



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

BIOLOGIA

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL, EXTRACTO ACUOSO Y ETANOLICO DE *Thymus vulgaris* L. SOBRE EL CRECIMIENTO *in vitro* DE *Etreptococcus. pyogenes* β -hemolitico del grupo A.

TESIS PROFESIONAL

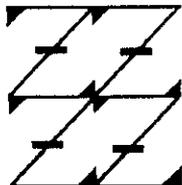
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O
P R E S E N T A N

ALVAREZ ESTRADA LETICIA
ARELLANO VILLAVICENCIO ANGEL V. ^{act} Ma ^{rcos}

UNAM
FES
ZARAGOZA

ASESOR: M. EN C. ELOY SOLANO CAMACHO



MEXICO, D. F.

1998.

LO HUMANO ES
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

266148



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EFFECTO DEL ACEITE ESENCIAL, EXTRACTO ACUOSO Y
ETANÓLICO DE THYMUS vulgaris L. SOBRE EL
CRECIMIENTO in vitro DE Streptococcus pyogenes β -
hemolítico del grupo A.

A G R A D E C I M I E N T O S

AGRADECEMOS AL M. en C. ELOY SOLANO CAMACHO LA DIRECCIÓN Y ASESORIA BRINDADAS PARA LA ELABORACIÓN DE ESTE TRABAJO, POR COMPARTIR CON NOSOTROS SU EXPERIENCIA, AMISTAD Y CONOCIMIENTOS.

NUESTRO ESPECIAL AGRADECIMIENTO AL BIÓLOGO CARLOS CASTILLEJOS CRUZ POR EL TIEMPO DEDICADO Y LA AYUDA PROPORCIONADA EN LA SEPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS.

A LOS H. SINODALES M. en C. ELOY CAMACHO SOLANO, BIOL. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ, Q.F.I. MARIA DE LA LUZ LÓPEZ MARTÍNEZ, I.B.Q. HILDA OLVERA DEL VALLE Y I.Q. ARTURO CANO FLORES, POR SUS VALIOSAS CRÍTICAS Y COMENTARIOS AL MANUSCRITO FINAL, LOS CUALES, CONSTITUYERON UNA HERRAMIENTA MUY ÚTIL EN LA CONCLUSIÓN DEL MISMO.

A LOS COMPAÑEROS DEL LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICO DE LA UNIDAD DE MEDICINA FAMILIAR No. 3 DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, POR SU COOPERACIÓN EN EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LA BACTERIA, SUS COMENTARIOS Y SUGERENCIAS.

A LA Q. F. I. Ma. DE LA LUZ LÓPEZ MARTÍNEZ POR SU APOYO CON EL MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO.

AL Dr. RAMÓN MARCOS SOTO HERNÁNDEZ JEFE DEL LABORATORIO DE FITOQUÍMICA DEL COLEGIO DE POSTGRADUADOS POR LAS FACILIDADES BRINDADAS PARA REALIZAR LA SEPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS.

A LA M. en C. LOURDES CASTILLO GRANADA POR SU AYUDA EN EL DESARROLLO DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES REALIZADA EN EL LABORATORIO DE DESARROLLO TECNOLÓGICO E INVESTIGACIÓN DE LA FES ZARAGOZA UNAM.

A RICARDO ALVAREZ ESTRADA Y LILIANA HARO SAUZA SU COLABORACIÓN Y AYUDA EN EL USO DE LA COMPUTADORA E IMPRESIÓN DE ESTA TESIS.

A NUESTROS PADRES

GRACIAS AL AMOR INCONDICIONAL QUE NOS HAN BRINDADO SIEMPRE, POR HABER INCULCADO LOS PRINCIPIOS QUE RIGEN NUESTRAS VIDAS Y DESPERTAR EN NOSOTROS EL DESEO DE SUPERACIÓN PERSONAL Y PROFESIONAL

A NUESTROS HIJOS ANGEL ALBERTO, EDUARDO Y ESTEFANI.

QUE SON EL EJE EN EL CUAL GIRAN NUESTRAS VIDAS.
CON TODO NUESTRO AMOR.

A NUESTROS HERMANOS

POR LA AYUDA Y APOYO QUE SIEMPRE NOS HAN BRINDADO.

ANGEL Y LETY.

C O N T E N I D O

PAG.

RESUMEN.	
INTRODUCCIÓN.	
I ANTECEDENTES.	1
II MATERIAL Y MÉTODO:	23
2.1 DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DEL TOMILLO.	23
2.2 PREPARACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL, EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO:	
2.2.1 DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR DE AGUA.	23
2.2.2 INFUSIÓN.	24
2.2.3 MACERACIÓN.	25
2.3 SEPARACIÓN DE SUSTANCIAS DEL DESTILADO, MACERADO Y ACEITE ESENCIAL COMERCIAL.	29
2.3.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.	29
2.3.1.1 DETERMINACIÓN DEL Rf.	30
2.3.1.2 PRUEBA QUÍMICA (anisaldehído-H ₂ SO ₄ concentrado).	30
2.3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES.	31
2.4 P R U E B A S B I O L Ó G I C A S .	32
2.4.1 RECOLECCIÓN, PREPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CULTIVO FARÍNGEO .	32

2.4.2	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD CON EXTRACTOS CRUDOS.	36
2.4.2.1	PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE BACTERIAS.	37
2.4.2.2	INOCULACIÓN DE LAS PLACAS.	37
2.4.3	PRUEBAS DE SENSIBILIDAD CON EXTRACTOS OBTENIDOS DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.	40
III.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	41
IV.	CONCLUSIONES.	61
V.	GLOSARIO.	62
VI.	BIBLIOGRAFIA.	66
VII.	ANEXO.	71

CONTENIDO DE CUADROS.

	PAG.
1. USO ACTUAL DE LA PENICILINA.	7
2. POSOLOGÍA DE LA PENICILINA.	8
3. COMPUESTOS PRESENTES EN 100 g DE TOMILLO.	21
4. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LA COLONIA DE <u>Streptococcus pyogenes</u> β -HEMOLÍTICO DEL GRUPO A.	34
5. TABLA DE RESULTADOS DE LA PREPARACIÓN DE EXTRACTOS .	41
6. TABLA DE RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA .	42
7. TABLA DE RESULTADOS DE LA DISTANCIA RECORRIDA EN LA PLACA CROMATOGRÁFICA .	44
8. TABLA DE R_f TEÓRICO Y EXPERIMENTAL.	44
9. RESULTADOS DE LA PRUEBA QUÍMICA.	45
10. CONCENTRACIÓN DE LAS SUSTANCIAS IDENTIFICADAS.	54
11. TABLA DE RESULTADOS DEL HALO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO CON ACEITE ESENCIAL, MACERADO, INFUSIÓN, PATRÓN Y PENICILINA.	55
12. HALO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO CON EXTRACTOS OBTENIDOS DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA .	59

13. HALO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO CON
CRISTALES DE TIMOL EXTRAIDOS DE Thymus capitatus L. 60

CONTENIDO DE FIGURAS.

1. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LA CÁPSULA, PARED CELULAR
Y MEMBRANA CITOPASMÁTICA DE LA CÉLULA DE
Streptococcus pyogenes β -HEMOLÍTICO DEL GRUPO A. 4
2. COLONIAS MUCOIDES, MATES Y BRILLANTES FORMADAS
POR LOS ESTREPTOCOCOS HEMOLÍTICOS DEL GRUPO A. 5
3. COLONIAS DE ESTREPTOCOCOS EN LA SUPERFICIE DE
UNA PLACA DE AGAR - SANGRE. 6
4. ESTRUCTURA BÁSICA DE LA PENICILINA. 7
5. PLANTA DE Thymus vulgaris L. 15
6. FÓRMULA ESTRUCTURAL DEL TIMOL Y EL CARVACROL. 17
7. ESQUEMA DE LOS R_f DEL DESTILADO Y MACERADO DEL
TOMILLO COMPARADOS CON UN PATRÓN. 43
8. DIAGRAMA CON LOS COLORES DESARROLLADOS CON
LA PRUEBA QUÍMICA REALIZADA AL DESTILADO
MACERADO Y PATRÓN. 46
9. CROMATOGRAMA DEL DESTILADO. 48
10. CROMATOGRAMA DE LA INFUSIÓN. 49

11.	CROMATOGRAMA DEL MACERADO.	50
12.	CROMATOGRAMA DEL DESTILADO OBTENIDO DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.	51
13.	CROMATOGRAMA DEL MACERADO OBTENIDO DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.	52
14.	CROMATOGRAMA DEL PATRÓN.	53
	ANEXO. RESULTADOS REPORTADOS POR E. STAHL Y H. JORK (1962).	71

R E S U M E N .

Se evaluó un tratamiento alternativo, de bajo costo, para ratificar la efectividad del tomillo en el tratamiento terapéutico de la faringoamigdalitis bacteriana.

La actividad biológica del aceite esencial, extracto acuoso y etanólico de Thymus vulgaris L. se evaluó mediante la determinación del halo de inhibición sobre el crecimiento en agar gelosa - sangre de Streptococcus pyogenes β -hemolítico del grupo A de Lancefield, principal causante de esta enfermedad, muy frecuente en la población humana y que en la medicina oficial es tratada con penicilina. Se realizaron pruebas de sensibilidad y se midieron las zonas de inhibición *in vitro*. Con el aceite esencial, se registró la mayor zona de inhibición, el diámetro del halo fue de 3.0 - 3.5 cm, inclusive superó al de la penicilina que en este caso el rango fue de 2.4 - 2.5 cm, con el extracto etanólico la inhibición fue mucho menor y con el acuoso no hubo inhibición.

Se analizó el aceite esencial y el extracto etanólico mediante cromatografía en capa fina y pruebas químicas obteniéndose la presencia de timol y en menor cantidad carvacrol.

Al realizar una cromatografía de gases se corroboraron los resultados anteriores obteniendo las concentraciones de las sustancias. También se evaluó la efectividad de los cristales puros de timol sobre el crecimiento bacteriano y se encontraron halos máximos de 1.6 - 1.7 cm, éstos fueron menores que los obtenidos con el aceite esencial.

I N T R O D U C C I Ó N .

La Etnobotánica es la parte de la botánica que estudia las interrelaciones que se establecen entre el hombre y las plantas. En este sentido, destaca el interés por rescatar conocimientos e información fundamental, acerca de las plantas, preservados estos conocimientos ya sea por el aislamiento o por la persistencia de particulares aspectos de la cultura que los utiliza.

En la actualidad se han descrito aproximadamente 250,000 especies de angiospermas, de las cuales únicamente el 10 % de ellas, se les han hecho estudios químicos y farmacológicos. En nuestro país se calcula que crecen más de 30,000 especies de plantas vasculares, algunas de ellas conocidas y usadas conforme a las tradiciones, por los 56 grupos étnicos que habitan en México. Sin embargo, sólo se han registrado 3,000 especies medicinales y un 10 % se han estudiado en el laboratorio. Se piensa que 15,000 especies de plantas vasculares pueden ser medicinales. Por tanto, México es una fuente potencial de fármacos y en donde la mayoría de la flora medicinal mexicana está siendo desaprovechada (Estrada, 1985).

Por tal razón, el presente trabajo tiene como objetivo contribuir a enriquecer la información y conocimiento de la flora que es utilizada con fines medicinales.

En México, un problema de salud de gran importancia es la faringoamigdalitis estreptocócica. Esta enfermedad es causada por la bacteria Streptococcus pyogenes β -hemolítico del grupo A de Lancefield que provoca con

mucha frecuencia, sinusitis, otitis, neumonías, etc. y problemas inmunológicos secundarios muy graves como la fiebre escarlatina, glomerulonefritis y fiebre reumática, esta última, genera lesiones cardíacas hasta en un 80 % a las personas que la han padecido (Chavez, 1973; Gwaltney, 1971; Anónimo A, 1992).

Actualmente el agente quimioterapéutico de elección usado para atacar la infección es la penicilina. La administración de este medicamento provoca efectos tóxicos indeseables que afectan a la mayoría de aparatos y sistemas del organismo humano; además, el abuso en la aplicación de la penicilina puede lograr que el microorganismo desarrolle resistencia a este fármaco.

Un tratamiento terapéutico alternativo para éste y otros padecimientos se encuentra en la herbolaria. En este caso el tomillo (Thymus vulgaris L.), ha sido usado como agente antiviral y antibacteriano en las enfermedades anteriormente mencionadas. En nuestro país la medicina tradicional siempre ha gozado de gran aceptación entre la población, practicándose desde tiempos inmemoriales. En México, las plantas medicinales son utilizadas por un 66 % de la población para resolver sus problemas de salud. Aunado a esto, en los centros urbanos, durante los últimos años ha surgido un reencuentro con la naturaleza, lo que ha provocado que a los conocimientos de la medicina moderna se les agreguen los de la medicina tradicional para obtener modelos terapéuticos menos agresivos al organismo y más accesibles a la economía doméstica.

I ANTECEDENTES .

En la práctica médica y en la consulta del médico familiar es muy frecuente atender a pacientes con faringoamigdalitis estreptocócica, una enfermedad bacteriana. Las bacterias son organismos morfológicamente simples y uno de los principales grupos de procariontes. Sus células se caracterizan por una falta de diferenciación interna, es decir, el material nuclear no está rodeado por una membrana, carecen de nucleolo, plastidios, mitocondrias, aparato de Golgi y de la organización cromosómica presente en los eucariotas. El material nuclear presenta ácido desoxirribonucleico (A D N) que forma fibrillas muy pequeñas a menudo localizadas cerca del centro de la célula (Scagel *et al.*, 1991).

Las enzimas respiratorias están dispersas por toda la célula aunque pueden hallarse concentradas sobre la membrana plasmática. Algunas células bacterianas tienen flagelos. La pared celular (peptidoglicano) de los procariontes es única al contener grandes cantidades de nitrógeno en forma de aminoácidos y aminoazúcares. Las bacterias se propagan por división celular, bipartición o escisión binaria. Son organismos unicelulares o coloniales, la mayoría oscila entre 1 y 5 μm , son heterótrofos y requieren compuestos orgánicos externos para conseguir energía y asimilar el carbono. Se les clasifica en el reino Monera, subreino procarionte y división Esquizomicófito (Scagel *et al.*, 1991).

La faringoamigdalitis se considera en México como un problema de salud de gran importancia (Baeza, 1987; Mandell, 1991). Pero más graves son las reacciones inmunológicas que se producen si no es tratada

a tiempo, entre ellas destacan: la fiebre escarlatina, glomerulonefritis y fiebre reumática de curso agudo o subagudo; ésta última tiene importancia fundamental en la generación de padecimientos cardiovasculares, ya que el 80 % de las personas que sufren fiebre reumática quedan con lesiones cardíacas (Chávez, 1973).

El Streptococcus pyogenes β -hemolítico del grupo A, ataca principalmente corazón, articulaciones y tejido subcutáneo; además, es capaz de producir daño tisular con secuelas cicatriciales en el miocardio específico (trastornos de la conducción) o focos de fibrosis que en ocasiones se manifiestan como de automatismo ectópico en el miocardio inespecífico (dilatación cardíaca) y con más frecuencia en el endocardio (valvulopatías reumáticas).

En México se han calculado alrededor de 3,000 muertes al año debido a este padecimiento y su índice de frecuencia es similar a la encontrada en la década de 1940 a 1950 (Guadalajara, 1990).

La flora normal de las vías respiratorias superficiales suele estar formada por Staphylococcus, Streptococcus, bacilos difteroides y cocos gram negativos; sin embargo, por algún proceso inflamatorio de tipo alérgico o infeccioso de origen viral y disminución de las defensas, se presenta colonización de cepas bacterianas con mayor patogenicidad, en especial de Streptococcus pyogenes β -hemolítico del grupo A de Lancefield que causa la faringoamigdalitis, sobre todo en la población de entre 5 y 15 años de edad (Anónimo A, 1992).

Billroth, en 1874 describió por primera vez, microorganismos esféricos que crecían formando cadenas a partir de exudados purulentos de

lesiones de erisipela y heridas infectadas. Las primeras clasificaciones de estos microorganismos se basan en su capacidad para hemolizar, cuando son cultivadas en agar - sangre de carnero. En 1919, Brown introdujo los términos α , β y γ para describir los tres tipos de reacción hemolítica.

A partir de los trabajos de Lancefield en 1933, los Streptococcus β -hemolíticos fueron diferenciados en Grupos Inmunológicos, designados actualmente por letras que van desde la A hasta la O (Mc Carty, 1984).

En agar - sangre de carnero los Streptococcus β -hemolíticos producen una zona de hemólisis completa amplia y clara, en la que por examen microscópico no se observan glóbulos rojos. Las causantes de la hemólisis se conocen como hemolisinas y se reconocen como estreptolisina O y estreptolisina S. La primera se destruye con el oxígeno atmosférico y se observa en las colonias profundas donde el oxígeno se encuentra ausente. La estreptolisina S, presenta estabilidad en condiciones aerobias y es responsable de la hemólisis de las colonias superficiales.

El Streptococcus pyogenes β -hemolítico del grupo A de Lancefield, esta formado por una membrana citoplasmática y una pared celular compuesta de varias capas: la pared interna esta formada por mucopéptidos que le proporcionan rigidez a la célula, la penicilina inhibe la formación de estos mucopéptidos; la capa media contiene carbohidratos entre los que se encuentra el carbohidrato C; con base en esta peculiaridad, Lancefield estableció los diferentes grupos antigénicos anteriormente mencionados, ya que observó que

la estructura química de este carbohidrato origina una capacidad antigénica específica; la capa externa contiene tres antígenos proteicos llamados M, T y R; el antígeno M está relacionado con la virulencia del microorganismo, ya que tiene propiedades antifagocitarias. Entre los componentes químicos extracelulares se encuentran las estreptolisinas O y S, enzimas como hialuronidasa, desoxirribonucleasa, proteinasa, ribonucleasa, amilasa y difosfopiridin-nucleotidasa, sustancias todas ellas con capacidad antigénica (De Krause, 1963) (Figura 1).

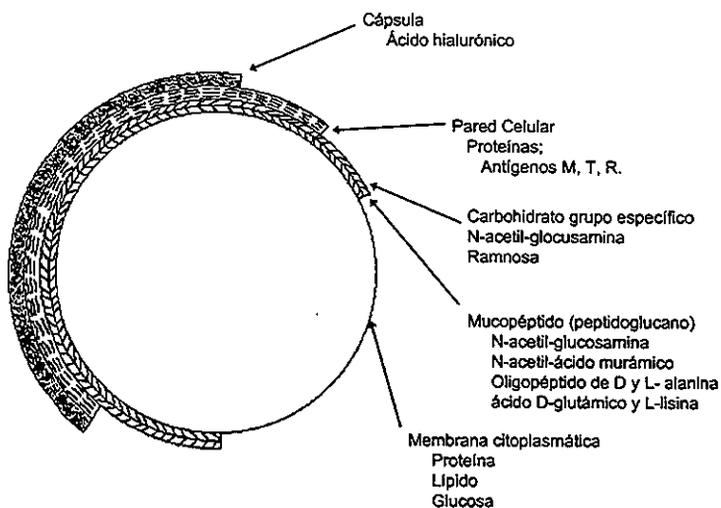
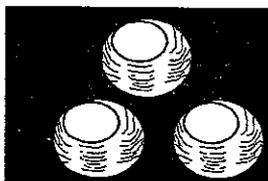


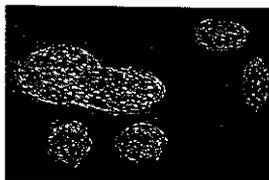
Figura 1. Diagrama esquemático de la cápsula, pared celular y membrana citoplasmática de la célula de *Streptococcus pyogenes* β -hemolítico tipo A (De Krause, 1963).

Muchos *Streptococcus* hemolíticos producen cápsulas que en el grupo A están compuestas de ácido hialurónico y debido a esta característica al sembrarlas en placas de agar - sangre forman tres

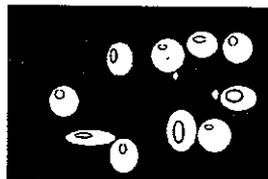
tipos de colonias, que reciben el nombre de mucoides, mate y brillante; las mucoides son cepas que producen cápsulas de gran tamaño, la abundancia de gel de ácido hialurónico da a la colonia un aspecto acuoso y reluciente; las mate son colonias planas y rugosas debido a que el gel se deshidrata, esto provoca una contracción de la superficie, y las brillantes son células de menor tamaño que no producen hialuronato (McCarty, 1984) (Figura 2).



MUCOIDES



MATES



BRILLANTES

Figura 2. Comparación de las colonias mucoides, mates y brillantes formadas por los estreptococos hemolíticos del grupo A, cultivadas en agar - sangre que se forman en la superficie de las placas (Lancefield, 1942).

Para la identificación de los organismos del grupo A, con las técnicas utilizadas para la determinación del grupo y del tipo de los Streptococcus hemolíticos, es de gran importancia el empleo de placas de agar - sangre para detectar la hemólisis β de estos organismos (McCarty, 1984) (Figura 3).

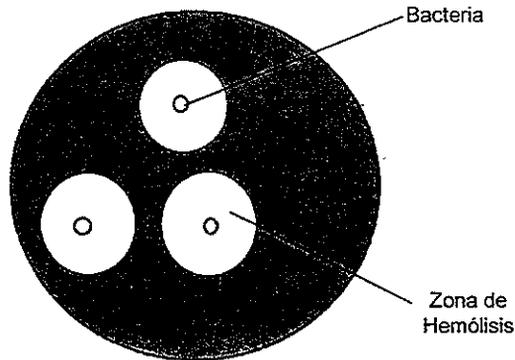
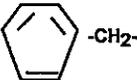
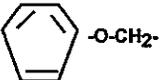


Figura 3. Colonias de Streptococcus pyogenes en la superficie de una placa de agar-sangre. La porción clara del círculo es la zona de hemólisis β .

Un método simple, no inmunológico para reconocer Streptococcus pyogenes (del grupo A), se basa en el hecho de que la mayor parte de las cepas de este grupo, son mucho más sensibles a la bacitracina que las cepas de otros grupos (Maxted, 1953),¹ la confiabilidad de la prueba es de 90 a 95 % (Ruiz, 1986).

El agente quimioterapéutico de elección que se usa actualmente para atacar la infección producida por Streptococcus β -hemolítico del grupo A de Lancefield es la penicilina, ya que estos microorganismos son sensibles a ella (Berkow, 1989). La cadena lateral de la penicilina, que inhibe el crecimiento de la bacteria antes referida se muestra en el cuadro 1.

¹ Maxted, W. R. 1953. J. Clin. Path. 6:223.

Espectro Antimicrobiano	Enfermedad	Nombre genérico del fármaco elegido	Cadena Lateral
<u>Streptococcus pyogenes</u> β-hemolítico del grupo A de Lancefield.	Faringitis	Penicilina G	 -CH ₂ -
	Escarlatina Otitis media Sinusitis Glomerulonefritis Fiebre reumática	Penicilina V	 -O-CH ₂ -

Cuadro 1. Uso actual de la penicilina en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas (Mandell · *et al.*, 1991).

Las penicilinas constituyen un amplio grupo de antibióticos bactericidas que tienen en común un núcleo formado por el ácido 6-aminopenicilánico (6 APA).

La estructura básica de la penicilina, consiste en un anillo tiazolidina (A), unido a un anillo β-lactámico (B), el cual se une por una cadena lateral (R) (Figura 4).

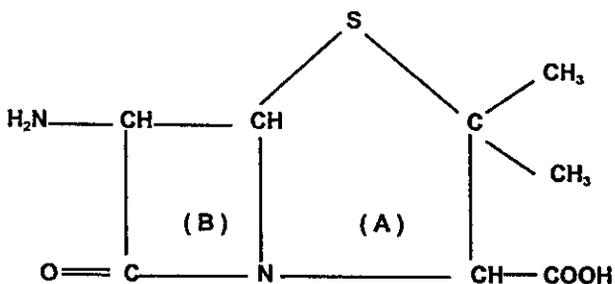


Figura 4. Estructura básica de la penicilina (Farrar, 1978).

La acción bactericida de la penicilina reside en su capacidad para inhibir funciones metabólicas vitales, involucradas en la síntesis de los compuestos químicos que conforman la pared celular bacteriana y de activar enzimas que destruyen dicha pared. Las penicilinas afectan solamente las bacterias en multiplicación activa, fijándose a las proteínas plasmáticas y sólo es activo el fármaco libre cuya actividad se produce cuando el complejo se disocia (Neu, 1985).

La administración y dosis del antibiótico se observan en el cuadro 2.

Fármaco	Vía Oral		Vía Intramuscular		Vía Intravenosa	
	Dosis/día(g)	Intervalo(h)	Dosis/día(g)	Intervalo(h)	Dosis/día(g)	Intervalo(h)
Penicilina G Sódica / Potásica	—	---	0,2-2MU	4-6	1-40MU	4-6
Penicilina G Benzatina	---	---	0,6-1,2MU	15-30 días	---	---
Penicilina Procaina	---	---	0,6-1,2MU	24	---	---
Penicilina V	1-2	6	---	---	---	---

**Cuadro 2. Posología de la penicilina (Perea, 1992).
MU Megaunidades (millones).**

Después de administrar el antibiótico (penicilina) pueden aparecer síntomas indeseables que afectan a la mayoría de los aparatos y sistemas del organismo humano. Estos efectos pueden deberse a la reconocida toxicidad directa del fármaco o a la hipersensibilidad del paciente. Las reacciones alérgicas a la penicilina pueden ser de varios

tipos y dependen de sus manifestaciones clínicas y de su posible mecanismo de presentación (Idsoe, 1968)².

Las penicilinas son potentes sensibilizantes y pueden producir dos tipos de reacciones alérgicas: la inmediata, provoca anafilaxia (con posibilidad de muerte súbita), urticaria y edema angio - neurótico; la retardada produce la enfermedad del suero, diversos exantemas (macular, paular y morbiliforme) y dermatitis exfoliativa, que suele aparecer después de 7 a 10 días de iniciado el tratamiento (Berkow, 1989).

Las dosis altas pueden producir toxicidad del sistema nervioso central, especialmente si la función renal está disminuida (Berkow, 1989), además, causan nefropatías (Baldwin *et al.*, 1968)³, anemia hemolítica con prueba de Coombs positiva (Petz *et al.*, 1966)⁴ y leucopenia o trombocitopenia.

Todas las penicilinas a dosis intra venosas muy altas pueden interferir en la función plaquetaria y causar sangrado, especialmente en pacientes con insuficiencia renal. Con el uso de cualquier penicilina se puede producir colitis pseudomembranosa, más frecuente quizá, por vía oral que por vía parenteral.

Otras reacciones incluyen: dolor en el área donde se aplican las inyecciones intra - musculares; las inyecciones intra - venosas provocan tromboflebitis y los preparados orales alteraciones gastrointestinales además, pueden ennegrecer la lengua debido a la irritación de la superficie lingual y a la queratinización de sus capas superficiales y alteraciones en el metabolismo de potasio, sodio y alcalosis hipocaliémica.

² Idsoe, O.T., *et al.* 1968. Bull World Health Organ. 38:159-188.

³ Baldwin, D.S. *et al.* 1968. New Engl. J. Med. 279:1245-1252.

⁴ Petz, L.D.; H. Fudmberg. 1966. New Engl. J. Med. 274:171-178.

Por otro lado, las bacterias pueden desarrollar resistencia al fármaco y producir una sobre infección, resistencia que puede aparecer rápidamente o después de tratamientos prolongados o repetidos (Berkow, 1989).

Se han detectado contaminantes protéicos en las preparaciones comerciales de penicilina que se producen durante la manufactura o el almacenamiento, habiéndose sugerido que son posibles causas de alergia a la penicilina (Dürsch, 1968)⁵.

Por tal motivo, es necesario buscar otro tipo de tratamiento terapéutico y una alternativa es la herbolaria.

El origen de la herbolaria se pierde en el tiempo. El hombre, siempre ha empleado materiales vegetales, animales o minerales que pueden aliviar sus enfermedades, pero principalmente vegetales.

La evolución biológica y cultural del hombre ha menguado sus facultades instintivas, aunque mucha de la información sobre plantas medicinales que han acumulado las diferentes culturas humanas, se ha preservado a través de la comunicación oral. Inclusive, hoy en día buena parte de los medicamentos de patente tienen su origen en las plantas.

En este sentido, la disciplina que se encarga de estudiar las interacciones del hombre con los vegetales, es la Etnobotánica y ha surgido en diversos países como respuesta al interés por rescatar información acerca del uso de las plantas, preservado este conocimiento por el aislamiento de algunas poblaciones humanas o por la persistencia de particulares aspectos de la cultura que las utiliza.

⁵ Dürsch, F. 1968. Lancet. 1:1005-1007.

"Junto con el estudio etnobotánico y botánico de las especies medicinales y comestibles, es menester hacer estudios históricos, ecológicos y etnológicos que permitan entender mejor el papel de las plantas dentro de un contexto cultural y biológico" (Martínez, 1978).

La Etnobotánica es el eslabón más fuerte que se puede establecer entre las ciencias sociales y la naturaleza; por medio de ellas, es posible observar como el hombre se relaciona con las plantas dentro de un contexto cultural, es decir, siempre se deberá analizar la trilogía: planta - hombre - cultura en forma global y no aislada (Martínez, 1978).

Además, la Etnobotánica contribuye a rescatar la riqueza cultural y biológica, que tienden a desaparecer si no se recuperan pronto y adecuadamente (Rzedowski, 1978).

Von Reis (1975) elaboró un catálogo de plantas útiles usadas como droga y alimento a nivel mundial, en él incluye 2,500 especies de plantas domesticadas y silvestres con su nombre científico, número de recolecta, nombre común y breve descripción acerca de cómo se usan.

En México, antes de la llegada de los españoles, los indígenas ya conocían y empleaban las plantas para curar diferentes enfermedades.

La cultura azteca estuvo familiarizada con el uso terapéutico de las plantas medicinales y de algunos minerales, conocimiento registrado por Martín de la Cruz, Francisco Hernández y Fray Bernardino de Sahagún (Cruz, 1964).

El código De la Cruz-Badiano es el documento botánico - médico más antiguo de América, fue realizado por el médico xochimilca Martín de la Cruz en 1552 y traducido al latín por Juan Badiano, profesor del Colegio de Santa Cruz de Tlatelolco. Francisco Hernández en 1570 registró en

su libro "Historia de las plantas de la Nueva España" entre otras especies vegetales el Nextamalxochitl oapanence, Tecoma stans L. (tronadora), ésta planta ha sido usada en el tratamiento de la diabetes, actualmente se sabe que contiene el alcaloide tecomina clasificado como hipoglucemiante (Anónimo C, 1983).

Nezahualcóyotl (1403 - 1474) rey de Texcoco, fundó en Texcotzingo, el jardín botánico medicinal más importante del México Antiguo, mismo que llegó a ser el más sobresaliente centro botánico - médico del Valle de Anáhuac (Valdés, 1974).

Con la llegada de los españoles se enriqueció la flora medicinal que usaban los antiguos mexicanos, debido a la introducción e incorporación de nuevas especies, como arnica Europea, marihuana, la albahaca y tomillo entre otras.

Actualmente, en México el 66 % de la población rural atiende sus enfermedades con plantas medicinales (Anónimo B, 1978).

La Organización Mundial de la Salud en 1978, reconoció la importancia de las plantas medicinales en los países en desarrollo; así como, en la preparación de fármacos y propuso una definición de planta medicinal y fármaco vegetal.

"Una planta medicinal, es cualquier planta en la que uno o más de sus órganos contienen sustancias que pueden ser usadas con propósitos terapéuticos o que son precursores para la síntesis de fármacos".

"Un fármaco vegetal, es la parte de la planta medicinal usada con propósitos terapéuticos".

A nivel mundial existe una gran diversidad de organismos vegetales que pueden ser utilizados con fines medicinales, hasta el momento, se

han descrito aproximadamente 250, 000 especies de angiospermas, de las cuales solo un 10 % de ellas se les ha estudiado química y farmacológicamente. En nuestro país crecen aproximadamente 30, 000 especies de plantas vasculares, algunas de ellas son conocidas y usadas de acuerdo a la cosmovisión de cada uno de los 56 grupos étnicos de México. Sin embargo, sólo se han registrado 3, 000 especies medicinales y un 10 % han sido objeto de estudio científico. Se piensa que 15, 000 especies de plantas vasculares pueden ser medicinales. Por tanto, México es una fuente potencial de fármacos y en donde la mayoría de la flora medicinal mexicana está siendo desaprovechada (Estrada, 1985).

Actualmente, el uso de las plantas medicinales tiene gran aceptación entre la población, esto ha provocado que la ciencia se interese en estudiarlas y analizarlas, sobre todo aquellas que contienen sustancias de origen natural, útiles en el tratamiento de algunas enfermedades, entre las que destaca el tomillo.

El tomillo es una planta europea de origen mediterráneo, pertenece a la familia Lamiaceae, que incluye 4, 000 especies, agrupadas en 200 géneros. Thymus es el género en el cual se ubica el tomillo y contiene aproximadamente de 50 a 70 especies todas conocidas de Europa (Van Den Broucke, 1983).

Thymus vulgaris L., es una hierba aromática con tallos ramificados, a menudo leñosos, crece como un pequeño arbusto y alcanza una altura de 15 - 45 cm., las pequeñas hojas opuesto - cruzadas, con márgenes revolutos están cubiertas en el envés por tricomas. En las axilas foliares superiores desarrollan numerosas flores, pequeñas, bilabiadas y rosadas

que crecen en falsos verticilos. Las flores bisexuales, de mayor tamaño tienen estambres protuberantes; las femeninas son más pequeñas (Bailey, 1951; William, 1980), crece en suelos ligeros calcáreos o arcillosos y con mucho menor frecuencia en silíceos (Simon, 1984). Debido a que se usa frecuentemente como condimento y medicina, se cultiva en huertos familiares donde se propaga por medio de semilla o esqueje (Masefield, 1980) (Figura 5).



Figura 5. Reino Vegetal
División Magnoliophyta (Angiospermas)
Clase Magnoliopsida (Dicotiledoneas)
Orden Lamiales
Familia Labiatae (Lamiaceae)
Género Thymus
Especie T. vulgaris L.

La planta tiene un aroma agradable debido a la gran cantidad de monoterpenos que conforman su aceite esencial, el cual es excretado por glándulas que a menudo pueden verse como manchas translúcidas sobre las hojas (Masefield, 1980). Florece en primavera, a partir del mes de marzo (Font, 1980). Los brotes jóvenes y frescos se usan para condimentar carnes, ensaladas, quesos, pescados, licores, olivos, sopas, tomates y vinagres.

La cantidad de aceite esencial de la planta en estado seco llega a ser hasta 3 %, pero varía posiblemente a dos razones: los factores intrínsecos o factores inherentes a la constitución genética de la planta y los extrínsecos que dependen de las condiciones ecológicas en que crece la misma (Font, 1980; Van Den Broucke, 1983).

Estudios fitoquímicos, ecológicos y genéticos de varias especies del género Thymus, especialmente de Thymus vulgaris, han demostrado que hay por lo menos 7 quimiotipos del aceite esencial, los cuales difieren en su composición química, esta última actúa de manera diferente en la actividad antimicrobiana, estas diferencias pueden deberse a: lugar de donde proviene la planta, época de recolección, planta fresca o seca, técnica de extracción y parte de la planta de donde se obtiene el aceite (Granger⁶ et. al., 1973; Vernet⁷ et al., 1977).

Durante la década de 1976 a 1986, un gran número de estudios fueron realizados en relación a la actividad antimicrobiana del aceite esencial del tomillo. Se concluyó que el examen y evaluación de

⁶ Granger, R; J. Passet. 1973. Phytochem. 12:1683.

⁷ Vernet, P., et al. 1977. Oecol.Plant. 12:159 and 12:181.

estos aceites es difícil a causa de su volatilidad, baja solubilidad en agua y la cantidad de sus constituyentes químicos. Cuatro factores son especialmente importantes durante el análisis biológico de los aceites esenciales: la técnica ensayada, el medio de enriquecimiento, el microorganismo y el aceite esencial (Janssen *et al.*, 1986).

Otros estudios realizados *in vitro* sobre la actividad antimicrobiana de Thymus vulgaris L. reportan inhibición del crecimiento de Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Candida albicans y Pseudomona aeruginosa (Girón, 1983; Janssen *et al.*, 1986; Cáceres *et al.*, 1987).

Las propiedades antisépticas de Thymus vulgaris L., fueron atribuidas a su aceite esencial rico en timol y carvacrol (Pellecuer *et al.*, 1980)⁸ cuyas fórmulas estructurales se muestra en la figura 6.

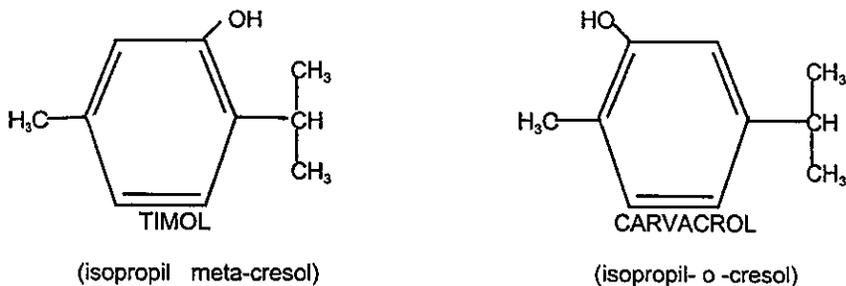


Figura 6. Fórmulas estructurales de 2 aceites esenciales extraídos de Thymus (San Martín, 1977).

El aceite de tomillo incrementa la acción expectorante debido a sus componentes solubles en agua (De Keuning, 1951)⁹.

⁸ Pellecuer, I.; M. Jacobs. 1980. *Plant Med.* 14:83.

⁹ De Keuning, J.C. 1951. *Disertation.* Utrecht.

Asimismo, se informa mayor actividad espasmódica con el extracto de la planta fresca comparada con la inactividad de la planta seca (Lendle *et al.*, 1957)¹⁰.

Del mismo modo, se sugiere una acción antiespasmolítica análoga a la papaverina (Debelmas *et al.*, 1964).¹¹

Las propiedades antihelmináticas, antifungicidas, antibactericidas y antivirales del tomillo son debidas, a la presencia de la acción antiséptica del timol (De Bouchberg *et al.*, 1976)¹².

Van Den Broucke (1980) encontró que el extracto líquido de Thymus tiene propiedades relajantes al estudiar *in vitro* la actividad espasmolítica en músculo liso de tráquea e íleon de cerdo de guinea.

Al evaluar la actividad antifungística del extracto de Thymus vulgaris, Guèrin *et al.*, (1985), encontraron que se inhibió la germinación de esporas en 9 especies de hongos: Scchoromyces pastorianus, Candida albicans, Rhizopus nigricans, Aspergillus niger, Penicillium digitatum, Botrytis cinerea, Farium oxysporium, Trichophyton mentagrophytes.

Varios componentes del aceite esencial (incluido el de Thymus vulgaris), especialmente los sustituidos con fenoles han mostrado que impiden el crecimiento de bacterias y hongos e inhiben la energía metabólica catalizada por la membrana de la célula. Algunos componentes se han examinado químicamente *in vitro* para evaluar su capacidad como barredores de radicales de oxígeno. En este sentido los fenoles sustituidos del timol, carvacrol, eugenol e isoeugenol, (componentes de los aceites esenciales) revelaron una mayor capacidad (Knobloch *et al.*, 1993).

¹⁰ Lendle, L.; Lü-Fu Hua. 1937. Schmiedeb. Arch. 184:89.

¹¹ Debelmas, A.M.; J.Rochet. 1964. Bail.Trav.Soc.Farm.Lyon. 3:163-172.

¹² De Bouchberg, et al. 1976. A.Riv.Ital.Ess.Prof. 58:527-536.

Brantner *et al.*, (1993) al evaluar la actividad antibacterial de los flavonoides, encontraron problemas en la solubilidad de los componentes lipofílicos en medio acuoso, los resultados mostraron un fuerte efecto contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, en proporción a la mostrada por la tetraciclina.

Debido al incremento en la frecuencia de micosis cutánea transmitidas por animales domésticos (especialmente de Microsporium canis y Microsporium gypseum) y reportes de quimioresistencia demostrada por dermatofitos, se examinó *in vitro* la actividad antifúngica del aceite esencial de Thymus vulgaris, los resultados mostraron mayor efectividad como antimicótico y se demostró que a bajas dosis es fungistático y fungicida a altas concentraciones (Perrucci *et al.*, 1994).

El ungüento derivado de la planta es un remedio tradicional para la insolación y el tratamiento de las verrugas. El té de tomillo se usa contra el dolor de cabeza. Además, es útil para tratar bronquitis, catarro, cólicos, fiebre, gota, laringitis, reumatismo, fiebre escarlatina, ciática, dolor de garganta, verrugas y tosferina. Es considerado antiséptico, antiespasmódico, carminativo y tónico. Los fumadores de tabaco lo usan contra la indigestión, somnolencia y dolor de cabeza (Duke, 1981; Simon *et al.*, 1984).

Según Duke (1981), el tomillo quemado, supuestamente repele los insectos. El Timol, uno de sus aceites esenciales, es antiséptico, desodorante, fungicida y se agrega como ingrediente de las pastas dentífricas (Volák *et al.*, 1988). Es usado como sustancia preservativa y en el tratamiento de quemaduras, excemas, esporiasis, tiña y helmintiasis. Se aplica externamente como conirritante y rubefaciente, calmante de dolor,

antiespasmódico, carminativo, depurativo, diaforético, digestivo, diurético, expectorante, sedativo, estimulante y vermífugo.

En la medicina tradicional se usa para tratar la anemia, asma, respiración deficiente, bronquitis, catarro, cólicos, tos, calambre, debilidad, diarrea, dismenorrea, fiebre, flatulencia, gastritis, gastroenteritis, gingivitis, gota, dolor de cabeza, indigestión, leucorrea, neuralgias, ciática, esclerosis, dolor de garganta, espasmos, dislocaciones, estomatitis, verrugas, tosferina y helmintos (Duke, 1981; List¹³, 1969-1979).

En medicina tradicional en el caso de enfermedades respiratorias, se prepara una infusión: a una tasa de agua hirviendo se le agrega una ó dos cucharaditas de hojas frescas o secas. Se deja reposar 10 minutos y se toma una tasa de tres a cuatro veces al día (William, 1980), en herbolaria la tintura se toma en dosis de veinte a cuarenta gotas y el aceite esencial de tomillo en dosis de una a cinco gotas (Shellard, 1988).

Las propiedades curativas se adjudican a los componentes del aceite esencial que contiene α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, α -felandrin, limoneno, 1-8-cineol, p-cimeno, linalol, acetato de linalilo, acetato de bornilo, terpenil-4-ol, acetato α -terpenilo, α -terpineol, borneol, citral (neral, geranial o ambos), geraniol, timol y carvacrol. El timol y el terpenil-4-ol son los principales componentes del tomillo (Laeorance, 1979; Simon et al., 1984).

¹³ List, H.P.; L. Horhammer. 1969-1979. Hager's Handbuch der Pharmazentischen Praxis Vols. 2 to 6. Springer verlag, Berlin.

En el cuadro 3 se especifican los demás componentes presentes en la planta.

COMPONENTES	CANTIDAD
Calorías	276 calorías
Agua	7.8 g
Proteína	9.1 g
Grasa	7.4 g
Carbonatos totales	69.9 g
Fibra	18.6 g
Cenizas	11.7 g
Calcio	1890 mg
Fósforo	201 mg
Hierro	123.6 mg
Magnesio	220 mg
Sodio	55 mg
Potasio	814 mg
Zinc	6.2 mg
Vitamina A	3800 IU
Tiamina	0.51 mg
Rivoflavina	0.4 mg
Niacina	4.94 mg
Colesterol	0 mg
Fitosteroles	163 mg
Ácidos grasos saturados totales	2.73 g
Monosaturados	47 g
Poli-insaturados	1.19 g
Triptófano	186 mg
Treonina	252 mg
Isoleucina	468 mg
Leucina	430 mg
Lisina	207 mg
meticina y cistina	274 mg
Fenil-alanina y tirosina	482 mg
Valina	502 mg

Cuadro 3. Compuestos presentes en 100 g de tomillo triturado (Marsh, 1977).

Los cristales de timol tienen un punto de fusión 48 - 51.5 °C, punto de ebullición 233 °C, apreciablemente volátil a 100 °C en vapor de agua, 1 g se disuelve en 100 ml de agua, soluble en alcohol, varios disolventes orgánicos y ácido acético glacial; gravedad específica 0.972 - 0.979 a 25 °C, índice de refracción 1.520-1.525 a 20 °C (Anónimo C, 1983).

El carvacrol es isómero del timol, prácticamente insoluble en agua, soluble en alcohol o éter, se usa como desinfectante y en síntesis orgánica (Anónimo C, 1983). En conejos y gatos es usado oralmente como anti-infeccioso y anti-helmíntico contra nemátodos en dosis de 100 mg/kg (Kochmann, 1931).

Las semillas contienen el 37 % de aceite constituido principalmente de ácido linolénico, linoléico y oléico. En toda la planta se encuentran terpenos, flavonas, ácido ursólico (1.5 %), ácido caféico, taninos y resinas (List, 1969 - 1979).

El abuso en el consumo de la esencia suele ser seguido de efectos tóxicos, que se manifiestan por reacciones alérgicas (excema y abscesos), provoca algo de incoordinación motriz, usado como dentífrico por largo tiempo produce chelitis y glositis que raramente son causadas por la planta misma (San Martín, 1977).

En la literatura revisada no se encontraron estudios sobre el aceite esencial, extracto acuoso y etanólico de tomillo sobre Streptococcus pyogenes β - hemolítico del grupo A de Lancefield.

II MATERIAL Y MÉTODO.

2.1 DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DEL TOMILLO.

El Tomillo se compró en el mercado "Sonora" de la ciudad de México, 3 Kg de planta fresca, cultivada en Cholula, Puebla. La planta se secó a la sombra a temperatura ambiente.

El material seco se llevó al Herbario (FEZA) de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; para su determinación taxonómica.

2.2 PREPARACIÓN DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DE TOMILLO.

El extracto se obtuvo por destilación con arrastre de vapor de agua, extracción con agua hirviendo (infusión) y por maceración en alcohol.

2.2.1 DESTILACION.

Para la destilación se colocaron en un matraz balón de 1 l, 100 g de planta seca y se le adicionaron 300 ml de salmuera, (solución saturada de NaCl). Este matraz se adaptó a un refrigerante recto. Se destiló por arrastre con vapor de agua hasta obtener 1 l de mezcla, posteriormente en un embudo de separación se colocaron 400

ml del destilado con 100 ml de salmuera y 25 ml de cloroformo (CHCl_3), este último paso se repitió 5 veces.

Se agitó fuertemente la mezcla para separar el aceite de la parte acuosa. Se dejó reposar por 10 minutos y se separó la fase orgánica, que posteriormente se secó con CaCl_2 , (80 ml de la fase orgánica y 10 g de CaCl_2).

Se cubrió el vaso de precipitados con papel aluminio y se dejó reposar por 10 minutos, posteriormente se filtró en un recipiente enfriado con hielo. Finalmente, el exceso de disolvente se eliminó mediante una destilación simple y el producto restante, se almacenó en un recipiente de color ámbar para protegerlo de la luz y del oxígeno atmosférico y se mantuvo en refrigeración.

2.2.2 INFUSION.

La extracción por infusión se realizó hirviendo 100 ml de agua destilada durante 10 minutos. Posteriormente se retiró del fuego para agregar 10 g de tomillo seco, previamente lavado con agua destilada estéril. Se cubrió con papel aluminio y se dejó reposar por 10 minutos. Enseguida se filtró la infusión sobre papel filtro de poro grueso para separar los residuos de la planta, una segunda filtración se realizó en papel filtro Whatman # 42, por último como se observó crecimiento de hongos y bacterias al colocar esta infusión en la caja petri con gelosa - sangre se paso la solución en un filtro micropore con una membrana de 0.45 μm .

Se realizó una segunda infusión, en donde la planta fue previamente lavada con un desinfectante natural (Nutri Biotic distribuido por Bio / Chem Research, extraído de la semilla y el bagazo de la toronja) a razón de 3 gotas del desinfectante en 100 ml de agua antes de preparar la infusión y se siguieron los mismos pasos que en la primera infusión sin usar el filtro micropore.

El material y equipo en el que se realizó la infusión se esterilizó a 121 °C y una presión de 15 lb/plg², durante 15 minutos.

El producto obtenido se almacenó en un frasco color ámbar y se dejó en refrigeración.

2.2.3 MACERADO.

Para la maceración en alcohol se usaron 10 g de planta seca, lavada con agua destilada estéril y se colocaron en 100 ml de etanol al 50 % a temperatura ambiente por 10 días, protegiéndolo de la luz y agitándolo diariamente. El macerado se filtró con papel de poro grueso para separar los residuos de la planta, en papel filtro Whatman # 42 y por último, se paso la solución en un filtro micropore con una membrana de 0.45 µm. El producto obtenido se guardó en un frasco color ámbar y se mantuvo en refrigeración tal como lo recomienda Cáceres et al. (1987).

Además se usaron cristales de timol extraídos de Thymus capitatus L., aceite esencial comercial de Thymus vulgaris L. (Abastecedora Industrial) y unidisco de 10 U de penicilina G - sódica (Precision Scientific Sanofi Diagnostics Pasteur), en pruebas biológicas.

**DIAGRAMA PARA LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL POR
DESTILACIÓN CON ARRASTRE DE VAPOR DE AGUA.**

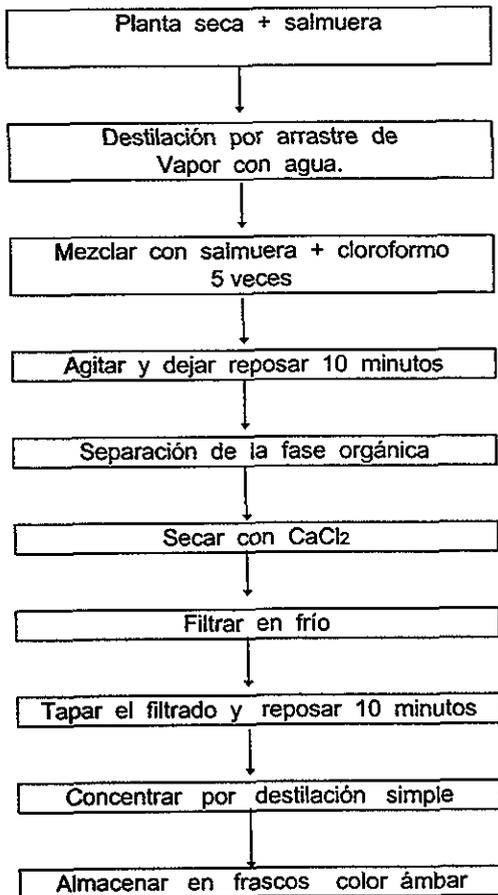


DIAGRAMA PARA LA PREPARACIÓN DE LA INFUSIÓN SIN DESINFESTANTE

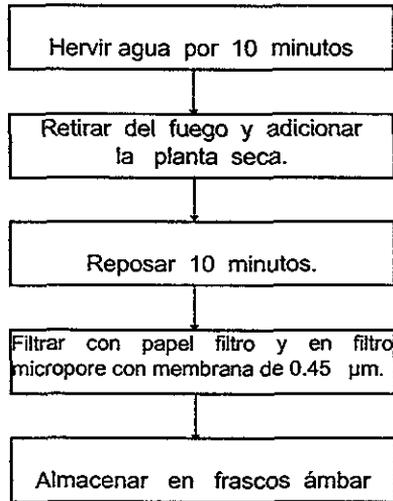


DIAGRAMA PARA LA PREPARACIÓN DE LA INFUSIÓN CON DESINFESTANTE

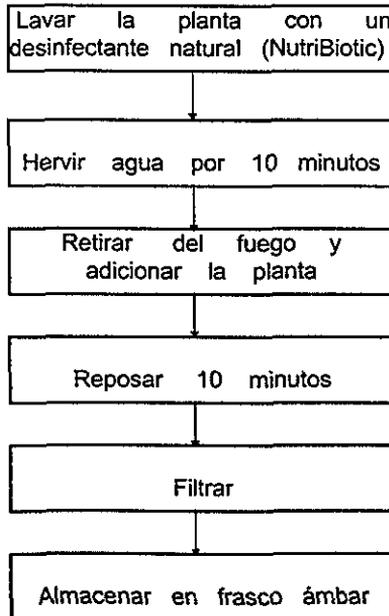
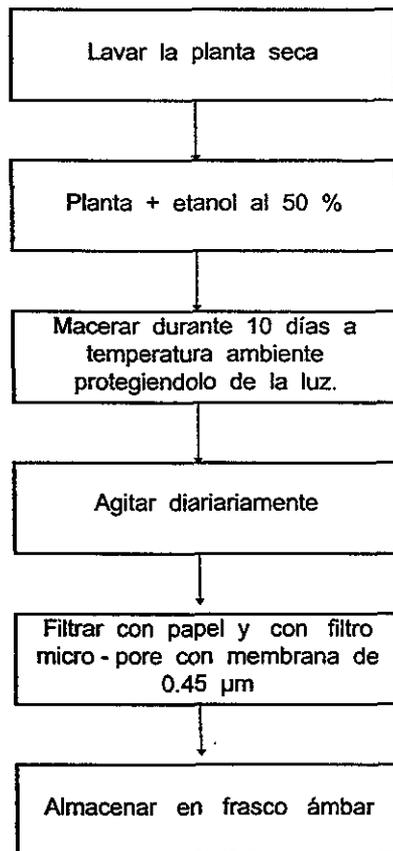


DIAGRAMA PARA LA PREPARACIÓN DEL MACERADO



2.3 SEPARACIÓN DE SUSTANCIAS DEL DESTILADO, MACERADO Y ACEITE ESENCIAL COMERCIAL.

2.3.1 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA PREPARATIVA.

Se realizó una cromatografía analítica en capa fina preparativa para separar las diferentes sustancias contenidas en el destilado, macerado, infusión y aceite esencial comercial (patrón). Se utilizó como fase estacionaria Silica Gel (GF 254) en un soporte de vidrio de 20 x 20 cm. Los constituyentes de cada uno de los extractos crudos se tomaron con una micropipeta y se colocaron sobre la placa, inmediatamente se introdujo en una cámara de elución cerrada durante 40 minutos que contenía como disolventes Cloroformo-Benceno (3:1). Finalmente se rasparon las diferentes manchas obtenidas por migración capilar y se almacenaron por separado. Esta cromatografía se repitió en varias ocasiones para obtener una muestra significativa de cada una de las diferentes manchas. Estas muestras se dividieron en 3 partes, una de ellas se utilizó para realizar una segunda cromatografía en capa fina con la que se determinaron los Rf de los componentes, además de una prueba química, con la otra una cromatografía de gases y la tercera fue usada en las pruebas de sensibilidad biológica.

2.3.1.1 Determinación de los Rf de los componentes obtenidos de la cromatografía en capa fina preparativa.

Con la finalidad de identificar los componentes de las muestras se realizó la segunda cromatografía analítica de la siguiente manera: se tomaron 0.1 g de las muestras cromatográficas obtenidas del macerado, destilado y patrón de Thymus y se realizó la extracción con 2 ml de diclorometano, agitando durante 15 minutos y filtrando la solución que posteriormente se evaporó en baño María. El residuo se recogió con 0.5 ml de Tolueno. Una muestra de 1 μ l de este residuo se aplicó a una placa de Sílica Gel y se colocó en una cámara saturada con benceno durante 40 minutos. El revelado de la placa cromatográfica se hizo con luz ultra violeta de onda corta (Stahl, 1973).

Las distancias obtenidas (Rf)¹⁴ fueron comparadas con los datos reportados por E. Stahl y H. Jork (1969) que se pueden ver en el Anexo.

2.3.1.2 Prueba Química para la identificación de los componentes del destilado, macerado y patrón.

Se realizó una reacción química específica para la identificación de fenoles e hidrogenilpropanos. El reactivo utilizado para la prueba química se preparó con 1 ml de H₂SO₄ concentrado y 0.5 ml de solución de anisaldehído en 50 ml de ácido acético.

Se tomaron 40 mg del aceite destilado, macerado y patrón obtenido de Thymus vulgaris, el cual se diluyó con 2 ml de diclorometano. El

¹⁴ Rf X 100 = hRf de Stahl y Jork (1969).

residuo se recogió con 0.5 ml de tolueno. Posteriormente se tomaron muestras de 12 μ l y se aplicaron en una placa de sílica gel colocándola inmediatamente en una cámara saturada con Cloroformo - Benceno (3:1) durante 40 minutos. El revelado se hizo con reactivo anisaldehído - H_2SO_4 concentrado y calentamiento posterior a una temperatura de 120 °C durante 10 minutos (Stahl y Jork, 1969).

2.3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES.

Con la misma finalidad (separar e identificar las sustancias químicas), se realizó una cromatografía de gases a los tres extractos crudos obtenidos de la destilación, macerado e infusión y a las extracciones obtenidas de la cromatografía de capa fina absorbidas en sílica gel. Se analizaron en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer modelo 1022.

Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

Temperatura del Horno 1.	80 °C.
Temperatura del Horno 2	180 °C.
Temperatura del Horno 3	200 °C.
Temperatura del Detector	200 °C.
Tiempo 1	0.5 min.
Tiempo 2	6.0 min.
Tiempo 3	4.0 min.
Tiempo total	22.5 min.
Rango	10 °C / min.
Gas de Arrastre	He
Disolvente	CS ₂

Columna Carbowax de (20 m, 0.53 mm D. I. y 0.80 u).

Detector de ionización con flama.

La preparación de las muestras se llevó a cabo de la siguiente manera: a cada una de ellas se le extrajo de la sílica gel con 1 ml de CS₂ y posteriormente se utilizó un volumen de inyección de 0.5 µl.

De las extractos crudos se peso 1 mg y se disolvió en 1 ml de CS₂.

2.4 PRUEBAS BIOLÓGICAS

2.4.1 RECOLECCIÓN, PREPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS DE CULTIVO FARÍNGEO.

La bacteria Streptococcus pyogenes se aisló y determinó en el laboratorio de análisis clínicos de la Unidad de Medicina Familiar No. 3 del IMSS, de pacientes que se presume tienen problemas de faringoamigdalitis estreptocócica, la clínica da servicio a los derechohabientes que habitan las colonias:

Zona 1 Emiliano Carranza, Janitzio y Morelos.

Zona 2 Michoacana, 20 de Noviembre y Ampliación 20 de Noviembre.

Zona 3 Simón Bolívar, Aquiles Serdán, Romero Rubio, Damián Carmona, Revolución, Progresista y 1º de Mayo.

Se utilizaron 2 medios de cultivo para el enriquecimiento y el aislamiento de la bacteria, los cuales se prepararon de la siguiente manera:

En el primero se disolvieron 3.7 g de caldo de infusión de cerebro y corazón de res en 100 ml de agua destilada. Posteriormente se colocaron 3 ml en tubos de ensaye y se esterizaron durante 15 minutos a 121 °C y 15 lb/plg² de presión.

En la preparación del segundo medio de cultivo, se disolvieron 40 g de medio base de agar - sangre en 1 l de agua destilada, esta mezcla se esterilizó y se dejó enfriar, se añadieron 25 ml de sangre de carnero desfibrinada estéril y posteriormente se homogeneizó, enseguida se colocaron en cajas Petri estériles 10 ml de este medio. Se dejaron solidificar las placas a temperatura ambiente.

Las muestras de garganta de cada uno de los pacientes se obtuvieron con la cavidad oral abierta para guiar el hisopo estéril hacia la parte posterior de la faringe entre los pilares amigdalinos detrás de la úvula, se movió el hisopo hacia atrás y hacia adelante oprimiendo con suavidad la lengua para obtener una muestra adecuada.

La muestra bacteriana se colocó en tubos de ensaye que contenían el primer medio de cultivo (caldo infusión de cerebro y corazón), estos tubos se incubaron durante 2 horas a 35 °C.

El hisopo con el que se tomó la muestra, se exprimió en el caldo y se extendió hacia un costado de la caja Petri que contenía el segundo medio de cultivo (gelosa-sangre), con un asa de platino se realizó la siembra en forma de estrías en el agar, finalizando con dos o tres picaduras en el mismo.

Inmediatamente se incubaron las placas a 35 °C durante 24 horas en una estufa Gravity Convection Incubator Economy (Modelo 4 EG).

Después de la incubación se observó la presencia de colonias β hemolíticas, que se distinguen por presentar una zona de aclaramiento total de sangre alrededor de ellas, debido a lisis de los eritrocitos. Las que fueron seleccionadas, se pasaron a una segunda caja Petri con

agar - sangre y se les colocó un disco de 0.04 mg de bacitracina, en el área sembrada, para la identificación presuntiva de S. pyogenes, posteriormente se incubaron las placas a 35 °C durante 18 a 24 horas.

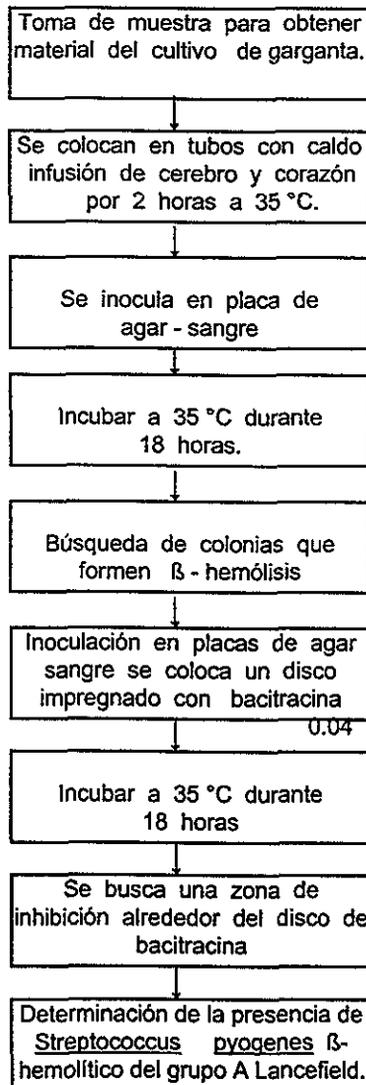
Después de este tiempo se observó la placa para detectar la presencia de una zona de inhibición alrededor del disco de bacitracina (ausencia de hemólisis), lo que permitió la identificación preliminar de Streptococcus β -hemolítico del grupo A de Lancefield.

Las características que definen el grupo bacteriano por tipos de colonias (Streptococcus pyogenes) se muestra en el cuadro 4.

Grupo Bacteriano	Características de la colonia	Prueba presuntiva
<u>Streptococcus pyogenes</u> β -hemolítico de grupo A de Lancefield.	Convexa o pulvinada, translúcida, puntiforme, como manteca, ancha zona de β -hemólisis	Disco A (Bacitracina)

Cuadro 4. Identificación morfológica y preliminar de la colonia de Streptococcus pyogenes β -hemolítico del grupo A de Lancefield.

Diagrama para la identificación de Streptococcus pyogenes β -hemolítico del grupo A de Lancefield.



2.4.2 PRUEBAS DE SENSIBILIDAD CON EXTRACTOS CRUDOS.

Con la finalidad de encontrar el volumen óptimo que inhibiera el crecimiento de la cepa bacteriana en estudio, se realizaron pruebas de sensibilidad con disco a diferentes volúmenes del destilado, macerado (extracto etanólico) e infusión (extracto acuoso) de Thymus vulgaris, mediante el uso de la técnica de Bauer-Kirby (1966).

La preparación del medio de cultivo para la siembra, el inóculo de las bacterias y el estándar de sulfato de bario para las pruebas de sensibilidad se realizaron de la forma siguiente:

El medio de cultivo utilizado fue base de agar - sangre deshidratado, se tomaron 40 g de este medio y se disolvieron en 1 l de agua destilada. La mezcla se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C y 15 lb/plg² de presión. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura de 45 a 40 °C y se añadieron 25 ml de sangre de carnero desfibrinada estéril. Se homogeneizó la mezcla y antes de que solidificara se distribuyó a razón de 10 ml de medio de cultivo en cajas Petri previamente esterilizadas, y se dejaron solidificar a temperatura ambiente.

Para el crecimiento del Streptococcus se disolvieron 2.55 g de medio caldo de tripticaseína y fosfato de soya deshidratado en 100 ml de agua destilada. Enseguida se distribuyeron volúmenes de 4 ml de caldo en tubos de ensaye. Finalmente se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 lb/plg² de presión, durante 15 minutos.

La preparación del estándar de sulfato de bario para ajustar la densidad de la población bacteriana a 10⁸ unidades formadoras de

colonias (UFC)/ml, se preparó de la siguiente manera: a 99,5 ml de H₂SO₄ (0.36 N) se le añadieron 0.5 ml de solución de cloruro de bario al 1 %, esta mezcla se distribuyó a razón de 4 a 6 ml en tubos de ensaye que se cerraron y almacenaron en la oscuridad a temperatura ambiente.

2.4.2.1 PREPARACIÓN DEL INÓCULO DE BACTERIAS PARA PRUEBAS DE SENSIBILIDAD CON EXTRACTOS CRUDOS.

Del cultivo bacteriano de Streptococcus pyogenes, se tomaron con la ayuda de un asa de platino, 10 colonias de microorganismo y se suspendieron en el caldo de tripticaseína previamente colocados en tubos de ensaye para aumentar el crecimiento bacteriano.

Estos tubos se incubaron de 2 a 5 horas, hasta que la turbidez se igualó a la del estándar de sulfato de bario que corresponde a la mitad del tubo patrón del Nefelómetro de Mac Farland; cuando fue necesario ajustar el inóculo se diluyó con caldo de tripticaseína o se prolongó el tiempo de incubación, así se logró el equivalente de aproximadamente 10⁸ microorganismos por ml.

2.4.2.2 INOCULACIÓN DE LAS PLACAS.

Por medio de un hisopo de algodón estéril, que se sumergió y se exprimió en el cultivo del inóculo a prueba preparado, se extendió la muestra en forma uniforme sobre toda la superficie de las placas de gelosa - sangre.

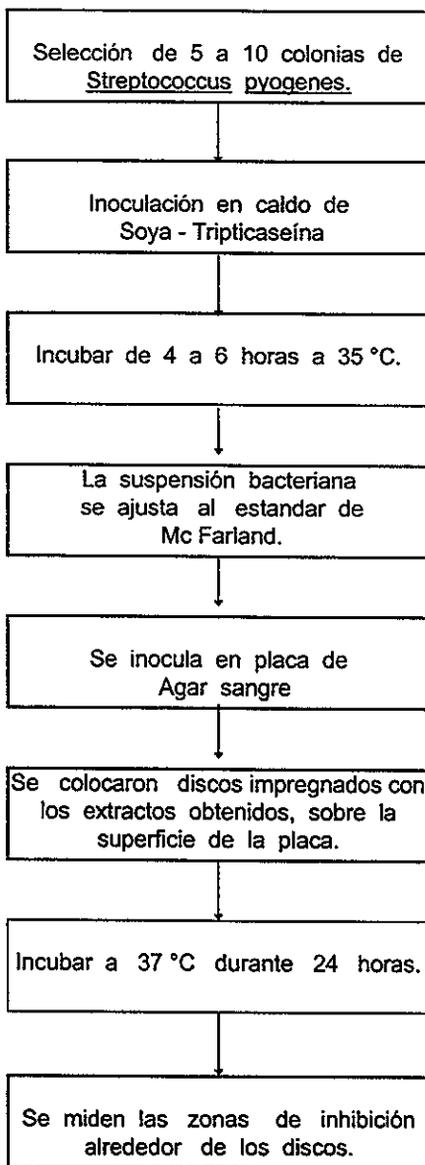
Se dejaron las placas durante 2 a 5 minutos a temperatura ambiente y con unas pinzas de disección, se distribuyeron discos de papel filtro de 7 mm de diámetro, los cuales fueron previamente impregnados con volúmenes de 5, 10, 20 y 30 μ l del destilado, macerado e infusión de Thymus vulgaris, al mismo tiempo se preparó un testigo positivo con medio agar-sangre más inóculo y uno negativo que estuvo constituido por agar-sangre únicamente.

Para la solución patrón (aceite esencial comercial) se utilizaron discos impregnados con 20 μ l debido a que se observó en pruebas anteriores que este era el volumen óptimo para inhibir el crecimiento bacteriano.

Al mismo tiempo se colocaron sobre el medio de cultivo sensidiscos de penicilina de 10 unidades. Los ensayos se repitieron 5 veces.

Inmediatamente se incubaron las placas así tratadas a 37 °C durante 24 horas. Finalmente se midieron las zonas de inhibición.

DIAGRAMA PARA REALIZAR LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD.



2.4.3 PUEBAS DE SENSIBILIDAD CON EXTRACTOS OBTENIDOS DE LA PRIMERA CROMATOGRAFÍA.

La preparación del medio de cultivo, el inóculo de las bacterias y el estándar de sulfato de bario para las pruebas de sensibilidad de los extractos, se realizaron de la misma forma que se hizo en las pruebas de sensibilidad con extractos crudos y con la técnica de Bauer - Kirby (1966).

Para la inoculación de las placas se realizó el siguiente procedimiento: a cada una de las muestras contenidas en la sílica gel se le adicionó 1 ml de cloroformo, posteriormente se filtró en papel Whatman # 42 y se impregnaron los discos con los extractos así obtenidos. Se utilizaron volúmenes de 20 μ l para cada una de las pruebas (macerado, destilado y patrón), ya que ensayos anteriores mostraron que este era el volumen que mejor inhibía el crecimiento bacteriano. Los cristales de timol (extraídos de Thymus capitatus L). se disolvieron en cloroformo a razón de 1 mg por 10 ml, además también se impregnaron discos con 20 μ l de cloroformo. Los ensayos se repitieron dos veces cada uno de ellos.

Inmediatamente se incubaron las placas a 37 °C durante 24 horas y finalmente se midieron los halos de inhibición.

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

PREPARACIÓN DE LOS DIFERENTES EXTRACTOS DEL TOMILLO.

En el cuadro 5 se presentan los resultados obtenidos al hacer la extracción de los diferentes extractos.

Proceso	Muestra de Tomillo hojas y tallo (g)	Agente de extracción	Cantidad de extracto (ml)
Destilación	500	Vapor de agua y posteriormente cloroformo	13
Macerado	10	Alcohol etílico	90
Infusión	10	Agua caliente	90

Cuadro 5. Cantidades de muestra cruda obtenidas mediante 3 técnicas de extracción.

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

De la cromatografía en capa fina realizada a la muestra patrón, macerado y aceite esencial de tomillo se separaron las siguientes fracciones que se observan en el cuadro 6.

ACEITE ESENCIAL COMERCIAL (patrón)	MACERADO	ACEITE ESENCIAL (destilado)
Compuesto patrón 1	Compuesto macerado	Compuesto destilado 1
Compuesto patrón 2		Compuesto destilado 2
Compuesto patrón 3		Compuesto destilado 3

Cuadro 6. Se muestra el número de fracciones que se separaron de la cromatografía en capa fina.

OBTENCIÓN DE LOS R_f EN LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

En la siguiente pagina se puede observar la figura 7, que presenta en forma esquemática los resultados de la medición del R_f para macerado, destilado y patrón de aceite esencial de tomillo Thymus vulgaris L.

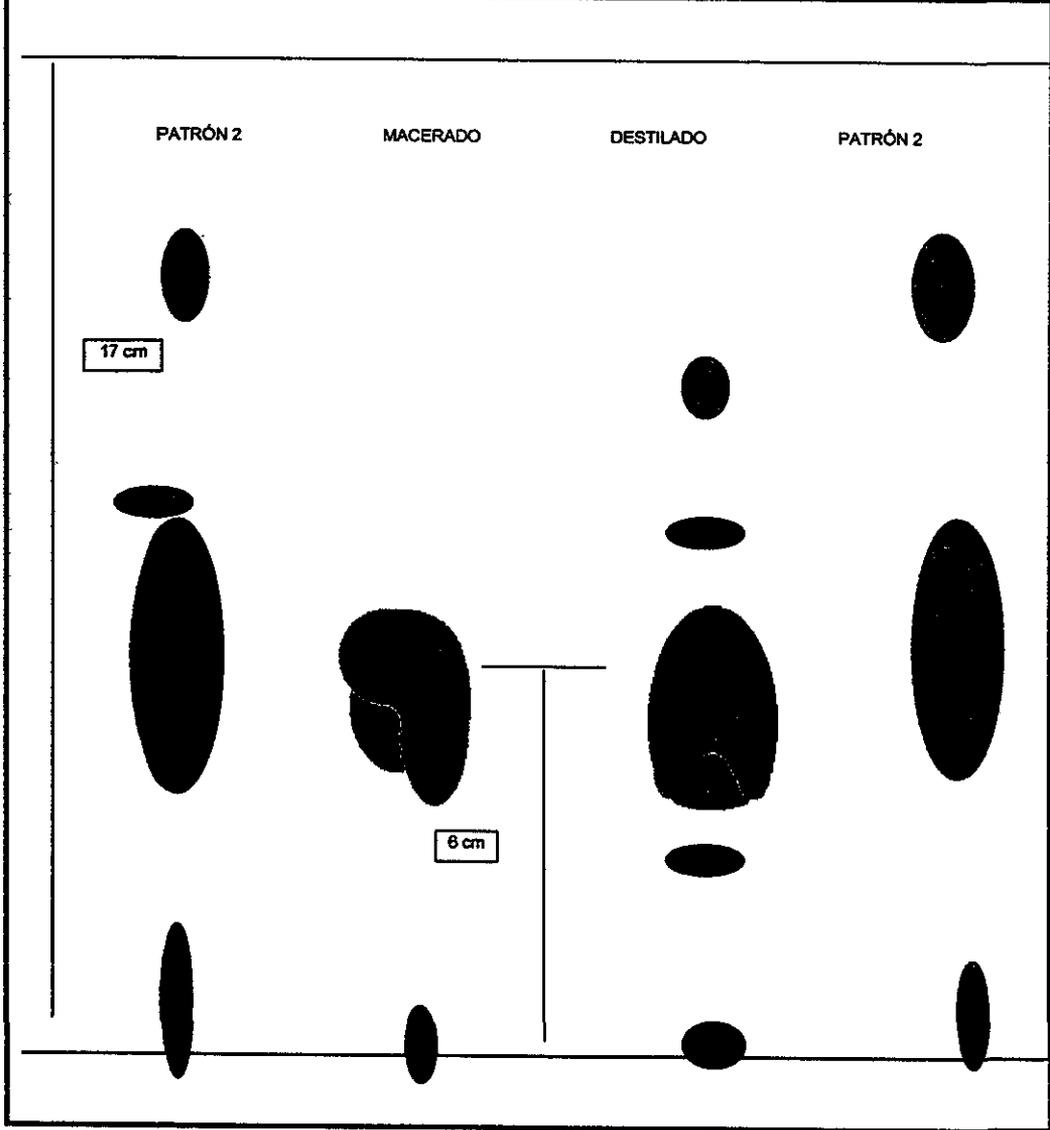


Figura 7. Cromatografía en capa fina preparativa de muestras extraídas (destilado y macerado) de Thymus vulgaris L. Comparados con un patrón (aceite comercial). Se presentan los datos de Rf y se comparan con los reportados por E. Stahl y H. Jork (1962).

Los resultados de las distancias recorridas en la cromatografía en capa fina de cada sustancia se resumen en el cuadro 7.

Muestra	Distancia recorrida al centro de la mancha (cm)	Distancia recorrida por el frente del eluyente (cm)
Macerado	6.1	17.2
Destilado	6.1	17.2
Patrón	6.1	17.2

Cuadro 7. Distancias recorridas en la placa cromatográfica.

Para el caso de la infusión no se calculo el Rf debido a que la cantidad de los compuestos es muy pequeña y en la cromatografía de capa fina, no se detectó.

En el cuadro 8, se compararon los resultados obtenidos de los Rf de cada muestra utilizada en el experimento con los datos de E. Stahl y H. Jork (1969) para compuestos fenólicos y derivados de hidrofenilpropanos.

Muestra	Rf experimental	Rf de Stahl y Jork	Tipo de Sustancia
Macerado	35.4	33	Timol / Carvacrol
Destilado	35.4	33	Timol / Carvacrol
Patrón	35.4	33	Timol / Carvacrol

Cuadro 8. Rf teórico establecido por Stahl y Jork (1969) y Rf obtenido del destilado, macerado y patrón de Thymus vulgaris L.

Al comparar los datos obtenido con los reportados por Stahl y Jork (1969) se observan valores de Rf muy parecidos, por lo que se puede

especular que las sustancias detectadas son timol y carvacrol. Cabe destacar que las condiciones bajo las cuales se realizó este experimento se ajustaron a las trabajados por los autores antes mencionados.

P R U E B A Q U Í M I C A .

El cuadro 9 muestra los resultados obtenidos de la prueba química realizada y se compara con los resultados obtenidos por Stahl y Jork (1969).

Muestra	Color experimental	Color reportado por Stahl y Jork (1969).	Tipo de Sustancia
Macerado	rojo	Rojo	Timol
Destilado	Rojo - rojo pálido	rojo pálido - rojo - café	Timol - carvacrol
Patrón	Rojo - rojo pálido	rojo pálido - rojo - café	Timol - carvacrol

Cuadro 9. Comparación de los colores obtenidos experimentalmente con los reportados por Stahl y Jork (1969).

En la siguiente pagina se muestra la figura 8 donde se presentan en forma esquemática, los resultados obtenidos de la reacción química efectuada sobre las muestras extraídas por maceración, destilación y el aceite comercial (patrón).

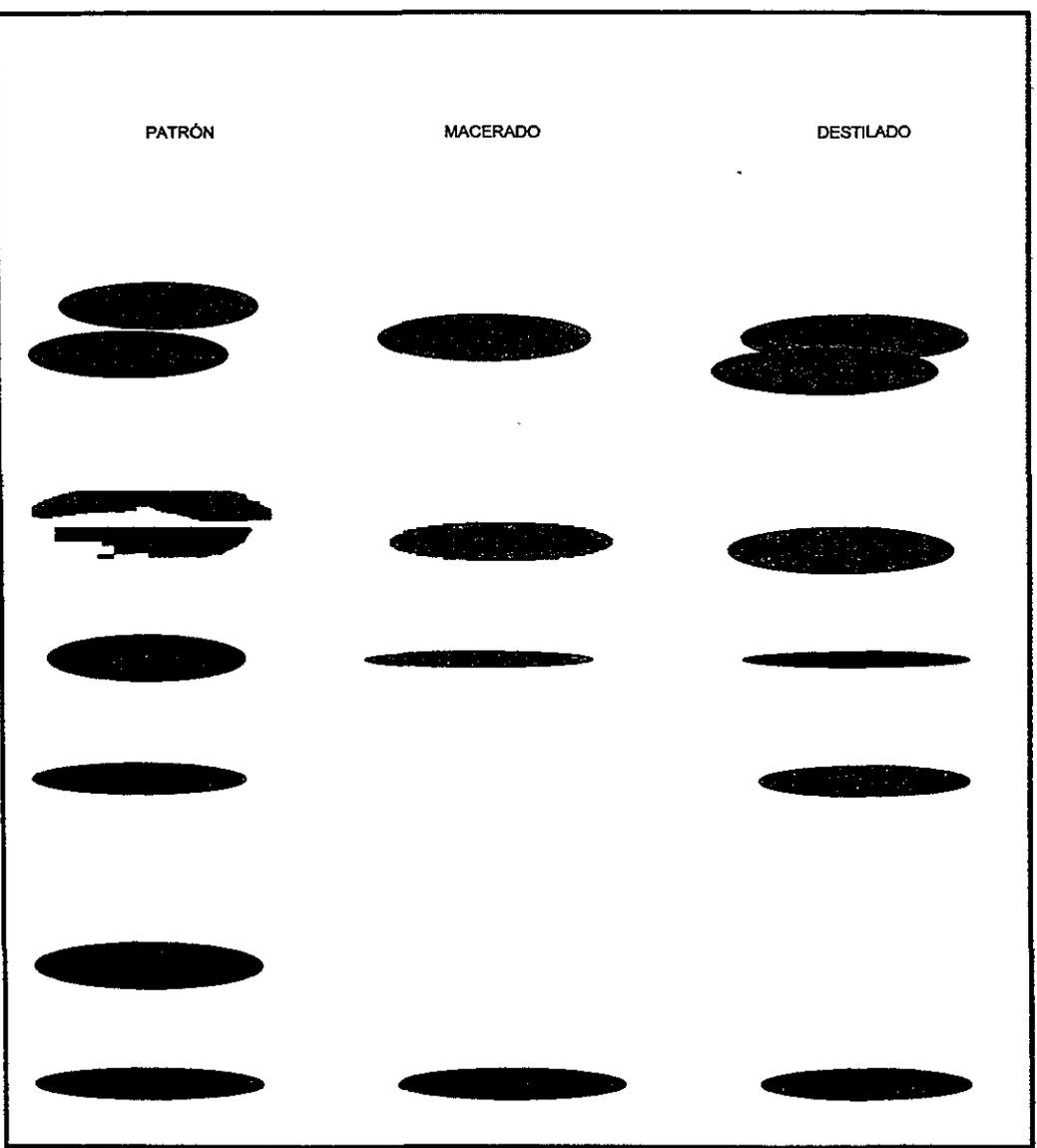


Figura 8. Cromatografía en capa fina preparativa de muestras extraídas (destilado y macerado) de Thymus vulgaris L. Comparados con un patrón (aceite comercial).

Se observa un color rojo presente en las tres muestras. Esta mancha roja de acuerdo con Stahl y Jork (1969), sugiere la presencia de timol. De igual manera, se observan dos manchas de color rojo pálido, una mancha en el destilado y la otra en el patrón, las que de acuerdo con el mismo autor podrían corresponder a carvacrol.

Con las pruebas realizadas no se logró identificar una de las manchas del destilado debido a que sale del rango del Rf y el color no concuerda con lo reportado por Stahl y Jork (1969). Ver anexo.

Para el caso de la infusión, se piensa que la escasa concentración de los compuestos presentes no permitió que la reacción de la prueba química se realizara.

Es importante señalar que los datos de Rf y prueba química no son totalmente reproducibles, ni definitivos en la identificación de los compuestos del aceite, por esta razón se utilizó la cromatografía de gases.

C R O M A T O G R A F Í A D E G A S E S .

Para que se tuviera seguridad de la identidad de las sustancias se hizo una cromatografía de gases. A continuación se presentan en secuencia los cromatogramas obtenidos en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo Tecnológico de la FES Zaragoza UNAM.

File : TOMILL20.D01
Run : 01

DESTILADO

TOMILLO
Type : Sample

Report : 13:34:15 Jan 23 1998 Method : TOMILLO [12:47:42 Jan 23 1998]

Sample Mat : 2.20000e+0 Dilution: 6.50000e+0

EXTERNAL STANDARD (AREA)

RT	Area	BC	Concn
12.330	3481040	T	0.0159
12.570	4733128	T	0.0229

File : TOMILL20.D01 DESTILADO TOMILLO
Run : 01 Type : Sample
Collection : 13:17:43 Jan 23 1998 Method : TOMILLO [12:47:42 Jan 23 1998]

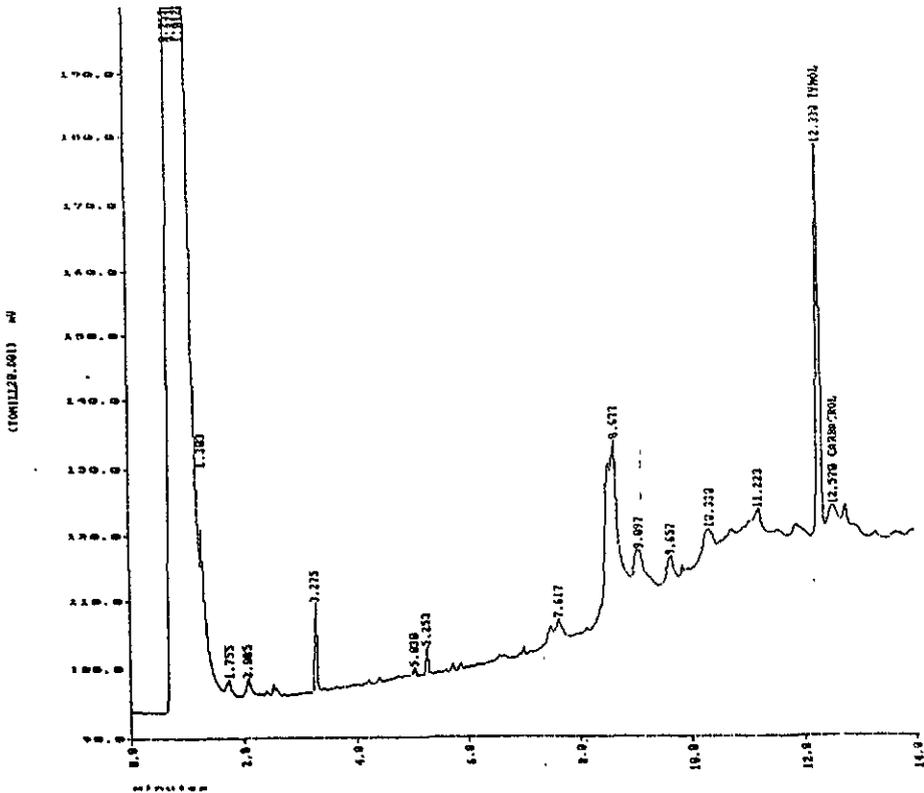


Figura 9. Cromatograma del destilado.

File : TOMILL19.D01
Run : 01

INFUSION

TOMILLO
Type : Sample

Report : 13:11:10 Jan 23 1998 Method : TOMILLO [12:47:42 Jan 23 1998]

Sample Amt : 2.20000e+0 Dilution: 6.50000e+0

EXTERNAL STANDARD (AREA)

RT	Area	BC	Concn
12.300	5046312	T	0.0230

File : TOMILL19.D01 INFUSION TOMILLO
Run : 01 Type : Sample
Collection : 12:54:30 Jan 23 1998 Method : TOMILLO [12:47:42 Jan 23 1998]

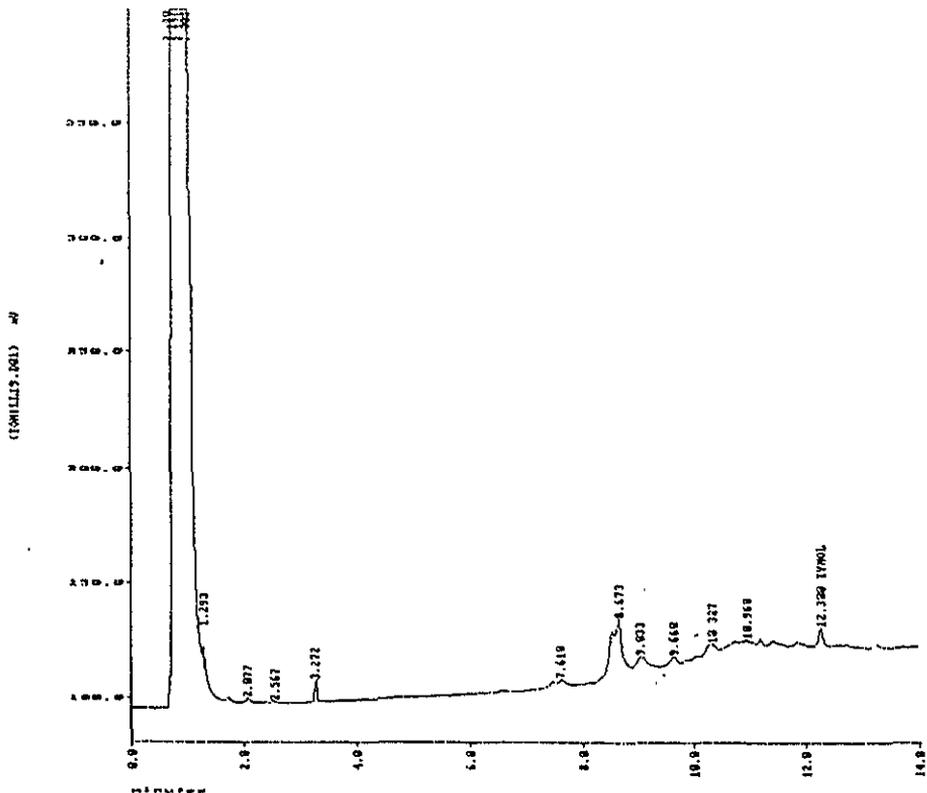


figura 10. cromatograma de la infusion

Report : 12:47:58 Jan 23 1998 Method : TOMILLO [12:47:42 Jan 23 1998]

Sample Amt : 2.20000e+0 Dilution: 6.50000e+0

EXTERNAL STANDARD (AREA)

RT	Area	BC	Concn
12.364	3137456		0.0143

File : TOMILL18.D01

MACERADO

TOMILLO

Run : 01

Type : Sample

Collection : 12:31:24 Jan 23 1998 Method : TOMILLO [12:17:27 Jan 23 1998]

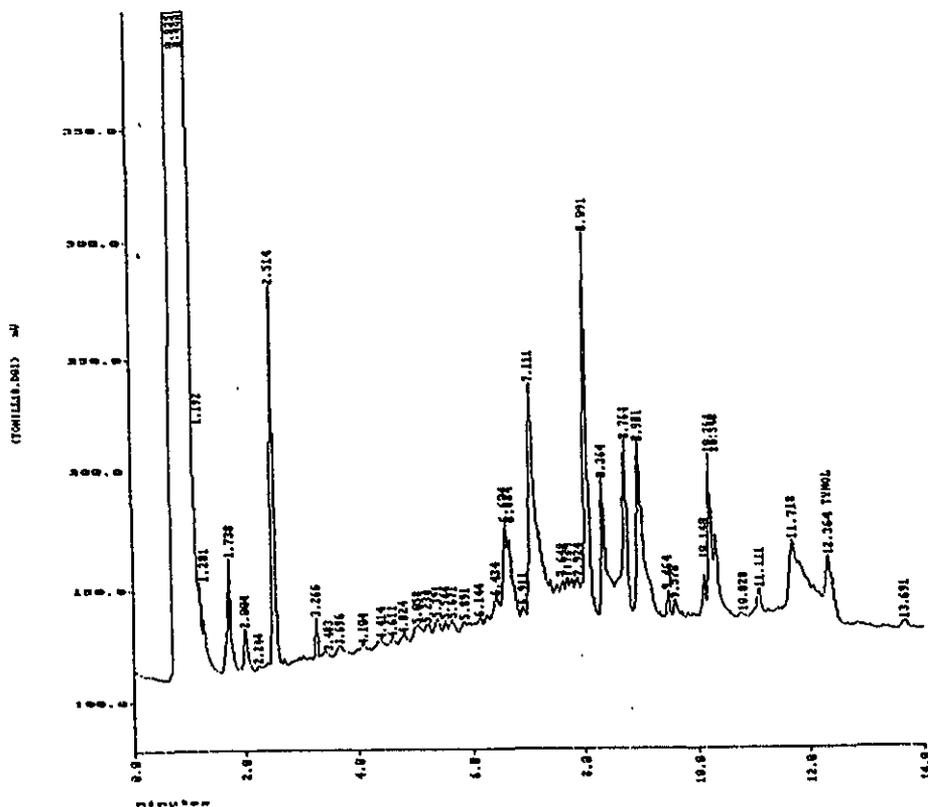


Figura 11 Cromatograma del macerado.

Report : 16:25:04 Jan 22 1998 Method : TOMILLO [15:59:38 Jan 22 1998]

Sample Amt : 2.20000e+0 Dilution: 6.50000e+0

EXTERNAL STANDARD (AREA)

RT	Area	BC	Concn
12.404	14480676	T	0.0660
12.864	1280214	T	0.0062

File : TOMILL15.D01

TYMOL DEST

TOMILLO

Run : 01

Type : Sample

Collection : 16:06:32 Jan 22 1998 Method : TOMILLO [15:59:38 Jan 22 1998]

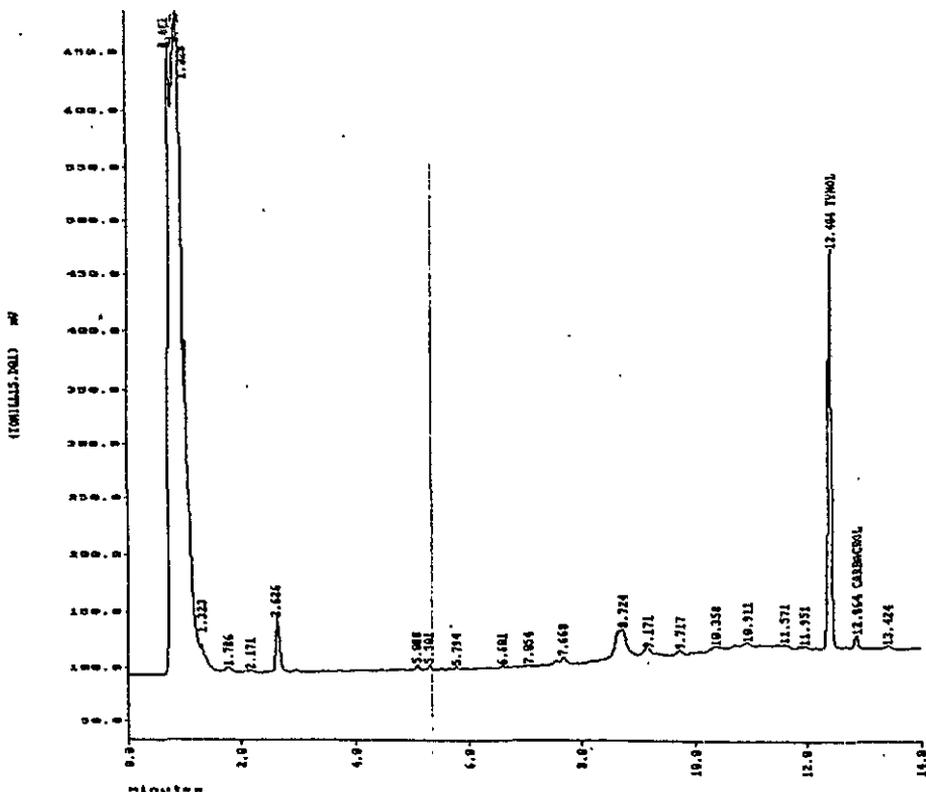


figura 12. cromatograma del destilado obtenido de la cromatografía en capa fina.

File : TOMILL16.D01
Run : 01

TYMOL MACERADO

TOMILLO
Type : Sample

Report : 16:48:55 Jan 22 1998 Method : TOMILLO [15:59:38 Jan 22 1998]

Sample Amt : 2.20000e+0 Dilution: 6.50000e+0

EXTERNAL STANDARD (AREA)

RT	Area	BC	Concn
12.402	18266364	T	0.0832
12.862	556984		0.0027

File : TOMILL16.D01

TYMOL MACERADO

TOMILLO

Run : 01

Type : Sample

Collection : 16:30:23 Jan 22 1998 Method : TOMILLO [15:59:38 Jan 22 1998]

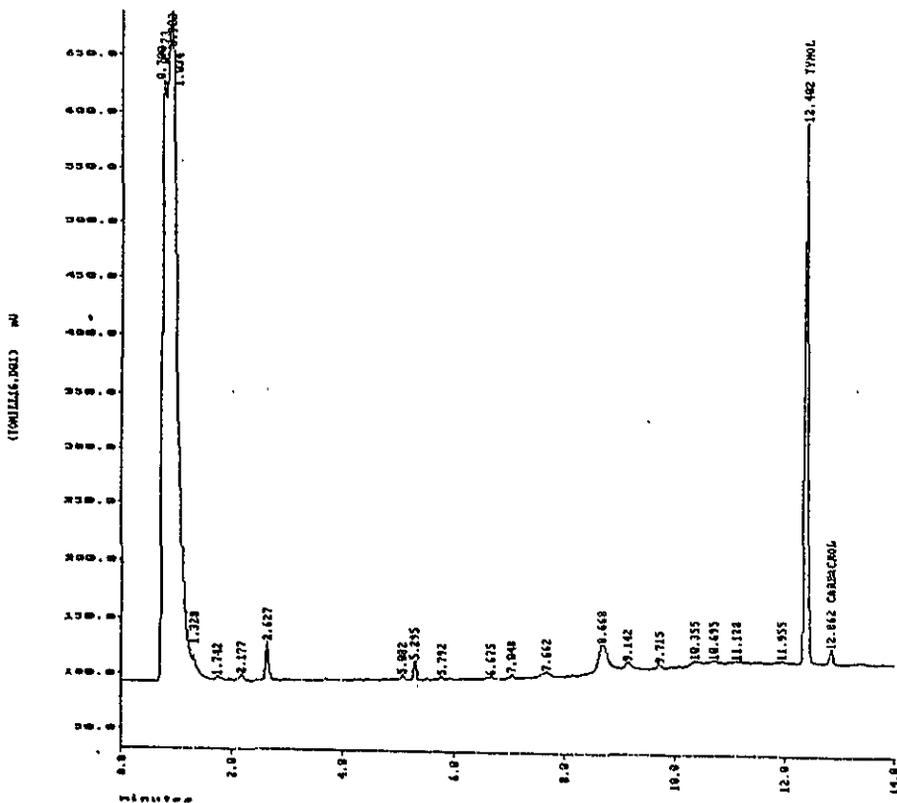


figura 13. cromatograma del macerado obtenido de la cromatografía en capa fina.

PATRON

Report : 17:12:23 Jan 22 1998 Method : TOMILLO [15:59:38 Jan 22 1998]

Sample Amt : 2.20000e+0 Dilution: 6.50000e+0

EXTERNAL STANDARD (AREA)

RT	Area	BC	Concn
12.434	59777352	T	0.2723
12.858	4753640	T	0.0230

File : TOMILL17.D01

TYMOL

TOMILLO

Run : 02

Type : Sample

Collection : 16:53:49 Jan 22 1998 Method : TOMILLO I 15:59:38 Jan 22 1998 I

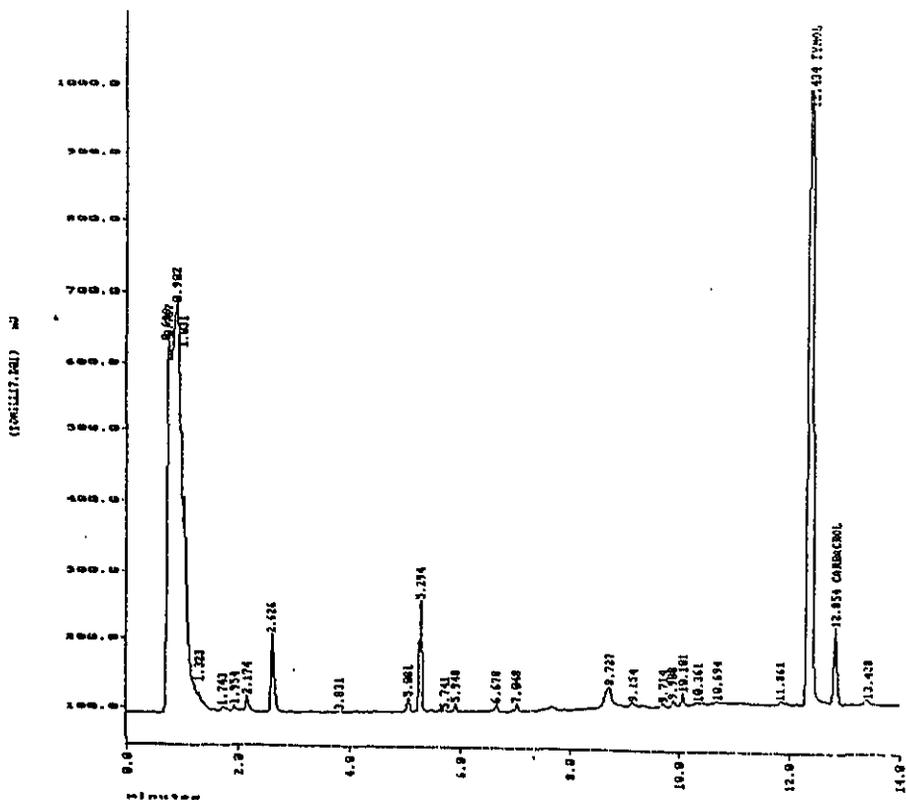


figura 14. cromatograma del patrón

Una vez identificadas las sustancias, se procedió a determinar por cromatografía de gases la concentración de timol y carvacrol para cada una de las muestras trabajadas (infusión, macerado, destilado y patrón). Los resultados se presentan en el cuadro 10.

MUESTRA	TIMOL (mg/ml)	CARVACROL (mg/ml)
PATRÓN	0.2723	0.0230
MACERADO * ¹⁵	0.832	0.0027
DESTILADO *	0.660	0.0062
MACERADO ** ¹⁶	0.0143	N.D. ** ¹⁷
INFUSIÓN **	0.0230	N.D. ***
DESTILADO **	0.0159	0.0229

Cuadro 10. Concentraciones de las sustancias identificadas.

La cromatografía de gases reveló que los métodos de extracción (destilación, infusión y maceración) son útiles para separar timol y carvacrol de su materia prima y que el método con mayor efectividad es el de la destilación ya que podemos observar que se logró obtener timol y carvacrol de la planta seca. A pesar de los resultados obtenidos no hay que descartar al macerado el cuál, es la opción más práctica para los consumidores

¹⁵ * Muestras obtenidas de la cromatografía en capa fina.

¹⁶ ** Extractos crudos.

¹⁷ ***No desarrollo.

PRUEBAS BIOLÓGICAS.

El cuadro 11 muestra el halo de inhibición del crecimiento bacteriano, al realizar las pruebas de los extractos crudos, patrón (aceite comercial) y penicilina, se realizaron 5 repeticiones.

Volúmen (µl)	Aceite Esencial Obtenido por destilación Halo de inhibición (cm)	Macerado. Halo de inhibición (cm)	Infusión Con y sin desinfestante Halo de inhibición (cm)	Concentración Penicilina G Sódica (6 µg). Halo de inhibición (cm)	Patrón Halo de inhibición (cm)
5	1.1	0.7	0.7	2.5	
	1.2	0.7	0.7	2.4	
	1.1	0.7	0.7	2.5	
	1.1	0.7	0.7	2.5	
	1.1	0.7	0.7	2.4	
10	2.6	0.7	0.7		
	2.7	0.7	0.7		
	2.3	0.7	0.7		
	2.5	0.7	0.7		
	2.2	0.7	0.7		
20	3.0	0.75	0.7		3.3
	3.1	0.75	0.7		3.3
	3.5	0.8	0.7		3.6
	3.2	0.7	0.7		3.4
	3.3	0.75	0.7		3.5
30	2.8	0.75	0.7		
	2.8	0.75	0.7		
	2.7	0.75	0.7		
	2.7	0.7	0.7		
	2.8	0.75	0.7		

Cuadro 11. Halos de Inhibición del crecimiento bacteriano obtenidos al aplicar extractos crudos, patrón y penicilina.

Los 6 μg de penicilina utilizados durante el experimento equivalen a 10 U, que es la concentración estandarizada por el National Committee for Clinical Laboratory Standard y la Organización Mundial de la Salud.

Como puede observarse en el cuadro 11 el aceite esencial inhibió el crecimiento del Streptococcus pyogenes β -hemolítico de grupo A de Lancefield en todos los volúmenes que se manejaron durante el experimento.

Se registró un halo máximo de inhibición con el volumen de 20 μl .

Se observó una disminución en el halo de inhibición cuando se administró un volumen de 30 μl , este problema fue descrito por Eagle en 1948 y se le conoce como fenómeno "paradójico" o de "Eagle" en el cual, la concentración creciente de antibiótico produce una menor destrucción de bacterias, en lugar del incremento esperado sobre la actividad bacteriana, se piensa que es el resultado de una interferencia con la síntesis proteica por las mayores concentraciones de β -lactamasa. No se conocen implicaciones terapéuticas de este fenómeno (Schoenknecht, 1987).

Al comparar el halo de inhibición entre la penicilina y el aceite esencial obtenido por destilación, se pudo observar una área de inhibición mayor en el aceite esencial con volúmenes de 10, 20 y 30 μl .

Por lo que se refiere al macerado (extracto etanólico), se obtuvo que el volumen mínimo para inhibir el crecimiento bacteriano se inicia al manejar un volumen de 20 μ l y se mantiene hasta 30 μ l.

Probablemente, al aumentar los gramos de planta que se utilizaron para realizar el macerado se obtengan mejores resultados.

Al comparar el halo de inhibición entre el macerado y la penicilina se observa que esta última supera al mismo.

Con el extracto acuoso no se logró obtener ningún halo de inhibición.

En la infusión en donde la planta no se trató con algún desinfectante se observó que al aplicar la infusión al medio de cultivo (testigo negativo) se desarrollaban hongos y otro tipo de bacterias por lo que se realizó una filtración más a través de la membrana micropore y al no registrar halo de inhibición, se pensó que los compuestos que inhiben el crecimiento bacteriano se volatilizaron.

No se obtuvo inhibición del crecimiento de Streptococcus pyogenes, con la infusión preparada de la planta lavada con el desinfectante natural, ni se observó crecimiento de flora contaminante en la placa de cultivo. Esto logró comprobar que la planta ya venía contaminada y que no se debió a un mal manejo de la técnica realizada durante el experimento.

Una cuestión importante que no se debe olvidar, es que se trabajó con un aceite esencial, que es poco soluble en agua y muy volátil. Estas características y el volumen (20 μ l) con el que se trabajó debieron influir

en la ausencia de halos de inhibición. El volumen de la infusión recomendado en Medicina Tradicional para el tratamiento de enfermedades respiratorias, es de 3 a 4 tazas de té al día, que significan \pm 800 ml, mientras que durante el desarrollo del experimento el volumen máximo utilizado fue de 30 μ l, lo que nos permite sugerir que, pese a los resultados obtenidos con la infusión, ésta no debe descartarse en el tratamiento de la faringoamigdalitis.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la extracción por destilación es el método con el que se obtiene el aceite esencial de mayor calidad en relación con la inhibición del crecimiento.

Se puede observar que el halo de inhibición del aceite esencial obtenido por destilación y el aceite esencial comercial (patrón) son muy semejantes, se encuentran en un rango de 3.0-3.6 cm.

El cuadro 12 muestra el halo de inhibición del crecimiento bacteriano, con un volumen de 20 μ l y extractos obtenidos de la cromatografía en capa fina.

EXTRACTOS DE LA CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (20 μ l)	HALO DE INHIBICION (cm)	
	Macerado	0.7
Patrón 1	0.75	0.75
Patrón 2	1.6	1.5
Patrón 3	1.0	sin muestra
Destilado 1	0.7	0.7
Destilado 2	0.75	0.75
Destilado 3	0.8	0.8

Cuadro 12. Halo de inhibición obtenidos con extractos de la cromatografía en capa fina.

Se observa que para el macerado no existió inhibición, lo cual no implica la falta de actividad, más bien, este resultado puede estar determinado por la cantidad de componentes presentes en el extracto.

La variación en el halo de inhibición entre los resultados de extractos crudos y extractos puros puede deberse a la poca cantidad de muestra obtenida de la cromatografía, además de la filtración que se hizo para separar la sílica gel.

En el cuadro 13 se muestra como los cristales puros de timol inhibieron el crecimiento bacteriano, se utilizó como medio de cultivo gelosa - sangre.

VOLUMEN (μ l)	HALO DE INHIBICION (cm)
10	1.2
	1.1
20	1.3
	1.3
30	1.4
	1.4
40	1.7
	1.6
50	1.5
	1.5

Cuadro 13. Halos de inhibición provocados por cristales de timol extraídos de Thymus capitatus L.

Se evaluaron diferentes volúmenes encontrando que el volumen con el máximo halo de inhibición del crecimiento bacteriano es de 40 μ l.

Con esta prueba se logró comprobar que el Timol tiene acción bactericida. Sin embargo, su halo máximo de inhibición (1.6 - 1.7 cm) fue menor que el hallado en el aceite esencial obtenido por destilación y el comercial (patrón), en el cual se obtuvo que con un volumen de 20 μ l, se encontró un halo máximo de 3.0 a 3.5 cm.

Por lo que podemos sugerir que tal vez exista una reacción sinérgica entre algunos de los compuestos existentes en la mezcla.

IV C O N C L U S I O N E S .

El extracto de Thymus vulgaris L. obtenido por destilación inhibió el crecimiento de Streptococcus pyogenes β -hemolítico del grupo A, con esto se demostró la acción bactericida de los componentes de éste aceite esencial.

No se registró halo de inhibición con la infusión debido probablemente a que el aceite no es soluble en agua y durante el proceso de filtración quedó retenido junto con las impurezas del mismo en el papel filtro y la membrana del micropore.

El macerado es un método adecuado y sencillo para extraer los compuestos del tomillo, no obstante haber encontrado mejores resultados en la inhibición del crecimiento de la bacteria con el destilado, se sugiere no descartarlo e incrementar la cantidad de la planta en la maceración.

El timol tiene acción bactericida aunque ésta se acentúa en combinación con el carvacrol y probablemente otros componentes derivados del fenol presentes en el destilado, macerado e infusión.

V G L O S A R I O

Agente antimicrobiano. Es una droga que actúa primariamente contra organismos infecciosos

Agente quimioterapéutico. Antimicrobianos sintéticos (isoniácidos, sulfonamidas y otras) que se utilizan en el tratamiento de una enfermedad.

Alcalosis hipocaliémica. Acumulación de bases o pérdida de ácido del organismo, que se asocia con niveles bajos de potasio sérico.

Amigdalitis. Inflamación de las amígdalas (anginas), en su forma aguda presenta enrojecimiento de las mismas, aumento de temperatura, dolor de cabeza y dificultad en la deglución.

Anafilaxia. Reacción alérgica del organismo tras la administración de una sustancia.

Anemia Hemolítica. Disminución del contenido de hemoglobina de la sangre, caracterizada por la ruptura de los hematíes.

Antibióticos. Del griego *anti*, *contra* y *bios*, *vida* son sustancias antiinfecciosas producidos por *hongos* (penicilina, griseofulvina) *bacterias* (bacitracina, colistina, polimixina B), *estreptomices* (estreptomocina, tetraciclinas) y *micromonosporas* (gentamicina), a través de vías metabólicas.

Antiespasmódico. Combate la contracción espasmódica involuntaria de los músculos.

Antihelmíntico. Expulsa o destruye a los parásitos intestinales.

Antiséptico. Impide la proliferación de gérmenes patógenos.

Bactericida. Antimicrobiano, destruye los microorganismos, son más eficaces durante el crecimiento logarítmico, dado que la actividad metabólica permite que haya máxima susceptibilidad.

Bacteriostático. Antimicrobiano que evita únicamente el crecimiento de las bacterias.

Carminativo. Provoca la expulsión de gases intestinales.

Depurativo. Purifica el organismo al activar los principios nocivos a través del sudor o la orina.

Dermatitis. Inflamación de la piel.

Destilación. Separar por medio de calor una sustancia volátil de otras más fijas enfriando su vapor para transformarla a líquido.

Diaforético. Provoca sudoración.

Difusión en disco. Técnica mediante la cual se mide el diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco de papel impregnado con antibiótico.

Dilución inhibidora mínima. La menor cantidad de antibiótico que inhibe el crecimiento visible, *in vitro* del microorganismo.

Dismenorrea. menstruación dolorosa.

Edema. Sufijo que significa "hinchazón por acúmulo de líquido seroso en los tejidos de una zona específica del cuerpo".

Exantema. Erupción de la piel, de color rojo.

Expectorante. Facilita la expulsión de las secreciones mucosas depositadas en la faringe, la laringe y los bronquios.

Faringitis. Inflamación aguda o crónica de la faringe.

Faringitis estreptocócica. La causa el estreptococo β -hemolítico, presenta faringe irritada, roja y edematizada, fiebre, vómito y cefalea.

Fármaco. Medicamentos.

Fiatulencia. Acumulación de gases en el tubo digestivo.

Gingivitis. Inflamación de las encías.

Glositis. Inflamación de la lengua.

Heterótrofos. Organismos que requieren una fuente externa de uno o varios compuestos orgánicos, de los cuales obtienen energía y carbono para el crecimiento y sus funciones metabólicas.

Hipoglucemiante. Reduce la cantidad de glucosa en sangre y orina de los diabéticos.

Inhibición. Proceso mediante el cual se impide la manifestación de un comportamiento.

Inóculo. Porción de gérmenes, en general patógenos, que con un vehículo cualquiera, se transfiere a un organismo o a un sustrato para inocularlos.

Insolación. Situación patológica producida por la exposición excesiva a los rayos solares, se caracteriza por fiebre elevada, convulsiones y comezón.

Leucopenia. Disminución del número de leucocitos en la sangre.

Leucorrea. Flujo vaginal blanquecino.

Nefropatía. Afección renal.

Posología. Parte de la farmacología que trata de las dosis en que deben administrarse los medicamentos.

Rubefaciente. Aplicado sobre la piel produce rubicundez, enrojecimiento y mayor riego sanguíneo.

Sensibilidad. Es la capacidad de ceder de un organismo (en su desarrollo) a los agentes antimicrobianos, según una evaluación efectuada por medio de técnicas normatizadas.

Sinérgico. Substancia que potencializa la acción de otra.

Tónico. Estimula y fortifica la actividad de los órganos.

Tóxico. Sustancias que matan o dañan las células de los organismos, como los venenos y las toxinas.

Trombocitopenia. Disminución de la tasa de plaquetas sanguíneas.

Tromboflebitis. Inflamación de las venas con formación de trombos.

Urticaria. Reacción alérgica caracterizada por la aparición de placas o pequeñas pápulas, acompañada de un dolor intenso.

V I B I B L I O G R A F Í A

- Anónimo A. 1992. Infección por Streptococcus pyogenes y fiebre reumática. 1992. *Infectología*, IMSS. Num 12. 769-773.
- Anónimo B. Organización Mundial de la Salud. 1978. Promoción y Desarrollo de la Medicina Tradicional. Informe Técnico No. 622.
- Anónimo C. Merck Index: Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biological. 1983. Merck et Co. N. J. U.S.A.
- Baeza, M. 1987. Faringoamigdalitis estreptocócica. Abordaje, Diagnóstico y Terapéutica. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 44:126-130.
- Bailey, L. H. 1951. Manual of Cultivated Plants. Horticulture Cornell University. MacMillan. New York.
- Bauer, A. W; M. Kirby W. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single method. *Amer. Jour. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- Berkow, R; J. Fletcher, A. 1989. El manual Merck de Diagnóstico y Terapéutico. Ed. Dayma. Barcelona, España.
- Bevan, J. 1982. Fundamentos de Farmacología. Ed. Harla. México.
- Brantner, A; K. P. Pfeiffer; E. Grein. 1993. Antibacterial assays of the pharmacopoeias: Diffusion tests of natural substances and their evaluation. *Plant. Med.* 59 / 7 Suppl. (A 675).
- Brown, T; H.E. LeMay; B.E. Bursten. 1993. Química La Ciencia Central. Prentice - Hall Hispanoamericana. México.
- Cáceres, A; M. Girón, L; R. Alvarado, S y F. Torres, M. 1987. Screening of Antimicrobial Activity of Plants Popularly Used in Guatemala. *Jour. Ethnopharm.* 20: 223 - 237.

- Cruz Martín de la. 1964. Libellus de Medicinalibus indorum herbis. Manuscrito azteca de 1552, según traducción latina de Juan Badiano. I M S S, México.
- Chávez, R. I. 1973. Cardioneumología Fisiopatológica y Clínica. U. N. A. M. México.
- Mc Carty, M. 1984. Estreptococos. Págs. 498-511. In: Davis, B. D; R. Duplecco; H. Einsen, N; H. Ginsberg, S. (eds). Tratado de Microbiología. Barcelona, España.
- De Krause, R. M. 1963. Antigenic and biochemical composition of hemolytic streptococcal cell walls. *Bacteriology. Rev.* 27: 369.
- Duke. J. A. and K. Wain, K. 1981. Medicinal Plants of the World, Computer Index with more than 85,000 entries, 3 vols. Ed. País.
- Estrada, L. E. 1985. Jardín Botánico de Plantas Medicinales "Maximino Martínez". Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Farrar, W. E, Jr; T. F. Sellers Jr. 1978. Quimioterapia de las infecciones bacterianas. Págs. 1668-1693. In: Drill. (eds). Farmacología Médica. México.
- Font, Q. P. 1980. El Dioscoroides Renovado. Ed. Labor. Barcelona. España.
- Gillespie, R; D.A. Humphreys; N. Colín B; E.A. Robinson. 1990. Química. Ed. Reverté. Barcelona, España.
- Gispert, C. 1995. Diccionario de Medicina Mosby. Ed. Océano. Colombia.
- Guadalajara, J. F. 1990. Cardiología. México.
- Guèrin, J.C; HP. Réveillire. 1985. Antifungal Activity of Plant Extracts Used in Therapy. II. Study of 40 Plant Extracts against 9 fungi species. *Am. Pharm. Fr.* 43 1 : 77 - 81.

- Gwaltney, J. M. Jr. 1971. Virology of middle ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 80: 365.
- Janssen, M. A; J. Schefer, J; A. Baerheim - Svendsen. 1986. Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar. *Pharm. Weekbl. (SCI ED)* 8 6: 289-292.
- Kagan, B. M. 1978. *Terapéutica antimicrobiana.* Ed. Salvat. Barcelona, España.
- Knobloch, K; H. Strobel. 1993. Effective concentrations of essential oil components to scavenge oxygen radicals and inhibit lipoxygenase turnover rates. *Plant Med.* 59 / 7 Suppl. (A 669).
- Laeorance, B. M. 1979. *Essential oils 1978,* ailured Publishing, Wheaton, volumen 3.
- Lancefield, R. C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *Journ. Exp. Med.* 57: 571-595.
- Mandell, G. L; M. A. Sande. 1991. Agentes antimicrobianos (continuación). Págs. 1035-1050. In: Gilman, A. G; L. S. Goodman. (eds). *Las bases Farmacológicas de la Terapéutica.* México.
- Mandell, G. L; M. Sade; J. E. Kapusn - Uner. 1991. Quimioterapia de las Enfermedades. Págs. 991-1011. In: Gilman, A. G; L. S. Goodman. (eds). *Las bases Farmacológicas de la Terapéutica.* México.
- Marsh, A. C; K. Moss, M. and W. Murphy, E. 1977. *Composition of Foods, Spices and Herbs.* Agric. Handbook 8:2.
- Martínez, A. M. A. 1978. *Etnobotánica: Un Panorama General.* *Med. Trad.* 1: 49-54.
- Masefield, Y. B; M. Wallis; G. Harrison, S E. Nicholson B. 1980. *Guía de las plantas comestibles.* Ed. Omega. Barcelona, España.
- Masterton, W; E.J. Slowinski. 1979. *Química General Superior.* Ed. Iberoamericana. México.

- Moritz, D; T. Cleary; L. K. Pickering. 1986. Infecciones graves del aparato respiratorio superior. *Infectología*, IMSS. Núm. 2. 55 - 62
- Perea, E. J. 1992. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vol. I. Ed. Doyma. Barcelona, España.
- Perrucci, S; F. Mancianti; P. L. Cioni; G. Flamini; I. Morelli and G. Macchioni. 1994. In vitro antifungal activity of essential some isolates of *Microsporium canis* and *Microsporium gypseum*. *Plant Med.* 60 / 2 (184 - 187).
- Ruiz, P. M. 1986. Pruebas para la identificación de estreptococos. *Infectología*, IMSS. Núm. 9. 373 - 383.
- Rzedowski, J. 1978. La Vegetación de México. Ed. Limusa. México.
- San Martín, C. R. 1977. Tratado de Farmacognosia. Científico Médica. España.
- Scagel, R. F; R. Bandoni, J; J. Maze, R; G. Rouse, E; W. Schofield, B y J. Stein, R. 1991. Plantas no Vasculares. Ed. Omega. España.
- Schoenkecht, F. D L. Sabath, D C. Thornsberry. 1987. Pruebas especiales de susceptibilidad. Págs. 1239-1248. In: Lennette, E. H; A. Balows; W. J. Hausler; H. J. Shadomy. (eds) . Manual de microbiología clínica. Argentina.
- Shellard, E.J; D. Patterson. 1988. Culpepers Color Herbal. Stterling Publishing. New York, USA.
- Simon, E.J; A. Chadwick, F; L. Craker E. 1984. Herbs an Indexed Bibliography 1971-1980. The Scientific Literature an Selected Herbs, and aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone. Archon Books. USA.
- Stahl, E; H. Jork. 1969. Thin - Layer Cromatography a Laboratory Handbook. Springer verlag. Berlin, Germany.

- Stahl, E. 1973. Drug Analysis by Chromatography and Microscopy. Ann Arbor Science Publishers. Michigan, USA.
- Valdés, J. 1974. Los Jardines Botánicos de México. U N A M. México. 239: 11 16.
- Valdés, J. y H. Flores. 1984. Comentarios a la obra de Francisco Hernández: Historia de las Plantas de la Nueva España. Tomo VII. U N A M, México.
- Van Den Broucke, C; JA. Lomli. 1980. Chemical and Pharmacological Investigation on Thymi Herba and Its Liquid Extracts. *Plant. Med.* 39 : 253 - 254.
- Van Den Broucke C. C. 1983. The therapeutic value of Thymus species. *Fitoterapia* 4: 171-174.
- Villaseñor, A. 1991. Fármacos Vegetales. Folleto de la F E S Zaragoza UNAM. México.
- Volák, J; J. Stodolla; S. Proken. 1983. Plantas Medicinales. ARTIA. Praga.
- William, A. R; M Thomson, D. 1980. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. Ed. Blume. España.

Table 31. Phenol and hydroxyphenylpropane derivatives, *hRf* - values and colour reactions (Silica gel G layer; benzene solvent)

Substance	<i>hRf</i> - values		Colour reactions		Anisaldehyde H_2SO_4 reagent (No. 11) after heating ^b	
	Chamber		Antimony (III) after heating ^a	(1 + 1) (Nos. 15 and 18) UV fluorescence after 24h		
	CS	NS				S-chamber
Safrole	57	90	-	grey - violet	brown - red, light edge	blue - green - grey
Isosafrole	57	90	grey - violet	blue-violet	violet - grey, light edge	grey - violet
Anethole	56	87	-	violet-grey	violet - pink	grey - red (bluish edge)
Methylchavicol	55	85	-	olive-green-grey	pink	violet - grey (after 15')
Myristicin	46	70	light brown	grey - brown	dark, reddish edge	brown - green - grey
Isomyristicin (<i>trans</i>)	46	70	-	brown - violet	brown violet	grey - brown
Resorcinol	40	72	grey - brown	brown - green	dark	red
dimethyl ether						
Apiole	35	58	light brown	olive - grey	dark	violet - grey
Isoapiole (<i>trans</i>)	35	58	violet	brown - violet	dark	blue - violet
Hydroquinone	31	54	-	yellow - green to brown	dark	weakly violet - grey
dimethyl ether						
Carvacrol	25	47	-	red to brown	red	light red - red - brown
Thymol	23	47	-	blue - red	red violet	red
Catechol diethyl ether	22	47	-	blue - grey	dark	red
Guaiacol	18	40	grey	grey - black	dark	brown - grey
Eugenol	18	40	violet - brown	brown - grey	violet - grey	dirty green
Eugenol methyl ether	15	31	violet - green	brown - violet	beige, greenish edge	brown, blue edge
Isoeugenol	15	31	-	violet	reddish - brown, light edge	dark violet
methyl ether						
Veratrol	13	29	-	blue - black	dark	weak reddish - lilac
Tetramethoxyallyl-benzene	11	20	-	olive green	dark	beige - brown (after 15')
Phenol	10	19	-	grey - brown	dark	red - orange
Asarone (<i>trans</i> -iso)	10	20	grey - yellow	grey - green	dark	red - lilac
Elemicin	8	12	weakly grey	grey - brown	dark reddish	brown - violet
Catechol	0	0	-	light pink - lilac	dark	red
Homocatechol	0	0	brown - grey	brown	dark	red
Resorcinol	0	0	-	yellow - brown	dark violet	red - orange
Hydroquinone	0	0	-	yellow - brown	dark	brown - grey
Butter yellow	32	60	53	CS = chamber saturation ; NS = without saturation (see p. 66).		
Sudan red	10	24	17	^a 10° at 100 - 105 °C. ^b No colour reaction before heating.		
Indophenol	3	10	8	Times for the 10 cm run : NS = 35°; CS = 50°; S - chamber = 40°		