <sup>(28)</sup>.

## ***Escherichia-coli.***

### **Descripción.**

Entre los años de 1885 Theodore Escherich, un gran profesional pediátrico determinó por primer vez un espécimen bacteriano procedente de las heces de neonato y niños sanos donde denominó *Bacterium coli commune*. Posteriormente, en 1919 Catellani y Chalmers la denominaron *Escherichia coli*, en su admiración <sup>(4,29)</sup>.

*Escherichia coli*, es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichia. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea <sup>(29)</sup>

### **Hábitat.**

*Escherichia coli*, es un especie predominantemente de la microbiota aerobia y facultativa del tracto gastrointestinal de los animales de sangre cálida y se elimina mediante heces hacia el exterior. A pesar de ser el microorganismo facultativo predominante representa la mínima porción del contenido total de bacterias en este sitio anatómico, *Escherichia coli*, es utilizada como indicador de contaminación fecal, además este microorganismo se puede encontrar en medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir por días en el agua y los alimentos. Es colonizado en los seres humanos en las primeras 40 horas tras su alumbramiento <sup>(4,29)</sup>.

**Poder patógeno.**

*Escherichia coli*, es una especie bacteriana que es considerado de gran importancia médica y económica. La mayoría de las cepas intestinales de *Escherichia coli*, no son patógenas y coexisten en armonía con el hospedador, algunas incluso lo benefician sintetizando cofactores y hasta lo protegen de la invasión microbiana. No obstante, algunas son patógenas que pueden producir infecciones entéricas (diarrea, disentería, colitis, hemorragia, síndrome hemolítico) o extraintestinales (infecciones urinarias, bacteriemias o septicemias, meningitis, peritonitis, mastitis, infecciones pulmonares y de heridas) <sup>(4,29)</sup>.

### **III. HIPÓTESIS.**

#### **3.1. Hipótesis alternativa.**

H<sub>a</sub>: Los aceites esenciales de las hojas de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), inhiben el crecimiento bacteriano in vitro de las cepas de *Escherichia coli* y el efecto varía de acuerdo a la concentración utilizada.

#### **3.2. Hipótesis nula**

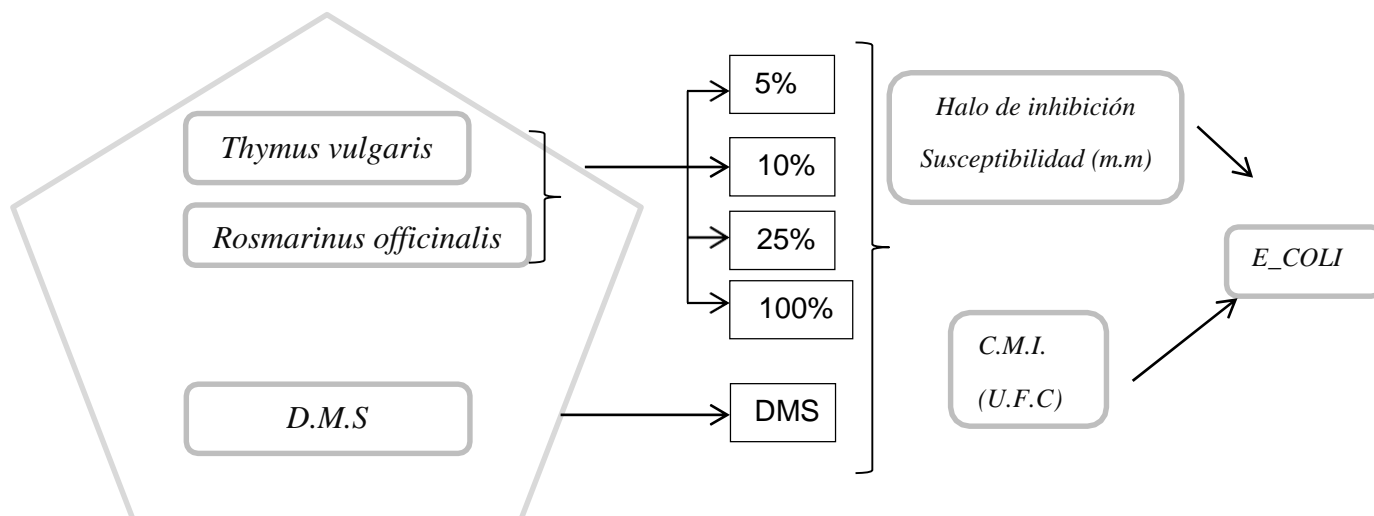
H<sub>0</sub>: Los aceites esenciales de las hojas de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), no inhiben el crecimiento bacteriano in vitro de las cepas de *Escherichia coli* y el efecto varía de acuerdo a la concentración utilizada.

## IV. METODOLOGÍA.

### 4.1 Diseño de investigación.

La presente investigación es aplicada (de acuerdo al grado de utilidad de los resultados) experimental- longitudinal.

#### Diseño experimental:



### 4.2 Población y muestra.

Estuvo constituido por el conjunto de placas Petri con agar MacConkey con diferentes concentraciones de los aceite esenciales de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* con siembra adecuada de las cepas de *Escherichia-coli*, se ejecutó en el laboratorio de Microbiología de la universidad Católica Los Ángeles de Chimbote Trujillo.

### **Población vegetal.**

La población estuvo constituida por las plantas completas de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero).

### **Muestra vegetal.**

La muestra estuvo constituida por hojas de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero).

### **Criterios de inclusión.**

- Placas con siembra apropiada de *Escherichia-coli* ( $3 \times 10^8$  UFC/mL).
- Placas con agar Macconkey y el contenido de los aceites esenciales que presentaron inhibición o no del crecimiento bacteriano.
- Placas que se utilizaron para la determinación de la susceptibilidad bacteriana que no presenten contaminación por otros microorganismos.
- Hojas en buenas condiciones físicas de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), libres de microorganismos, bacterias y hongos.

### **Criterios de exclusión.**

- Placas que después del proceso de incubación, se llegaron a contaminar con otros microorganismos (bacterias u hongos).
- Hojas en malas condiciones físicas de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), contaminadas de microorganismos, bacterias, hongos.



### 4.3 Definición y operacionalización de variables e indicadores.

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICION OPERACIONAL	ÍNDICADOR	ESCALA
Aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> . (Independiente)	Producto, usualmente de composición compleja, obtenido de un material de unas plantas definidas botánicamente <i>Thymus vulgaris</i> <sup>(21,30)</sup>	Se obtuvo por el método de hidrodestilación por arrastre a vapor empleando el destilador y se utilizó cuatro concentraciones para el tratamiento antibacteriano.	Tratamientos	Cualitativa Nominal
			5% 10% 25% 100%	
Aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> . (Independiente)	Producto, usualmente de composición compleja, obtenido de un material de unas plantas definidas botánicamente <i>Rosmarinus officinalis</i> <sup>(21,30)</sup>	Se obtuvo por el método de hidrodestilación por arrastre a vapor empleando el destilador y se utilizó cuatro concentraciones para el tratamiento antibacteriano.	5% 10% 25% 100%	Cualitativa Nominal
Efecto antibacteriano (Dependiente)	Evaluación de una sustancia antibacteriana capaz de impedir el crecimiento de la bacteria al cabo de 18 a 24 horas de incubación <sup>(30, 31)</sup>	Se determinó a través de los halos de en cultivo del microorganismo <i>Escherichia-coli</i> y su sensibilidad a través de la escala de Duraffourd	mm	Cuantitativa de Razón
			Sensibilidad <sup>(32)</sup> • Nula (< a 8mm) • Limite (8-14 mm) • Medio ( 15-20mm) • Sumamente sensible (> 20mm)	Cualitativa de Nominal

#### **4.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos.**

##### **Muestra.**

##### **i. Recolección.**

La recolección del vegetal (materia prima) fue en la provincia de Huamachuco en departamento La Libertad Perú en el mes de agosto. La recolección de la planta fue en forma completa (raíz, tallo, hojas, y flores), con la finalidad de obtener la certificación de la misma.

##### **ii. Preparación de la muestra.**

##### **Selección.**

El material vegetal se tuvo en cuenta el estado físico y alguna característica propia de la planta pero solo se trabajó con las hojas en buen estado, libre de signos de enfermedades o pigmentadas.

##### **Lavado.**

El material ya seleccionado de la planta (hojas) se lavó con agua destilada tanto para el tomillo como para el romero, quedando libre de sustancias ajenas a ellas.

## **Secado.**

El proceso de secado del vegetal se llevó a cabo en el área farmacología siendo un lugar apropiado, se utilizó papeles de tipo kraft para colocar el vegetal el cual fue distribuido y removido en forma continua en determinados tiempos.

### **iii. Extracción de aceites esenciales.**

En la extracción de aceites esenciales, se utilizó la técnica de hidrodestilación con la ayuda del destilador por arrastre a vapor, este método se requiere tiempos largos de calentamiento y utilización de grandes cantidades de agua, el cual incrementa el costo y tiempo de destilación pero no requiere un generador de vapor <sup>(5), (30,32)</sup>.

Para la extracción se colocaron 1.5 Kg de la materia vegetal en el recipiente del equipo de destilación que tiene una capacidad de 5 L, donde solo se agregó 3 litros de agua aproximadamente, en el transcurso de los 45 minutos empezó a liberar las primeras microgotas (agua- aceite), en 3 horas y 15 minutos se obtuvo la muestra propiamente dicha. Los aceites recolectados se colocaron en recipientes de color ámbar y fue herméticamente sellado, este fue guardado en temperaturas que oscilan 2-8°C (helera) hasta su utilización.

De igual manera se procedió para la extracción del aceite esencial de la planta de romero (*Rosmarinus officinalis*).

### **Rendimiento de aceites esenciales.**

- *Thymus vulgaris* (tomillo)

La expresión para determinar el contenido de aceites esenciales aplicamos la siguiente fórmula:

$$\text{Contenido de aceite esencial (\% v/m)} = V \times 100 / M (100 - H)$$

$$\% \text{ RAE} = \frac{3.65 \square \square}{1500. \square} \square$$

100.

\* RAE: Rendimiento de Aceite Esencial.

Donde:

V: Es el volumen de aceite esencial recolectado (mL).

M: Material vegetal (g).

H: Humedad del material vegetal (%).

### **Rendimiento de aceites esenciales.**

*Rosmarinus officinalis* (Romero).

La expresión para determinar el contenido de aceites esenciales de romero se aplicó la misma fórmula aplicada a *Thymus vulgaris* (tomillo) siendo la siguiente:

$$\text{Contenido de aceite esencial (\% v/m)} = V \times 100 / M (100 - H)$$

$$\% \text{RAE} = \frac{2,90 \square \square}{1100. \square} \square$$

$$100.$$

\* RAE: Rendimiento de Aceite Esencial.

Donde:

V: Es el volumen de aceite esencial recolectado (mL).

M: Material vegetal (g).

H: Humedad del material vegetal (%).

#### iv. Preparación de las diferentes concentraciones de aceite esencial.

Se prepararon concentraciones de los aceite a 5%, 10%, 25% y 100%. Tomándose como solución madre los aceites esenciales puros (100%) y se colocó en diferentes tubos de ensayos, en el mismo momento del ensayo usando Dimetilsulfóxido como solvente de dilución. Las muestras fueron protegidas de la luz, envolviendo en papel de aluminio.

**Fórmula para obtener CC de A.E:**

#### Concentración final de los A.E

Volumen de Aceites esenciales.	Vol. DMSO	Volumen final.	[ ] (%)
<b>0.25ml</b>	4.75ml	5ml	5%
<b>1.00ml</b>	4ml	5ml	10%
<b>1.25ml</b>	3.75ml	5ml	25%
<b>5ml</b>	-	5ml	100%

\* DMSO: Dimetilsulfóxido.

**v. Microorganismo (*E-coli*).**

**a. Obtención de cepas.**

Los microorganismos fueron obtenidos en la universidad Los Ángeles De Chimbote Uladech filial Trujillo, se trata de una muestra silvestre *E-coli*, el cual fue aislado y tratado con ayuda de nuestro docente y compañero a trabajar con el mismo espécimen.

**b. Aislamiento del microorganismo.**

Para el aislamiento del cultivo bacteriano de *Escherichia coli*, en placa aplicado al método de estrías cruzadas se procedió de la siguiente forma:

Desinfectó perfectamente el área de trabajo con hipoclorito de sodio, se prendió el mechero para eliminar microorganismos dispersos en el ambiente.

Se realizó el trabajo sentado, cerca del mechero. Se marcó la base de la placa Petri, especificando concentraciones, hora y fecha de trabajo

Se esterilizó el asa bacteriológica, por método del flameo hasta llevarla al rojo vivo.

Se dejó enfriar el asa contando 20 ó 30 segundos, para luego proceder con el sembrado de la muestra (*E-coli*). Se incubó la placa Petri a 37°C durante 24 horas.

Luego de las 24 horas cada cepa de E-coli se diluyó en un caldo hasta obtener una turbidez semejante al tubo número 03 de la escala de Mac Farland. <sup>(30,31,32)</sup>

#### **vi. Preparación de medio de cultivo.**

Para la preparación de medio de cultivo adecuado para que los microorganismos al ser sembrado se desarrollen y faciliten su aislamiento identificación se procedió a seguir los siguientes pasos:

- a) Cada ingrediente o medio deshidratado completo se disolvió en un volumen adecuado de agua destilada estipulada los frascos.
- b) Se determinó el pH del medio y si es necesario se ajustará. El pH se determinó por medio de indicadores.
- c) El medio ya preparado se colocó en un recipiente adecuado (Matraz) cuya boca se cerró con un tapón de algodón.
- d) El medio obtenido se esterilizó en autoclave.

Para la esterilización de nuestro agar (Macconkey) se utilizó la técnica de esterilización por calor húmedo, esta técnica generalmente se utiliza la autoclave el cual fue llevado a 121 °C durante 15 minutos la temperatura se alcanza utilizando vapor de agua a una presión de 15 libras.

- e) Cuando se requiere se agregó a las placas Petri en condiciones asépticas.

#### **vii. Preparación de material para la esterilización y aplicación.**

Como se trabajó con cultivos microbianos (*E-coli*) aparatos y material en general, deben encontrarse microbiológicamente limpios antes de ser utilizados.

En nuestra operación utilizamos la técnica de esterilización con calor seco, requiere mayor duración e intensidad por que la conducción de calor es menos

rápida que en ambientes húmedos. La temperatura que se utiliza generalmente oscila entre 160 y 180 °C durante 1 hora y 45 minutos. Entre los materiales esterilizados por esta técnica tenemos las placas Petri, vasos de precipitación, varillas, pipetas, probetas, etc, el cual fue utilizado de acuerdo a procedimiento. En esta técnica la inactivación de los contaminantes ocurre por la pérdida de agua y oxidación de todos sus componentes esenciales <sup>(31),(33)</sup>.

#### **4.5. Plan de análisis.**

Para determinar los resultados de análisis estadístico de los datos se desarrolló mediante el análisis de varianza con un factor (ANOVA).

El análisis de la ANOVA nos permitió contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ( $K > 2$ ) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de cada tratamiento con respecto a la variable de interés.



#### 4.6. Matriz de consistencia.

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS
<p>Efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de las hojas de <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero), frente a cepas de <i>Escherichia coli</i></p>	<p>¿Los aceites esenciales de las hojas de <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero), tienen efecto antibacteriano in vitro frente a cepas de <i>Escherichia coli</i>?</p>	<p><b>General:</b>            Demostrar y conocer científicamente el efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero), frente a cepas de <i>E-coli</i>.</p> <p><b>Específicos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinar la actividad antibacteriana in vitro por las concentraciones de 5%, 10%, 25% y 100% del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> sobre las cepas de <i>Escherichia-coli</i>.</li> <li>• Determinar la actividad antibacteriana in vitro por las concentraciones de 5%, 10%, 25% y 100% del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> sobre las cepas de <i>Escherichia-coli</i>.</li> <li>• Determinar la sensibilidad in vitro de <i>Escherichia-coli</i> frente a diferentes concentraciones de los aceites esenciales <i>Thymus vulgaris</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i> según escala de Duraffourd.</li> <li>• Comparar la actividad antibacteriana vitro entre diferentes concentraciones de los aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i> sobre <i>Escherichia-coli</i> a las 24 horas.</li> </ul>	<p>Ha:            Los aceites esenciales de las hojas de <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero), inhiben el crecimiento bacteriano in vitro de las cepas de <i>Escherichia coli</i> y el efecto varía de acuerdo a la concentración utilizada</p> <p><b>H<sub>0</sub>:</b>            Los aceites esenciales de las hojas de <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo) y <i>Rosmarinus officinalis</i> (romero), no inhiben el crecimiento bacteriano in vitro de las cepas de <i>Escherichia coli</i> y el efecto varía de acuerdo a la concentración utilizada.</p>

TIPO DE INVESTIGACION/ DISEÑO	VARIABLES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES Y ESCALAS	PLAN DE ANALISIS
			<b>Tratamientos</b>	
	<b>Independientes</b>	Se obtuvo por el método de hidrodestilación por arrastre a vapor empleando el destilador, y se utilizó cuatro concentraciones para el tratamiento antibacteriano.	5% 10% 25% 100%	<b>Cualitativo</b> <b>Nominal.</b>
Tipo de Investigación <b>-Experimental.</b>	Aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	Se obtuvo por el método de hidrodestilación por arrastre a vapor empleando el destilador, y se utilizó cuatro concentraciones para el tratamiento antibacteriano.	5% 10% 25% 100%	<b>Cualitativo</b> <b>Nominal.</b> <b>ANOVA</b>
Diseño de la investigación <b>-Longitudinal.</b>	<b>Dependiente.</b> Efecto antibacteriano de aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> y <i>Rosmarinus officinalis</i>	Se determinó a través de los halos de en cultivo del microorganismo <i>Escherichia-coli</i> y su sensibilidad a través de la escala de Duraffourd	mm  Sensibilidad.  • Nula (< a 8mm) • Limite (8-14 mm) • Medio (15-20mm). • Sumamente sensible (> 20mm)	<b>Cuantitativo</b> <b>de Razón.</b>  <b>Cualitativo</b> <b>nominal.</b>

#### **4.7. Principios éticos.**

Al realizar la investigación, hay que prestar atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente.

Por ello se tuvo en cuenta la manipulación y desechos de residuos biológicos empleadas en la investigación sobre todo de las cepas de *E-coli* de acuerdo al manual de procedimiento para manejo y eliminación de residuos biológicos de la facultad de ciencias biológicas de la Universidad Católica De Chile.

Los procedimientos establecidos refieren aspectos técnicos y administrativos relacionados al manejo y eliminación de los residuos biológicos con el fin de disminuir riesgos <sup>(34)</sup>.

## V. RESULTADOS.

### 5.1 Resultados.

La presente investigación de tipo experimental, demostró el efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), a concentraciones de 5%, 10%, 25%, y 100% sobre una muestra del microorganismo *Escherichia coli*, al análisis de los datos se encontraron los siguientes resultados:

**Tabla 01. Actividad antibacteriana in vitro por diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de *Thymus vulgaris* frente a *Escherichia coli* a las 24 horas expresados en halo de inhibición (mm)**

N° Placas	Halos de Inhibición de <i>Escherichia coli</i> (mm)				
	Concentraciones de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>				
	0%	5%	10%	25%	100%
<b>1</b>	2	9	8	8	12
<b>2</b>	1	8	8	9	15
<b>3</b>	1	10	9.5	9.5	17
<b>4</b>	1	9	8	9.5	17.5
<b>5</b>	1	9	7.5	8	14.5
<b>6</b>	1	9	8	9.5	14
<b>7</b>	1	9	8	8	18
<b>8</b>	1	9	8	9	15
<b>Promedio</b>	<b>1.13</b>	<b>9.00</b>	<b>8.13</b>	<b>8.81</b>	<b>15.36</b>
<b>Desviación Estándar</b>	<b>0.35</b>	<b>0.53</b>	<b>0.58</b>	<b>0.70</b>	<b>2.01</b>

**Tabla 02. Actividad antibacteriana in vitro por diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* frente a *Escherichia coli* a las 24 horas expresados en halo de inhibición (mm)**

N° Placas	Halos de Inhibición de <i>Escherichia coli</i> (mm)				
	Concentraciones de aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>				
	0%	5%	10%	25%	100%
1	1	8	9.5	10	20
2	2	8	9	10	20
3	1	8.5	10	9	27
4	1	8	10	10	15
5	1	8	10	13	20
6	2	7	11	13	15
7	1	8	14	9	14
8	1	9	14	8	16
Promedio	<b>1.25</b>	<b>8.06</b>	<b>10.94</b>	<b>10.25</b>	<b>18.38</b>
Desviación Estándar	<b>0.46</b>	<b>0.56</b>	<b>1.97</b>	<b>1.83</b>	<b>4.31</b>

**Tabla 3. Sensibilidad in vitro de *Escherichia coli* frente a diferentes concentraciones de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* las 24 horas según la escala de Duraffourd.**

Tratamientos	Sensibilidad de <i>Escherichia coli</i>	
	aceites esenciales	
	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
T1	—	—
T2	†	†
T3	†	†
T4	†	†
T5	† †	† †

**\*Donde:** T1: 0%, T2: 5%, T3: 10%, T4: 25%, T5: 100%

**Tabla 04. Comparación de la actividad antibacteriana in vitro entre diferentes concentraciones de los aceites esenciales de las hojas de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* sobre *Escherichia coli* a las 24 horas mediante el análisis de la varianza.**

Fuente	Razón-F		Valor-P		Significancia
	T	R	T	R	
Entre Tratamiento	<b>192.76</b>	<b>57.40</b>	<b>0.000</b>	<b>0.0000</b>	<b>0,05</b>
Error experimental					
Total					

**Donde:** \*T: *Thymus vulgaris*. \*R: *Rosmarinus officinalis*

## 5.2. ANALISIS DE RESULTADOS.

En esta nueva época moderna de la ciencia farmacéutica, la expansión del interés se ha desplazado más hacia las plantas medicinales, productos de origen vegetal que demuestran científicamente acción terapéutica en comparación con otros productos sintéticos o clásico. Dicho interés se ve para la producción de principios activos, medicamentos, cosmética o aditivos para la conservación de alimentos, entre la búsqueda, los aceites esenciales han recibido grandes atracciones sustancial debido a su utilidad biológica significativa.

En los resultados obtenidos se determina lo siguiente:

En la tabla 01, se observa la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (tomillo) a diferentes concentraciones tener un halo promedio e inhibición de 15.37 mm, mostrándose así ejercer un efecto medio o ser muy sensible según escala de Durafford sobre *Escherichia coli*, también podemos observar que cuando la concentración de aceite esencial de tomillo aumenta, el promedio de halo de inhibición también crece, excepto en las concentraciones 10% y 25%, pero que los valores promedios tienen similitudes.

En la tabla 02, se observa la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (romero) a diferentes concentraciones tener un halo promedio de inhibición de 18.375 mm, mostrándose superioridad o tener mayor efecto antibacteriano que *Thymus vulgaris* (tomillo), sobre *Escherichia coli*, al igual que en tomillo también se observa que a mayor concentración de aceite de romero el promedio de halo de inhibición crece excepto en las concentraciones del 25% pero que el valor promedio tiene similitudes con las anteriores.

En la tabla 03, se observa la sensibilidad del microorganismo *Escherichia coli*, frente a diferentes concentraciones de los aceites esenciales de tomillo y romero, donde la efectividad inhibitoria a concentraciones de 5% (T2) es notoria para ambos casos pero al 100% (T5) es el que brinda estadísticamente mejor poder antibacteriano mostrando así tener un efecto medio o ser muy sensible.

En la tabla de 04, se observa que hay diferencias altamente significativas entre los distintos tratamientos tanto para *Thymus vulgaris* (tomillo) como para *Rosmarinus officinalis* (romero).

Así mismo se refleja que si el factor p es menor a 0.05 si existen significativas entre los tratamientos.

Queda demostrado el efecto antibacteriano de los aceites esenciales *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* sobre *Escherichia coli* a nivel *in vitro*, habiendo encontrado resultados eficaces, manifestados a través de los halos de sensibilidad bacteriana, lo cual demuestra que los aceites esenciales de tomillo y romero tienen efecto inhibitorios sobre el crecimiento de *Escherichia coli*.

Se determinó el efecto antibacteriano de los aceites esenciales *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* sobre *Escherichia coli* utilizando el método de difusión de discos para lo cual fueron 3 grupos experimentales, donde el primer grupo estuvo constituido por 4 concentraciones (T2: 5%, T3: 10%, T4: 25%, T5: 100%) de aceites esenciales de tomillo, el segundo grupo fue para romero con las mismas concentraciones y un grupo control con *Escherichia coli* T1 expuesto al 0% de aceites esenciales, observándose un aumento creciente de los promedios de los halos



de inhibición del crecimiento bacteriano a medida que las concentraciones de aceites esenciales de tomillo y romero aumentaba (ver tablas 1 y 2). Excepto T3 y T4 para tomillo y T4 para romero pero existen similitudes a los promedios anteriores para ambos caso. Estos resultados demuestra que los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* además de poseer efectos antimicrobianos, tiene relación directa con las concentraciones trabajadas, es decir a mayor concentración de aceite esencial mayor efecto antibacteriano, además se recalca que *Rosmarinus officinalis* (romero) presentó mejor poder antibacteriano que *Rosmarinus officinalis* (tomillo).

Se determinó la CIM obtenidas las cuales los aceites esenciales *Thymus vulgaris* fue T2 y *Rosmarinus officinalis* al T2 (Tabla 3). Estos resultados demuestran que los aceites esenciales de tomillo y romero tiene acción antibacteriana frente a *Escherichia coli*.

Los resultados obtenidos durante este proceso de investigación coinciden con los siguientes estudios realizados tales como:

Fumiere et al, en su estudio publicado 2017. Demostraron la actividad antibacteriana de los aceites esenciales mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria CIM, donde sus principales compuestos analizados timol, carvacrol mostraron efectividad gran efectividad antimicrobiana frente a cepas de *S. Aureus* (CMI = 20 µg / ml), *Escherichia coli* (CMI = 50 µg / ml) y *S. typhimurium* (CMI = 500 µg). / mL<sup>(34)</sup>.

Nezhadali et al, en el 2014, realizaron estudios para determinar variaciones químicas de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y actividad antimicrobiana in vitro sobre sobres distintas bacterias, utilizando ensayos de difusión de discos para determinar concentración mínima inhibitoria. Dando como resultado que los aceites esenciales de tomillo poseen grandes propiedades antimicrobianas sobres 29 especies bacterianas, donde la concentración mínima inhibitoria de tomillo es de 9.25 para E-coli <sup>(36)</sup>.

Medeiros et al, en el 2015, Demostraron que los aceites esenciales de orégano y romero mostraron efectos inhibitorios solo o en combinaciones a diferentes concentraciones sobre la supervivencia de cepas de *Escherichia coli*, *L.monocytogenes* y *S. Enteritidis*, <sup>(37)</sup>.

Pesavento et al, en el 2015, Italia demostraron que los aceites esenciales de cinco especies vegetales entre los cuales tomillo y romero, mostraron actividad antimicrobiana contra cinco productores de enterotoxina de *S. aureus* y cinco cepas de *L. monocytogenes* a concentraciones de 2% y 1% restringiendo su crecimiento. Los aceites esenciales fueron capaces de suprimir concentraciones de  $10^2$  UFC/g de los patógenos, dando a conocer la importancia potencial del uso de *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis* y *O. vulgare* como conservantes de alimentos <sup>(38)</sup>.

Finalmente el presente estudio de investigación se encontró que el uso de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero) a concentraciones 5%, 10%,25% y a 100% presentan efecto sobre *Escherichia coli*.

## VI. CONCLUSIONES.

Basados a los resultados obtenidos en el proceso de la investigación podemos concluir lo siguiente:

Los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis* (romero) a distintas concentraciones presentaron actividades antibacterianas in vitro frente a cepas de *Escherichia coli*, determinando que si cumple con nuestro objetivo propuesto en nuestra investigación.

Las sensibilidad in vitro de E-coli, frente a distintas concentraciones (5%, 10%, 25% y 100%) los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* presentó variaciones de acuerdo a los distintos tratamientos sobre el cultivo, mostrando que la sus primeros efectos cumple a concentraciones menores (5%).

Los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* a distintas concentraciones de 5%, 10%, 25% y 100% presentaron efecto antibacteriano según la escala Duraffourd para inhibir desarrollo de cepas de *E-coli*, donde existe suficiente base estadística para afirmar que a concentraciones mayores nos brinda mejor poder antimicrobiano.

En las comparaciones de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* en diferentes (5%, 10%, 25% y 100%) sobre E-coli, se demostró que *Rosmarinus officinalis* presenta mejores efectos antibacterianos que *Thymus vulgaris*.

## VII. RECOMENDACIONES.

- Se deben valorarse las actividades antibacterianas de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Rosmarinus officinalis*, (romero) frente a otras especies microbiológicas de importancia patógena.
- A base de los resultados obtenidos en la concentración mínima inhibitoria, con las dosis tolerables en futuras pruebas biológicas, se podría realizar una formulación de un producto comercial aplicable a seres humanos, probando la efectividad y seguridad en su uso.
- Realizar estudios sobre los principios activos de los aceites esenciales de plantas de la región la Libertad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Gemma Baulies Romero, Rosa María Torres Castella, Actualización en fitoterapia y plantas medicinales Barcelona. España. Volumen 19, Número 3, marzo de 2012, páginas 149. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S1134-2072\(12\)70324-9](https://doi.org/10.1016/S1134-2072(12)70324-9).
2. Huamantupa, Isau et al. Riqueza, uso y origen de plantas medicinales expandidas en los mercados de la ciudad del Cusco. Rev. peru biol, Lima, vol. 18, n. 3, dic. 2011. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S172799332011000300004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172799332011000300004&lng=es&nrm=iso). Acedido en 11 jun. 2017
3. Angulo C. Andrés Felipe, Rosero R. Ricardo Andrés, González Insuasti Martha Sofía. Estudio etnobotánico de las plantas medicinales utilizadas por los habitantes del corregimiento de Genoy, Municipio de Pasto, Colombia. Rev Univ. salud. [Internet]. 2012 Diciembre [citado 2017 June 11]; 14 (2): 168-185. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sciarttext&pid=S0124-71072012000200007&lng=en>.
4. CEP, editor. Manual plantas medicinales: formación para el empleo [Internet]. Madrid: Editorial CEP, S.L.; 2010. [cited 2017 July 20]. Available from: ProQuest Ebook Central
5. Pino Alea, Jorge Antonio. Aceites esenciales: química, bioquímica, producción y usos [Internet]. Havana: Editorial Universitaria; 2015. [citado 2017 July 20]. Available from: ProQuest Ebook Central

6. Faleiro Naves, Plinio Lázaro. Formación de biopelículas por “*escherichia coli*” y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas [Internet]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2010. [cited 2017 July 20]. Available from: ProQuest Ebook Central
  
7. Méndez Á, Nelson; Angulo Ortiz, Alberto; Contreras Martínez, Orfa. In vitro antibacterial activity of *Curcuma longa* (Zingiberaceae) against nosocomial bacteria in Montería, Colombia. *Revista de Biología Tropical*, [S.l.], v. 64, n. 3, July 2017. ISSN 2215-2075. Disponible en: <<http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/20848/25854>>.
  
8. Zampini, Iris Catiana, Cudmani, Norma, Islas, María Inés. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes [Internet]. Buenos Aires: Red Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana; 2009. [citado 2017 July 20]. Disponible en: ProQuest Ebook Central. página 4.g
  
9. Escalona Cruz Luis Jesús, Tase Aguilar Aliuska, Estrada Martínez Aliuska, Almaguer Mojena Maida Luisa. Uso tradicional de plantas medicinales por el adulto mayor en la comunidad serrana de Corralillo Arriba. Guisa, Granma. *Rev Cubana Plant Med* [Internet]. 2015 Dic [citado 2018 Jul 07]; 20 ( 4 ). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962015000400007&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962015000400007&lng=es).

10. Gallegos-Zurita Maritza, Gallegos-Z Diana. Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades de la piel en comunidades rurales de la provincia de Los Ríos Ecuador. An. Facultad. med. [Internet]. Publicado el 2017 Julio [citado 2018 Jul 07]; 78 (3): 315-321. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-55832017000300011&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832017000300011&lng=es).
11. Iseppi R, et al. Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils and their combination against food-borne pathogens and spoilage bacteria in ready-to-eat vegetables, Natural Product Research, department of life Sciences, university of Modena and Reggio Emilia, Modena, Italy. [Internet]. 2018. 6 de junio. [citado 2018 Jun 28]; 13 (4): Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29874951>
12. Coy Barrera Carlos Andrés, Eunice Acosta Gema. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. Revista Cubana. Plantas Medicinales. [Internet]. 2013 Junio [citado 2017 Jun 13]; 18(2):237-246. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S102847962013000200007&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962013000200007&lng=es).
13. Solís Campoverde Nataly, P “Evaluación Los Aceites Esenciales De Orégano (*Origanum Vulgare* L.) Y Tomillo (*Thymus Vulgaris* L.) Como Potenciales Bioconserve Riobamba-Ecuador.2011.TESIS [Internet]. [Citado 2016 Jun 01] 110 (141); Disponible en: [http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/1992/1/56\\_T00300.pdf](http://dspace.esoch.edu.ec/bitstream/123456789/1992/1/56_T00300.pdf).

14. Loja Montoya, Madeleine. Efecto Antibacteriano in Vitro De Un Colutorio Elaborado Con Extracto Alcohólico De Rosmarinus Officinalis L. (romero) Sobre Streptococcus Mutans Y Enterococcus Faecalis. Universidad Señor de Sipán, 2017. <http://repositorio.uss.edu.pe/handle/uss/4096>.
15. Rocha Morales Raquel Mary. Efecto Antibacteriano in Vitro del Aceite Esencial del Rosmarinus officinalis (Romero) sobre el Streptococcus mutans ATCC 25175, Perú 2016, Universidad Nacional de Trujillo, facultad de Estomatología.
16. La Rosa. Eduardo R. Determinación De La Actividad Antibacteriana In Vitro Del Aceite Esencial Thymus Vulgaris frente a cepas Porphyromonas Gingivalis Atcc 33277 Causante De Gingivitis. Tacna 2012. Tesis. [Internet]. [Citado 2017 Jun 13] 88 (114); Disponible En: [http://Tesis.Unjbg.Edu.Pe:8080/Bitstream/Handle/Unjbg/151/38\\_2013\\_Lagos\\_La\\_Rosa\\_farmacia\\_y\\_Bioquímica](http://Tesis.Unjbg.Edu.Pe:8080/Bitstream/Handle/Unjbg/151/38_2013_Lagos_La_Rosa_farmacia_y_Bioquímica).
17. Gonzalez Villa Angela A. Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanolicos de Plantas del Amazonas, Universidad Nacional De Colombia Sede Manizales Departamento de Ingeniería Química Abril de 2004. Pág 22-24.
18. Balboa y cols. Equipo Experimental para la destilación por Arrastre de Vapor (Dav) De Aceites Esenciales, Caso: Cáscara De Naranja Dulce (Citrus Sinesis). Rev. Tecnológica, La Paz, Vol. 12, N. 18, 2016. [Internet]. [Citado 2017 Jun 13] Disponible en: [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S172975322016000100003&lng=es&nrm=iso](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172975322016000100003&lng=es&nrm=iso).



19. Velasco Reinaldo, S. Héctor. Villada y E Carrera Jorge. Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria Información Tecnológica) Universidad del Cauca. Departamento de Agroindustria, Facultad de Ciencias Agropecuarias. [Internet]. Vol 18 (1), 3-4 2007 [Citado 2017 Jun 13]; Disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/infotec/v18n1/art09.pdf>.
20. Cerpa Chávez M. G. Hidrodestilación de Aceites Esenciales: Modelado y Caracterización. Universidad De Valladolid. Departamento De Ingeniería Química Y Tecnología Del Medio Ambiente Valladolid, [Internet]. 304 (1), 17. Abril del 2007.[Citado 2017 Jun 13]; Disponible en: <http://www.Anipam.es/downloads/43/hidrodestilacion-de-aceites-esenciales.Pdf>.
21. Alonso, Jorge. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos [Internet]. Buenos Aires: Corpus Editorial; 2007. [citado 2017 July 22]. Disponible en: ProQuest Ebook Central
22. Rojas Armas, Juan, Ortiz Sánchez, José, Jáuregui Maldonado, José, Ruiz Quiroz, Julio, Almonacid Román, Robert, Aceite esencial de *Thymus vulgaris* L (tomillo), su combinación con EDTA contra *Cándida albicans* y formulación de una crema Anales de la Facultad de Medicina [en línea] 2015, 76: [Fecha de consulta: 22 de junio de 2017] Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/379/37942607002.pdf>.

23. Tellez, Lena et al. Determinación de timol y carvacrol en hojas de orégano a través de HPLC FL. Rev. Soc. Quím. Perú 2014, vol.80, 4 [citado 2018-07-08], pp .279-286. Disponible en: Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152015000400011&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152015000400011&lng=es).
24. F. Vargas Andrs Y Colaboradores. Ensayo Preliminar De La Actividad Antibacteriana De Extractos De Allium Sativum, Coriandrum Sativum, Eugenia Caryophyllata, Origanum Vulgare, Rosmarinus Officinalis Y Thymus Vulgaris Frente A Clostridium Perfringens. Universidad de Caldas. Volumen 8, enero - diciembre, 2009. págs. 47 –57 [citado 2016 Mayo 29] ; 1(11): 49. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/biosa/v8n1/v8n1a07.pdf>.
25. Arango Mejía María Cristina. Plantas medicinales. Botánica de interés médico. Medicina indígena. Colombia. Editorial MDP.2011. Páginas:284-286
26. Mestanza Mendoza, Marilú. Caracterización Físicoquímica Del Aceite Esencial De Romero (Rosmarinus Officinalis) De La Región Amazonas. Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, 2017. Disponible en: [http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNTR\\_a671efb5ff18dc29a78811c2328ec76e](http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNTR_a671efb5ff18dc29a78811c2328ec76e)
27. Estrada Orozco. P. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (Rosmarinus officinalis) y tomillo (Thymus vulgaris).escuela superior politécnica de Chimborazo. Facultad de ciencias. Ecuador. [Internet]. 2010 Dic [citado 2017 Julio 03]; 87 (1): 8. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/699/1/56T00229.pdf>.

28. El-Din Rania A. Salah, El-Shahat Abd El-Rahman, Elmansy Rasha Ahmed. An Electron Microscopic Study of the Antifertility Potential of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in Male Albino Rats. *Int. J. Morphol.* [Internet]. Pub. 2012 Junio [citado 2017 Julio 03]; 30 (2): 666-672. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-9502201200020\\_0051](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-9502201200020_0051).
29. Rodríguez-Ángeles Guadalupe. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública Méxi* [revista en la Internet]. 2002 Septiembre. [citado 2017 Jul 05]; 44 (5): 464-475. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-363420020\\_00500011](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-363420020_00500011).
30. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología I y II: diversidad y estructura de los microorganismos (2008). México, D.F., MX: Universidad Autónoma de Guerrero página 12, 13; 20,21; 25-29. Citado [31 Octubre 2016] internet disponible en: <http://site.ebrary.com/lib/bibliocauladechsp/reader.action?DocID=10287166&ppg=16>.
31. Vidal, Graniel, Jorge. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): una causa frecuente de diarrea infantil, Red Salud en Tabasco, 2006. ProQuest Ebook Central, Citado [2017 Diciembre 13 07:14:25] internet disponible en: <http://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliocauladechsp/detail.action?docID=3165711> .Created from bibliocauladechsp.

32. Herrera Marco Luis. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. Rev. méd. Hospital. Nacional Niños (Costa Rica) [Internet]. 1999 Enero [citado 2017 Diciembre 13] ; 34( Suppl ): 33-41. Available from: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-85461999000100010&lng=en](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010&lng=en).
33. Picazo Juan J. Métodos Básicos Para El Estudio De La Sensibilidad De Los Antimicrobianos Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Página 18- 20 (54) Citado [15 noviembre 2016] internet disponible en: [http://coesantseimc.org/documents/M%C3%A9todosBásicos\\_SensibilidadAntibióticos.pdf](http://coesantseimc.org/documents/M%C3%A9todosBásicos_SensibilidadAntibióticos.pdf).
34. Universidad Católica de Chile, Procedimiento Para Manejo Y Eliminación de Residuos Biológicos. Facultad de Ciencias Biológicas [Internet]. 2016 abril [citado 2018 Jul 07]; 7(2), disponible en: [http://investigación.uc.cl/images/pdf/Etica/Manual\\_De\\_Seguridad\\_En\\_Laboratorios.Pdf](http://investigación.uc.cl/images/pdf/Etica/Manual_De_Seguridad_En_Laboratorios.Pdf).
35. Fumiere et al, La variación estacional afecta la composición y las actividades antibacterianas y antioxidantes de Thymus vulgaris, publicación Cultivos y productos industriales editorial Elsevier [revista en la Internet], [citado enero 2017] disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.008>.

36. Nezhadali et al, Chemical variation of leaf essential oil at different stages of plant growth and in vitro antibacterial activity of *Thymus vulgaris* Lamiaceae, from Iran 2014 Department of Chemistry, Payame Noor University (PNU), Mashhad, Iran <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2014.05.001>
  
37. Medeiros et al, Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* in leafy vegetables Laboratory of Food Microbiology, Department of Nutrition, Health Science Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil Volumen 59, January 2016, Pages 468-477 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.017>
  
38. Pesavento et al, Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs Volume 54, August 2015, Pages 188-199. Health Sciences Department, Applied Microbiology Laboratory, University of Florence, Viale Morgagni 48, 50132, Florence, Italy <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.045>

## ANEXOS.

**TABLA 05. Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de *Thymus vulgaris* (Tomillo) al 5% frente *Escherichia coli*.**

Aceites Esenciales		N° Discos	24 horas		48 horas	
			Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
volumen (ul)	[ ] (mg/ml)		Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)
<b>0.625</b>	5%	T <sub>1</sub>	7	8	9	9
		T <sub>2</sub>	7	7	8	9
		T <sub>3</sub>	7	8	8.5	9
		T <sub>4</sub>	8.5	8	9	9

**TABLA 06.**

**Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de *Thymus vulgaris* (Tomillo) al 10% frente *Escherichia Coli*.**

Aceites Esenciales		N° Discos	24 horas		48 horas	
			Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
volumen (ul)	[ ] (mg/ml)		Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)
<b>0.625</b>	10%	T <sub>1</sub>	7	7	8	7.5
		T <sub>2</sub>	7	6.5	8	8
		T <sub>3</sub>	9	8	9.5	8
		T <sub>4</sub>	7.5	7.5	8	8

**TABLA 07.**

**Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de *Thymus vulgaris* (Tomillo) al 25% frente *Escherichia Coli*.**

Aceites Esenciales		N° Discos	24 horas		48 horas	
			Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
volumen (ul)	[ ] (mg/ml)		Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)
<b>0.625</b>	25%	T <sub>1</sub>	8	7	8	8
		T <sub>2</sub>	8	9.5	9	9
		T <sub>3</sub>	9	7	9.5	8
		T <sub>4</sub>	9	7	9.5	9

**TABLA 08.**

**Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de *Thymus vulgaris* (Tomillo) al 100% frente *Escherichia Coli*.**

Aceites Esenciales		N° Discos	24 horas		48 horas	
			Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
volumen (ul)	[ ] (mg/ml)		Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)
<b>0.625</b>	100%	T <sub>1</sub>	10	14.5	12	14
		T <sub>2</sub>	14. 5	10	15	14
		T <sub>3</sub>	17	11	17	12.5
		T <sub>4</sub>	17	7	17. 5	10

**TABLA 09.**

**Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 5% frente *Escherichia Coli*.**

Aceites Esenciales		N° Discos	24 horas		48 horas	
			Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
volumen (ul)	[ ] (mg/ml)		Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)
		T <sub>1</sub>	8	8	8	8
0.625	5%	T <sub>2</sub>	7	7	8	7
		T <sub>3</sub>	8	8	8.5	8
		T <sub>4</sub>	8	9	8	8.5

**TABLA 10.**

**Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 10% frente *Escherichia Coli*.**

Aceites Esenciales		N° Discos	24 horas		48 horas	
			Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
volumen (ul)	[ ] (mg/ml)		Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)
		T <sub>1</sub>	9	10	9.5	8.5
<b>0.625</b>	10%	T <sub>2</sub>	9		9	8
		T <sub>3</sub>	10	14	10	8
		T <sub>4</sub>	10	14	9	8



**TABLA 11.**

**Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 25% frente *Escherichia Coli*.**

Aceites Esenciales		N° Discos	24 horas		48 horas	
			Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
vol. (ul)	[ ] (mg/ml.)		Halos (mm.)	Halos (mm.)	Halos (mm)	Halos (mm)
		T <sub>1</sub>	10	13	10	10
<b>0.625</b>	25%	T <sub>2</sub>	10	13	9	9.5
		T <sub>3</sub>	9	9	9	8
		T <sub>4</sub>	10	8	9	8

**TABLA 12.**

**Prueba de actividad antibacteriana de los aceites Esenciales de *Rosmarinus officinalis* (Romero) al 100% frente *Escherichia Coli*.**

Aceites Esenciales		N° Discos	24 horas		48 horas	
			Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2
volumen (ul)	[ ] (mg/ml)		Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)
		T <sub>1</sub>	20	20	13	15
<b>0.625</b>	100%	T <sub>2</sub>	20	15	13	12
		T <sub>3</sub>	27	14	16.7	10
		T <sub>4</sub>	15	16	15	10

**Cuadro 1. Análisis de varianza de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a *Escherichia coli* a nivel *in vitro* a las 24 horas.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre Tratamientos	817.15	4	204.287	192.76	0.0000
Error Experimental	37.0938	35	1.05982		
Total	854.244	39			

$p \leq 0.05$

Conclusión: si el facto p es menor a 0.05 si existen diferencias significativas entre los tratamientos.

**Cuadro 2. Comparación de medias por el método LSD de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a *Escherichia coli* a nivel *in vitro* a las 24 horas.**

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	8	1.125	X
3	8	8.125	X
4	8	8.8125	X
2	8	9.0	X
5	8	15.375	X

Fuente: Datos del Anexo 1

**Conclusión:**

Existen tres grupos homogéneos, el primer grupo diferente está constituido por el control, el segundo por los tratamientos 3 -4 y 2, y el ultimo es el tratamiento 5 como se busca la mayor actividad antibacteriana, estadísticamente es el tratamiento 5 el más adecuado. Existe suficiente base estadística para afirmar con un 95% de certeza de que existe la presencia de tres grupos diferenciados, y es el T5 el que brinda estadísticamente mejor poder antibacteriano.

**Cuadro 3. Análisis de varianza de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* frente a *Escherichia coli* a nivel *in vitro* a las 24 horas.**

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre Tratamientos	1209.16	4	302.291	57.40	0.0000
Error Experimental	184.313	35	5.26607		
Total	1393.48	39			

$p \leq 0.05$

Conclusión: Si el facto P es menor a 0.05 si existen diferencias significativas entre los tratamientos

**Cuadro 4. Comparación de medias por el método LSD de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* frente a *Escherichia coli* a nivel *in vitro* a las 24 horas.**

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	8	1.25	X
2	8	8.0625	X
4	8	10.25	XX
3	8	10.9375	X
5	8	18.375	X

Fuente: Datos del Anexo 2

Conclusión: Existen cuatro grupos homogéneos, el primer grupo diferente está constituido por el control, el segundo por los tratamientos 2 y 4, el tercer por el 4 y 3 y el ultimo es el tratamiento 5, como se busca la mayor actividad antibacteriana, estadísticamente es el tratamiento 5 el más adecuado. Existe suficiente base estadística para afirmar con un 95% de certeza de que existe la presencia de tres grupos diferenciados, y es el T5 el que brinda estadísticamente mejor poder antibacteriano.

**Cuadro 05. Comparación de medias por el método LSD de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a *Escherichia coli* a nivel *in vitro* a las 24 horas.**

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	8	1.125	X
3	8	8.125	X
4	8	8.8125	X
2	8	9.0	X
5	8	15.375	X

<i>Contraste entre tratamientos</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
1 - 2	*	-7.875	1.04498
1 - 3	*	-7.0	1.04498
1 - 4	*	-7.6875	1.04498
1 - 5	*	-14.25	1.04498
2 - 3		0.875	1.04498
2 - 4		0.1875	1.04498
2 - 5	*	-6.375	1.04498
3 - 4		-0.6875	1.04498
3 - 5	*	-7.25	1.04498
4 - 5	*	-6.5625	1.04498

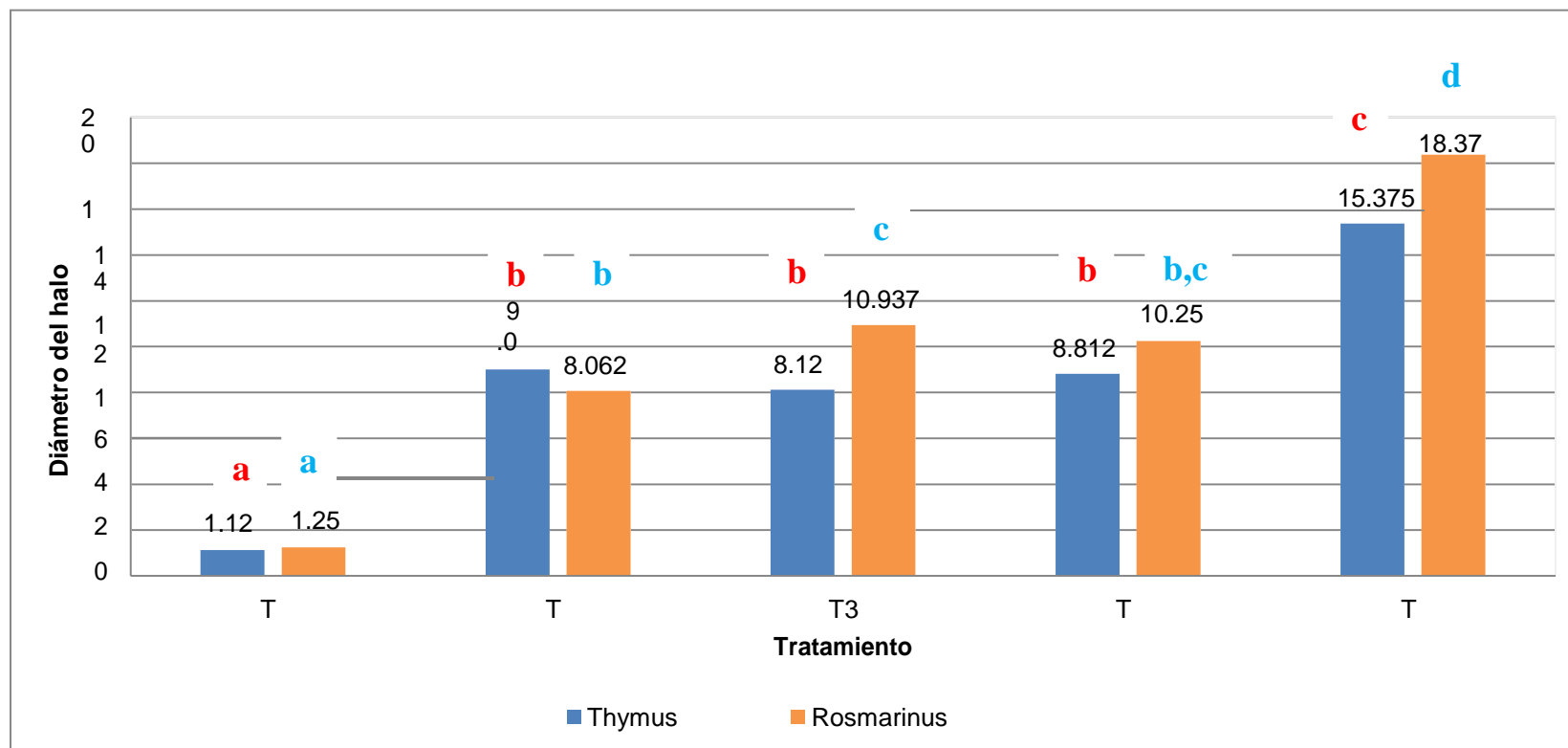
\* indica una diferencia significativa.

**Cuadro 06. Comparación de medias por el método LSD de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* frente *Escherichia coli* a nivel *in vitro* a las 24 horas.**

<i>Tratamientos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	8	1.25	X
2	8	8.0625	X
4	8	10.25	XX
3	8	10.9375	X
5	8	18.375	X

<i>Contraste entre Tratamientos</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
1 - 2	*	-6.8125	2.32934
1 - 3	*	-9.6875	2.32934
1 - 4	*	-9.0	2.32934
1 - 5	*	-17.125	2.32934
2 - 3	*	-2.875	2.32934
2 - 4		-2.1875	2.32934
2 - 5	*	-10.3125	2.32934
3 - 4		0.6875	2.32934
3 - 5	*	-7.4375	2.32934
4 - 5	*	-8.125	2.32934

\* indica una diferencia significativa.



**Gráfico 01.** Comparación de promedios de la actividad antibacteriana de los aceites de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* sobre *Escherichia coli* a nivel *in vitro*

**Donde:** T1: 0%, T2: 5%, T3: 10%, T4: 25%, T5: 100%

Figura 01. Equipo de destilación.



Figura 02. Extracción de aceites esenciales del tomillo/romero

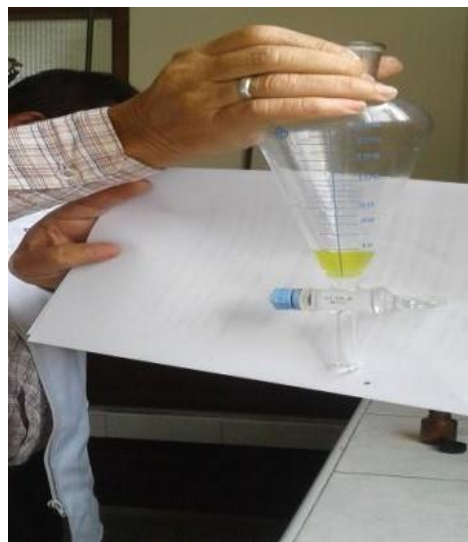


Figura 03. Medida previa recolección de los aceites esenciales de tomillo/romero



Figura 04. Envasado y rotulado de los aceites esenciales de tomillo/romero

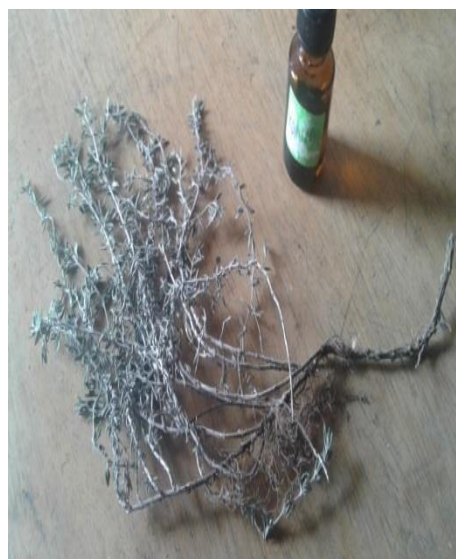


Figura 05. Boleta de adquisición- Agar MacConkey

Laboratorio **Santa Fe** S.A. A. Raymondi 330 - Trujillo - Telefax: 222015  
Cel.: 949676652 / 949439911 / 973371723  
RPM: \*371485 - \*619152

**CONSTANCIA DE ATENCIÓN** Nº **001981**

FECHA: 05/10/2016 HORA: EDAD:

PACIENTE: ROSAS REYES OSWALDO

DIRECCIÓN: TELÉFONO:

**ANÁLISIS SOLICITADOS**

15 gr. de Agar → 50.00  
50 discos estériles (0.20 x E/d) → 10.00

TOTAL S/ 60.00 A CTA 60.00 SALDO: 0.00

REGISTRADOR: COMPROBANTE DE PAGO: Factura: ( ) Boleta: ( )

CONDICIONES PREANALÍTICAS (Declaración verbal del cliente)  
El paciente cumple con lo requerido: SI ( ) / NO ( )

Observaciones:

MUESTRA: Toma ( ) / Recepción ( ) Fecha/hora: ( ) / ( )

ENTREGA DE RESULTADOS: Fecha/hora: ( ) / ( )  
Via Lugar: ( ) / ( )

COMPROMISO ENTRE AMBAS PARTES:  
El paciente cumple con lo requerido: SI ( ) / NO ( )

Conformidad de recepción de resultado  
Firma del Cliente o apoderado: ( )

Firma de conformidad del cliente (paciente o apoderado): ( )  
Número del Muestreador (Laboratorio): ( )  
Nombre: ( )  
DNI: 47518459

CANJEAR POR SU COMPROBANTE DE PAGO

Figura 06. Pesado y preparación - Agar MacConkey



Figura 07. Preparación de material previa a Esterilización.



Figura 08. Esterilización de material en la estufa





Figura 09. Exposición de Agar MaConkey en autoclave- ULADECH



Figura 10. Esterilización de área Lab microbiología- ULADECH



Figura 11. Versión de Agar MacConkey En placas Petri



Figura 12. Microorganismo (*E-coli*) silvestre rejuvenecido.



Figura 13: Determinación de concentraciones (%) AE, nombre, hora y fecha de la ejecución de los sembrados *E-coli*.



Figura 14: Aplicación de los AE T/R (%) en discos (0.625 $\mu$ L)  $^{\circ}$ /u.



Figura 15: Aplicación DMSO (Qp) en discos (0.625 $\mu$ L)- blanco



Figura 16: lectura a las 24 horas. AE tomillo (100%)



Figura 17: lectura a las 24 horas. AE romero (10%)



Figura 18: lectura a las 48 horas. Tomillo AE (100%)



Figura 19: lectura a las 48 horas. Romero AE (10%)



Figura 20: acción antimicrobiana de los AE



Figura 21: Acción antimicrobiana de los AE tomillo 100%.

