

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

ESCUELA DE POSGRADO



TESIS

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE LA CREMA ELABORADA DE LA COMBINACION DEL ACEITE ESENCIAL DE *Syzygium aromaticum* (CLAVO DE OLOR) Y EXTRACTO ETANÓLICO DE *Thymus vulgaris* L. (TOMILLO) FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* Y *Candida albicans*

PRESENTADO POR:

ROSA CANDELARIA RAMIREZ HEREDIA

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA UNIVERSITARIA

ASESOR

Dr. FERNANDO RAFAÉL VIGIL CORNEJO

LIMA, PERÚ

2020

DEDICATORIA

Esta investigación está dedicada a todos mis seres queridos, a mis Hijos los cuales son motivo de superación, agradecer a mis padres por todo su apoyo, a mis hermanos por apoyándome y alentándome, sin ningún interés, en este camino de lucha y persistencia de mi formación profesional.

Agradecer a Dios, al que me ha brindado la dicha de existir y forma parte de su maravillosa creación.

Rosa Ramirez

AGRADECIMIENTO

A Dios, quien guía y bendice cada día mi existencia, para seguir adelante con mis planes y proyectos.

A nuestra casa de estudios, la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, nuestra alma Máter, formadores de profesionales competentes.

A la plana docente de la Facultad de Post Grado Doctor Luis Claudio Cervantes Liñán por compartir sus conocimientos.

Al personal del Laboratorio de especialidad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica por su predisposición durante la ejecución del proyecto.

A mi familia, por todo su apoyo en la ejecución del presente trabajo.

Rosa Ramírez

INDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
RESUMEN	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPITULO I	
1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
1.1 Marco Histórico.....	2
1.2 Marco Teórico.....	4
1.3 Marco Conceptual.....	16
CAPÍTULO II.....	20
2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
2.1.1 Descripción de la realidad problemática	20
2.1.2 Antecedentes Teóricos	21
2.1.2.1 Antecedentes nacionales.....	21
2.1.2.2 Antecedentes internacionales.....	23
2.1.3 Definición del Problema.....	28
Problema general:.....	28
2.2 Finalidad y Objetivos de la Investigación.....	30
2.2.1 Finalidad.....	30
2.2.2 Objetivo General y Específicos.....	30
2.2.3 Delimitación del estudio	31
2.2.4 Justificación e Importancia del Estudio	31
2.3 Hipótesis y Variables	33
2.3.1 Hipótesis General y Especifica.....	33
2.4.3 Variables e indicadores.....	33
CAPÍTULO III.....	35
MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTOS	35
3.1. Población y Muestra	35
3.2. Diseños utilizados en el estudio	4136
3.3. Técnicas e instrumentos de Recolección de Datos	436
3.3.1 Técnica de recolección de datos	46

3.3.2. Instrumentos de recolección de datos.....	36
3.4. Procesamiento de Datos	37
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS.....	55
4.1. Presentación de Resultados.....	63
4.2. Contrastación de Hipótesis	66
.....	
4.3. Discusión de Resultados.....	71
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	76
5.1 Conclusiones 5.2 Recomendaciones.....	865
REFERENCIA BIBLIOGRAFICA	86
ANEXO	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Aceites esenciales y sus componentes con propiedades antimicrobianas.....	25
Tabla 2: Operacionalización de las variables.....	47
Tabla 3: Marcha Fitoquímica de las plantas medicinales.....	54
Tabla 4: Grupos de estudio para el ensayo microbiológico.....	55
Tabla 5: Escala interpretativa Duraffourd y Lapraz (1983)	57
Tabla 6: Test de irritabilidad Método de Finklestein modificado.....	59
Tabla 7: Resultados de marcha fitoquímica (Método Olga Lock).....	61
Tabla 8: Resultado de las lecturas de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana.....	63
Tabla 9: Estadístico Descriptivo de la actividad antibacteriana.....	65
Tabla 10: Análisis de varianza de un factor (ANOVA) de la actividad antibacteriana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922).....	68
Tabla 11: Subconjuntos homogéneos, frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25922™).....	71
Tabla 12: Análisis de varianza de un factor (ANOVA) de la actividad antibacteriana frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25922™).....	74
Tabla 13: Subconjuntos homogéneos, media frente a <i>Escherichia coli</i> (ATCC®	75
Tabla 14: Subconjuntos homogéneos, media frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25922™).....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química del Eugenol	25
Figura 2: Estructura química de los compuestos químicos en la muestra.....	31
Figura 3: Plantas medicinales el estudio, selección y secado.....	52
Figura 4: Resultado de las lecturas de los halos de inhibición de la actividad actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de la crema frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™).....	62
Figura 5: Resultado de las lecturas de los halos de inhibición de la actividad actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de la crema frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923™).....	64
Figura 6: Placas de cultivo de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™).....	67
Figura 7: Placas de cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25923™)	70

ANEXOS

Anexo 1: Matriz de Consistencia.....	91
Anexo 2: Validación del instrumento	92
Anexo 3: Ficha de recolección de datos de la Marcha fitoquímica.....	93
Anexo 4: Ficha de datos de la Actividad antimicrobiana.....	94
Anexo 5: Preparación del extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo).....	95
Anexo 6: Extracción del aceite esencial del <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor).....	96
Anexo 7: Marcha Fitoquímica extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo).....	97
Anexo 8: Marcha Fitoquímica del aceite esencial del <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor).....	98
Anexo 9: Determinación de la actividad antibacteriana de la crema vegetal.....	99
Anexo 10: Preparación del inóculo bacteriano.....	100
Anexo 11: Preparación de los medios de cultivos.....	101
Anexo 12: Sembrado, cultivo y incubación de las placas petri.....	102
Anexo 13: Resultados de los cultivos y medidas de los halos de inhibición.....	103
Anexo 14: Preparación de la crema vegetal antibacteriana.....	104
Anexo 15: Test de irritabilidad en conejos albinos.....	106

RESUMEN

El objetivo es determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de la crema elaborada a base del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y el extracto etanolico de *Thymus vulgaris* (tomillo) frente *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™). Metodología: corresponde a un estudio de tipo experimental, transversal y prospectivo, Se empleó la técnica de Kirby Bahrer o Método de Difusión, para evaluar el efecto antibacteriano, se usó 4 grupos de ensayo por bacteria, concentraciones al 5 y 10% de la crema, controles positivo y negativo, el grado de sensibilidad se interpretó en función al tamaño de los halos de inhibición, usando la escala de Duraffourd; la identificación de metabolitos secundarios se realizó la Marcha fitoquímica. Resultados: Los halos de inhibición de la crema frente a cepas de *Escherichia coli* al 5% es 10.18 mm, al 10% 12.33mm, ambas con una sensibilidad (++), para las cepas de *Staphylococcus aureus* al 5% es 8.93mm al 10% 10.95mm, ambos resultados con una sensibilidad (+), el control positivo 19.20mm sensibilidad alta (+++) y al control negativo 6.0 mm sensibilidad nula; los metabolitos secundarios identificados fueron los compuestos fenólicos, flavonoides, triterpenos, quinonas y alcaloides. Los datos fueron procesados usando el estadístico SPSS® ANOVA con un nivel de confianza al 95%, y una significancia menor a 0.05 ($p > 0.05$). Conclusión: La crema elaborada a base del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y el extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo), presenta antibacteriana.

Palabras clave: Metabolitos secundarios, actividad antibacteriana, *Syzygium aromaticum*, *Thymus vulgaris*, cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, test de irritabilidad.

ABSTRACT

The objective is to determine the antibacterial activity *in vitro* of a cream made from the essential oil *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) and ethanolic extract of the etanolico de *Thymus vulgaris* (tomillo) against *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™). Methodology: The present work of investigation corresponds to an experimental, transversal and prospective study, The Kirby Bahuer technique or Diffusion Method was used in Mueller Hinton agar cultures to evaluate the antibacterial effect, using 4 study groups for each bacterium, corresponding to the concentrations of 5 and 10% of the cream, positive controls (Niofen commercial cream) and negative (distilled water), the degree of sensitivity was measured as a function of the size of the inhibition halos, using the Duraffourd scale; the identification of secondary metabolites was carried out the Phytochemical March. Results: The mean of the inhibition halos of the cream against *Escherichia coli* strains was at 5% is 10.18 mm, at 10% 12.33mm, both with a Sensitivity (++) , for the *Staphylococcus aureus* strain, the mean At 5% it is 8.93mm at 10% 10.95mm. Likewise, both results show a Sensitivity (++) , the positive control 19.20mm, High Sensitivity (+++) and the negative control 6.0mm, Zero Sensitivity; the secondary metabolites identified were phenolic compounds, flavonoids, triterpenes, quinones and alkaloide. The data were processed through the SPSS® statistical program using y ANOVA tests with a confidence level of 95%, and a significance lower than 0.05 ($p > 0.05$). Conclusion: The cream made from the essential oil of *Syzygium aromaticum* (cloves) and the ethanolic extract of *Thymus vulgaris* (thyme), presents antibacterial properties.

Key words: Second metabolites, antibacterial activity, *Syzygium aromaticum*, *Thymus vulgaris*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains, irritability test

INTRODUCCIÓN

Desde nuestros antepasados, hasta nuestros días, las plantas medicinales son usadas como un medio natural para prevenir, tratar y curar algunas dolencias o afecciones; así mismo de nuestro conocimiento que un sector de la población, en especial los habitantes de las zonas rurales recurren al tratamiento ancestral como primera línea de abordaje frente a sus necesidades de salud; esta confiable actividad también la podemos observar en la arqueología de las diferentes culturas peruanas, donde reflejan el uso de plantas medicinales.

Con base a este conocimiento cultural en la utilización de las plantas medicinales, así mismo en las investigaciones previas y referencias de las propiedades y bondades terapéuticas del *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y el *Thymus vulgaris* (tomillo), utilizados como antiinflamatorio, analgésico, antimicrobiano, entre otros efectos positivos, en la fitoterapia; se ha visto la necesidad de realizar un preparado o forma farmacéutica de una crema antibacteriana de la combinación de ambas plantas (aceite esencial y el extracto etanolito); para poder evaluar su eficacia y calidad y seguridad, el estudio fue sometido a pruebas de laboratorio donde se evaluara la actividad antibacteriana *in vitro* frente a dos bacterias patógenas de interés clínico, como son la *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Según reportes del Ministerio de Salud, uno de los problemas de salud pública, es la automedicación, lo que conlleva a generar en cierta población una resistencia bacteriana y efectos secundarios que dañan al organismo; por este motivo se ve la necesidad de crear una crema natural, de uso tópico, sin efectos dañinos, como primera línea de tratamiento para heridas infectadas o afecciones en la piel en especial a la población vulnerable como son los niños y los ancianos.

La elaboración de una crema usando la técnica de la fitoterapia y formulaciones magistrales, como una alternativa terapéutica natural; despierta el interés de usar productos sin efectos nocivos, así también incentivar la comercialización, producción en el manejo de materias primas de origen natural en la industria farmacéutica reduciendo así el uso de medicamentos sintético.

Entre tanto, el presente estudio experimental *in vitro*, aplicativo se desarrolló en cuatro capítulos.

El capítulo I: Comprende los fundamentos teóricos de la investigación en cuyo desarrollo se ha considerado el Marco histórico, Marco teórico, las investigaciones relativas al estudio, el marco conceptual.

El capítulo II: Corresponde al problema, los objetivos, las hipótesis y variables, habiéndose desarrollado el planteamiento del problema, la finalidad, los objetivos de la investigación, hipótesis y variables.

El capítulo III: Se detallan la presentación por el método, técnica e instrumentos, el mismo que se menciona la población y muestra, diseño, la técnica e instrumento de recolección, procesamiento de datos, contemplando la confiabilidad y validez de los instrumentos usados.

El capítulo IV: Se realiza la presentación y análisis de los resultados recogidos, en cuyo contenido se han presentado los resultados hallados, así mismo el proceso de contrastación de hipótesis, análisis e interpretación de los datos y la discusión de resultados.

El capítulo V: En este último, se presentan la elaboración de las conclusiones y recomendaciones relativas a las hipótesis de estudio y las posibles aplicaciones que se pudieran dar a los resultados de estudio. Finalizando con el registro de las bibliográficas y los anexos respectivos

CAPÍTULO I

1. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Marco Histórico

Desde el inicio de la humanidad, el hombre trata de sobrevivir a un mundo en constante cambio, muchos de estos pueden atentan con la salud, para ello busca una serie de necesidades, inicialmente fueron las principales y posteriormente fueron usando las demás; en el afán de vivir en equilibrio con su medio interno y externo; la madre naturaleza ha podido brindarle esta necesidad, logrando que el hombre pueda subsistir hasta nuestros días, en el presente trabajo de investigación abordaremos el uso de las bondades de las plantas medicinales con fines terapéuticos, refiriéndonos a la medicina tradicional que es importante y muchas veces subestimada de los servicios de salud. Históricamente, la medicina tradicional complementaria (MTC) se viene utilizando para mantener la salud, prevención y tratamiento en algunas enfermedades, en particular enfermedades crónicas.¹

El uso de las plantas medicinales es tan antiguo, como nos muestra la Medicina tradicional China, que es una ciencia milenaria, con una presencia de más de 4.000 años de antigüedad; tal como se evidencian en reliquias y documentos históricos, la utilización de plantas naturales como medicina ², así mismo podemos mencionar a la antigua civilización Egipcia a través del papiro de Ebert, la culturas India en el texto Rigvera, entre otras culturas; según testimonio escrito más antiguo de MTC data del siglo XI a.C. ^{2,35}

En el Perú, el uso de plantas medicinales ha estado presente, tal como se evidencia en la artesanía, tejido, cerámicas, huacos retratos; agregando a ello la diversidad de flora y fauna presentes, proporcionándonos una infinidad de recursos para ser explorados y estudiados por la comunidad científica.^{2, 3} El Perú posee un acervo inigualable en materia de conocimientos ancestrales relacionados al diagnóstico y tratamiento de la salud, estos conocimientos muchas veces han sido transmitido preferentemente por tradición oral, practicados por una gran parte de la

población y que éstas pueden variar de acuerdo a las regiones e identidad cultural.^{3,11}

Las plantas con sus componentes químicos llamados también metabolitos secundarios tienen una larga historia de uso en la medicina moderna "occidental" y en ciertos sistemas de medicina tradicional, y son las fuentes de medicamentos importantes usados como atropina, codeína, morfina, quinina, entre otros.² El uso de plantas medicinales en los países desarrollados se ha expandido considerablemente en la segunda mitad del siglo veinte. En los últimos años, el uso de la información de la medicina tradicional en la investigación de plantas ha vuelto a recibir considerable interés.^{1,2} La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos.⁶

En las últimas décadas se vienen desarrollando investigaciones con enfoque dirigidas al descubrimiento de nuevos componentes con acciones farmacológicas usadas no solamente con fines terapéuticos, sino también con medidas de prevención usando productos de origen natural, muchas de ellas con propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes.⁴

En el presente estudio se enfoca al uso tópico de una crema con actividad antimicrobiana elaborada a base de aceite esencial *Syzygium aromaticum* comúnmente conocido como clavo de olor, según estudios realizados los aceites esenciales son el producto final del metabolismo secundario de las plantas aromáticas, en ellas se encuentran los terpenos con actividad y composición variada; estas otorgan propiedades antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida.^{5,11}

Estudiar plantas medicinales nos ayuda a proporcionar alternativas terapéuticas para la atención primarias de salud, aliviar procesos crónicos⁶, sin poner en riesgo la salud o presentar efectos secundarios que muchas veces estamos sujetos ante el uso de medicamentos de origen

sintéticos.^{1,2,3} El valor de plantas medicinales como *Thymus vulgaris* y el aceite esencial *Syzygium aromaticum* utilizadas en prácticas médicas tradicionales y modernas nos brinda una alternativa natural, segura y eficaz sobre todo ante la población más vulnerable como son los niños y ancianos.^{4,5} además de ello las plantas medicinales nos proporcionan información química de sus principios activos que pueden servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas con menor efectos secundarios, de igual manera estos principios activos pueden ser utilizados como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos.^{6,11}

1.2 Marco Teórico

- **Importancia de los metabolitos secundarios**

Una gran parte de los principios activos de la planta, están los llamados metabolitos secundarios, estas son estructuras químicas generalmente complejas y de gran diversidad que caracterizan a los compuestos químicos⁶, Muchos de los metabolitos secundarios también reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado este último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Un número significativo de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir una serie de enfermedades, también se rescata el uso de sus colorantes con fines cosméticos o en de rituales ancestrales, las propiedades de las plantas en la actualidad aportan diferentes aplicaciones en la industria como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas y colorantes, entre otros.⁸

La síntesis de metabolitos secundarios son sustancias de bajo peso molecular, son productos del proceso fundamental de la fotosíntesis¹¹, estas pueden depender de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos solo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico, producido muchas veces por el medio ambiente o por los insectos. Este aumento en los niveles de metabolitos secundarios, es

importante para la supervivencia de las plantas, ya que su síntesis se deriva del metabolismo primario y porque algunos compuestos son tóxicos para la misma planta. Es así como algunos metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas a heridas y al ataque por parte de las plagas, así mismo estos compuestos secundarios van lugar a las propiedades terapéuticas presentes en la planta .^{7,8}

Los metabolitos secundarios se clasifican de acuerdo a su estructura química, éstas pueden ser variadas, por ejemplo los que contengan al nitrógeno incluyen los alcaloides, aminoácidos, aminos, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos, aquellos que no contienen al nitrógeno se clasifican en: terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides, así mismo los alcaloide, esteroides, taninos,y compuestos fenólicos son capaces de producir acción fisiológica sobre el organismo. ^{8,10,11}

- **Obtención de extractos**

Las plantas naturales contienen una amplia gama de componentes bioactivos como son los lípidos, compuestos fitoquímicos que son utilizados en la industria farmacéutica, variedad de sabores que no han podido ser catalogados entre ellas podemos mencionar las fragancias y sin dejar al lado los pigmentos por ello los extractos vegetales son ampliamente usados en la alimentación, conservación y fabricación de diferentes productos cosméticos.¹¹, existen diferentes técnicas de extracción de estos componentes que son utilizados de acuerdo a las características de la planta o del órgano que se va utilizar, de esta manera poder obtener tales componentes naturales de plantas de gran valor para su comercialización.⁸

El método tradicional de extracción es por arrastre de vapor el cual se utiliza agua corriente, seguida del uso del equipo Soxhlet, el cual ha sido usado por muchas décadas, para ello se requiere relativamente grandes cantidades de solventes orgánicos ^{8,9}

Existen métodos más novedosos de extracción incluyen la extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción por fluidos supercríticos y extracción acelerada por solventes, los cuáles son técnicas rápidas y eficientes para usarlas en la extracción de los componentes químicos de las plantas.^{9,11}

El Método tal vez más económica de extracción por disolventes usada a nivel de laboratorio sea la técnica de maceración o extracción alcohólica, en la cual la materia orgánica reposa en soluciones de alcohol por periodos de tiempo definidos, con respecto a los aceites esenciales son recuperados evaporando el alcohol, generalmente en rotavapores, también se puedes utilizar como solvente el agua destilada, eso depende generalmente de la planta que se quiera estudiar, casi siempre se utilizan plantas frescas.^{3,8,9}

Especie vegetal

- ***Thymus vulgaris* L.(Tomillo)**

El hábitat natural del tomillo se encuentra en países de la cuenca mediterránea occidental, especialmente sobre suelos soleados y secos, según autores el tomillo no tiene un origen definido, sin embargo, se atribuye al sur de la Península Ibérica, así como en Baleares, su crecimiento en suelos calizos, arcillosos, por lo tanto, el origen esta planta, aunque la mayoría coincide que es originario de Europa.^{10,11}

Las especies más utilizadas al sureste de España, donde se realizan cultivos a mayor escala para el comercio, son de diferentes especies, pero la mayoría son: *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* spp, *Thymus baeticus*, *Thymus hiemalis*, *Thymus mastichina* y *Thymbra capitata* y *Thymus vulgaris* es una especie muy variable, tanto en su fenología como en la composición química de su aceite esencial, variando de la época y estación de recolección de la planta.¹¹

Las especies de timo son bien conocidas como plantas medicinales debido a sus propiedades biológicas y farmacológicas. En la medicina tradicional,

las hojas y las partes con flores de las especies *Thymus* se usan ampliamente como tónico y té de hierbas, antiséptico, antitusivo y carminativo, así como para el tratamiento de los resfriados.¹³

CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA DE *Thymus vulgaris* L.(TOMILLO)

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

- **Descripción**

De acuerdo a la información encontrada en la Herbotecnia (2008), menciona que el tomillo, es un pequeño sub arbusto que generalmente no supera los 0.50 m de altura, algunos autores sostienen que los tamaños pueden variar de acuerdo a la geografía donde se encuentra¹⁰. los tallos son ascendentes, cuadrangulares, las hojas son lineales, variadas en sus formas de color verde grisáceo, opuestas, naciendo en las zonas bajas del tallo y en las más altas. Las flores están reunidas en formación similar a las espigas, los colores pueden variar de blancas y rosadas pequeñas en inflorescencias terminales, su fruto está constituido por cuatro aquenios ovalados¹¹.

- **Composición Química**

Los aceites y extractos de *Thymus vulgaris* (tomillo) son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica, cosmética y de perfumes, también para aromatizar y preservar varios productos alimenticios.^{11, 12}

En su composición química destacan el aceite esencial y los flavonoides. El aceite esencial (1,0-2,5%) está constituido principalmente por fenoles monoterpénicos, como timol, carvacrol, p_cimeno, gammaterpineno, limoneno y linalol.¹²

Sin embargo, otros estudios sostienen que *Thymus vulgaris* (tomillo) está compuesto por: timol en un 70% y carvacrol en un 20%, adicionalmente contiene otros componentes en menor cantidad como: simeno, terpenos, bolneol, linalol, y ésteres acéticos como: cinelo, geraniol y cariofiteno.^{2,12}

El aceite esencial de Tomillo mostró un alto contenido de monoterpénos oxigenados 56.53% y bajos contenidos de hidrocarburos monoterpénos 28.69%, hidrocarburos sesquiterpénos en 5.04% y sesquiterpénos oxigenados 1.84%. El compuesto predominante entre los componentes del aceite esencial fue el timol (51.34%) mientras que la cantidad de todos los demás componentes del aceite fue inferior al 19%.²

- **Uso terapéutico**

En medicina popular la infusión de las partes aéreas de esta planta se emplea para tratar malestares digestivos (cólicos, diarrea, dispepsia, flatulencia, parásitos, vómitos), respiratorios (amigdalitis, laringitis, bronquitis, catarro, tos, resfrío); por vía tópica una infusión, a si también el tomillo es una importante especie de uso culinario utilizada para sazonar y preservar alimentos.^{10,11}

En uso en la piel es habitual en cortes, contusiones, quemaduras, abscesos, acné, dermatitis, sarna, piojos, picaduras de insectos, piel grasa, infecciones de las encías, también se da el caso en enfermedades respiratorias como: bronquitis, laringitis, sinusitis, amigdalitis, catarro, tos, asma, reportes a sus bondades curativas señalan que alivia dolores musculares y articulaciones como la artritis, reumatismo, torceduras, a nivel digestivo ante la flatulencia, diarrea, también se usa para reforzar el Sistema inmune, contra enfermedades infecciosas, calma el sistema nervioso ante la presencia de insomnio, debilidad nerviosa, enfermedades por estrés, dolor de cabeza.^{12,13,15}

Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo)

El aceite esencial de Tomillo, el mayor compuesto químico encontrado son los componentes fenólicos, timol y carvacrol,² los que tiene una actividad antibacteriana tanto frente a gérmenes gram-positivos como gram-negativos,² este efecto es debido a su acción sobre la membrana bacteriana. La eliminación de timol y carvacrol por vía respiratoria produce una actividad antiséptica respiratoria. Por su actividad antibacteriana, es usado como antiséptico urinario y enjuagues de la cavidad bucofaríngea, así como para el lavado de heridas, donde hay contaminación con hongos, u otras levaduras, frente a *Candida albicans*.¹² así mismo se usa como antifúngicos para combatir el hongo de las plantas, preservar semillas y cultivos ¹¹.

También es eficaz en el alivio de los problemas intestinales como vientre hinchado y aerofagia, para lo que resulta ideal asociarlo al carbón vegetal. Su acción antiséptica ejerce igualmente acción terapéutica sobre el sistema digestivo especialmente en procesos diarreicos, además de ello resaltaremos virtudes estimulantes y antiviricas que puede utilizarse para prevenir las recidivas del herpes zóster. ¹²

- ***Syzygium aromaticum* (clavo de olor).**

Syzygium aromaticum, es el clavo de olor, estos son brotes de flor sin abrir , el árbol puede alcanzar hasta 15 metros de altura y estos se pueden cosechar cuando el árbol tiene entre seis y ocho años en donde ha alcanzado la edad madura y pueden florecer, a medida que se van secando al sol el clavo de olor va pasando de un color rojizo claro a un marrón oscuro. El clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) es una especia perteneciente a la familia Myrtaceae, la cual se caracteriza por habitar en ambientes principalmente tropicales, desde la antigüedad fue utilizado en preparados culinarios e infusiones, además para aliviar molestias dentales, estas propiedades se atribuyen a la presencia de aceites esenciales. ^{17,18}

El principio activo de interés se encuentra en el botón floral que tiene olor aromático, picante y ligeramente astringente. La actividad antimicrobiana se atribuye al eugenol que es activo contra *S. aureus*, *E.coli* y *C. albicans*.¹⁸

Taxonomía del clavo de olor

Basado en lo que menciona Hernández P. (2011), el clavo posee la siguiente Taxonomía ¹⁹

Familia: Myrtaceae

Subfamilia: Myrtoideae

Género: Syzygium

Especie: *S. aromaticum*

- **Composición nutricional del clavo**

La composición nutricional del clavo, varía en función con las condiciones agroclimáticas a las que está expuesto el fruto durante su cultivo, cosecha y almacenamiento. El análisis proximal de 100 gramos (g.) del botón floral seco indica: 430 calorías, 5.4g de humedad, 6.3 g de proteína, 13.2 g de aceite volátil, 15.5 g de grasa no volátil, 11.1 g de fibra, 57.7g de carbohidratos totales, 5 g de materia mineral, 0.24 g de ceniza insoluble en ácido, 0.7 g de calcio, 0.11 g de fósforo, 0.01 g de hierro, 0.25 g de sodio, 1.2 g de potasio, 0.11 mg de vitamina B1, 0.04 mg de vitamina B2, 1.5 mg de niacina, 80.9 mg de vitamina C, 175 UI de vitamina A .¹⁸

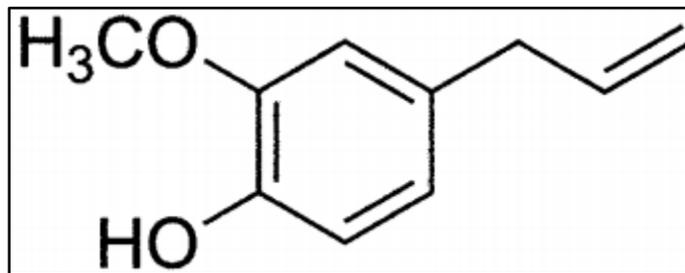
Eugenol (C₁₀H₁₂O₂) es guaiacol con una cadena de 2 metoxi-4-(2-propenil) fenol El eugenol es un miembro de los compuestos de la clase bencenos. Es un líquido oleoso de color amarillo pálido extraído de ciertos aceites esenciales, especialmente del clavo de olor, la nuez moscada, y la canela. Es difícilmente soluble en agua y soluble en diferentes solventes orgánicos con polaridad distintas, el aroma que desprende suelen ser los metabolitos secundarios presentes.¹⁹

- **Aceite esencial de clavo**

El aceite esencial de clavo es un compuesto fenólico, resultante de la destilación de las hojas, semillas y tallos de la planta de clavo (*Syzygium aromaticum*). Su principio activo es el eugenol, presente en concentraciones que oscilan entre 70 y 95% de la composición total del aceite. Los aceites esenciales cubren un amplio espectro de actividades tales como efectos farmacológicos, antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos. Otros son biosidas contra una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos, virus, protozoos), insectos y plantas.^{18,19}

los aceites esenciales (AE) y sus componentes cuyas propiedades antibacterianas están evidentemente relacionadas con su carácter lipofílico, lo que lleva a la acumulación en las membranas y posteriormente, a eventos asociados, como el agotamiento de la energía. Presentan un efecto antibacteriano contra las bacterias Gram negativas, dado que ellas poseen una membrana externa rica en lipopolisacáridos que le proporciona una superficie hidrofílica y El eugenol, componente mayoritario del aceite de clavo de olor .¹⁵

Figura N 1: Estructura química del Eugenol



Fuente: Álvarez y Bagué, (2012).

La acción antimicrobiana de los aceites esenciales, al tener un gran número de compuestos, no se atribuye a un único mecanismo, sino a varios debido a los múltiples blancos en la célula. Una característica importante de los aceites esenciales es su hidrofobicidad, característica que les permite

unirse a los lípidos de la membrana celular desestabilizando su estructura y aumentando su permeabilidad, generando la salida de iones, metabolitos y demás moléculas que pueden conllevar a la muerte.¹⁹

Se ha descubierto que las sustancias antimicrobianas de la mayoría de las especias son los propios aceites esenciales (AE), mezclas de diferentes productos volátiles,

entre los que se incluyen alcoholes, cetonas-éteres fenólicos, fenoles, ácidos y sus esteres.^{15,18,19}

Tabla N 1: Aceites esenciales y sus componentes con propiedades

Nombre común	Nombre científico	Fuente	Componente mayoritario	Antifúngico	Antibacterial
Clavo	<i>Syzygium aromaticum</i>	Brote Hoja	Eugenol	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Lactobacillus sakei</i>
Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>	Hoja Madera	Eucaliptol Eucaliptone	Hongos y levaduras	Bacterias patógenas
Menta	<i>Mentha canadensis</i>	Hoja	Mentol	<i>Botrytis</i>	Bacterias patógenas
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Hoja Flor	Eugenol Carvacrol, Timol	<i>Botrytis</i> <i>Fusarium</i> <i>Clavibacter</i>	<i>Shigella</i> sp.
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Hoja	Carvacrol p-Cimeno Timol	<i>Aspergillus</i>	Bacterias patógenas

antimicrobianas

Fuente: Pérez y López, (2011).

Microorganismos patógenos

- ***Escherichia coli***

Escherichia coli es una bacteria que se encuentra normalmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente, la gran mayoría de las cepas son inofensivas. Sin embargo, algunas de ellas, como son productoras de toxina Shiga, estas pueden desarrollarse a temperaturas entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37°C. pueden causar graves enfermedades a través de los alimentos. El contagio

se realiza mediante la transmisión principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos de carne picada cruda o poco cocida, leche cruda, y hortalizas y semillas germinadas crudas contaminadas.²⁰

Escherichia coli y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de ser responsables de producir vitaminas B y K. El tamaño promedio de los bacilos es de 0.5 μ de ancho por 3 μ de largo, cuando se utiliza la tinción de Gram se tiñen de rojo (gramnegativas). Algunas especies son móviles (por flagelos peritricos), no esporuladas, fermenta la glucosa y la lactosa son catalasa positivos, oxidasa negativos y reduce nitratos a nitritos.²⁰

- ***Staphylococcus aureus***

El género *Staphylococcus* está conformado por cocos Gram-positivos, con un diámetro que puede variar de 0.5 a 1.5 μ m, generalmente se agrupan, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Alexander Ogston introdujo el nombre de *Staphylococcus*, del griego staphyle que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración. Son organismos bacterianos no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayor parte de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que no poseen esta actividad; es decir son catalasa negativos.²¹

La capacidad de *S. aureus* para fermentar los azúcares como maltosa, manitol, u otras pruebas bioquímicas dan un resultado positivo, así mismo la producción de una nucleasa termoestable es un buen indicador de la presencia *S. aureus*, al igual que la conversión de nitratos a nitritos, elaboran diversas enzimas: proteasas, lipasas, fosfatasas, gelatinasas,

catalasas y coagulasas, en cultivos puros resisten una concentración de fenol al 1% durante 15 minutos, pero solo los mata una concentración al 2%. Soportan el calor húmedo a 60 °C durante 30 minutos. Muchas cepas de *S. aureus* toleran concentraciones altas de cloruro de sodio (7,5 a 10%), y son fácilmente inhibidos por colorantes como el violeta de genciana.²¹

Estudios científicos han demostrado, también, que los azúcares pueden aumentar la capacidad de *Candida* para adherirse a las células del organismo, haciéndola aún más patógena.²²

- **Antibacterianos**

La emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano, prueba de ello es el aumento en los últimos años del número de publicaciones, relacionando productos naturales y actividad antimicrobiana.^{11,16}

Los antimicrobianos son compuestos químicos presentes en las plantas o elaborados sintéticamente, a veces son añadidos en los alimentos, que retardan el crecimiento microbiano o inactivan a los microorganismos y por lo tanto, detienen el deterioro de la calidad y brindan seguridad al alimento,¹⁵. La acción de los antimicrobianos sobre las células de los microorganismos en la conservación de alimentos está basada en una gran variedad de efectos individuales, dentro de los que se incluyen mecanismos físicos, fisicoquímicos y reacciones bioquímicas de la célula afectada. Los antimicrobianos actúan sobre los microorganismos inhibiendo la síntesis de la pared, de la membrana celular, de los ácidos nucleídos y la de las proteínas.^{11,15}

Los Antibacterianos con efecto concentración dependiente, muestran actividad concentración pico máxima se incrementa por encima de la concentración mínima inhibitoria (CIM) luego de su administración, mayor es la tasa y extensión de la actividad bactericida. Es una relación prácticamente lineal. Son ejemplo los aminoglucósidos, quinolonas, metronidazol, anfotericina, polimixinas. En general, todos poseen efectos

post antibiótico a diferencia de los antimicrobianos de tiempo dependiente la actividad bactericida es dependiente del tiempo, durante el cual la concentración de la droga libre permanece por encima de la CIM del patógeno. Son ejemplos penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, clindamicina, fluconazol.²³

- **Ensayos de Toxicidad cutánea:**

Estos tipos de ensayos son aplicados en la industria cosmética y farmacéutica, en las últimas décadas el mercado de cosméticos y productos para el cuidado de la personal ascienden aproximadamente a 10 000 millones de dólares,³⁵ muchas de ellas tienen el objetivo mantener un aspecto joven y lozano de la superficie del cuerpo y se han clasificado de acuerdo a la parte del cuerpo a la que está destinado su uso:

- Cosméticos para la piel (polvos, cremas, lociones, jabones, lápiz, barras de labios, etc.)
- Cosméticos para el cabello (champúes, tintes, etc.)
- Cosméticos para los ojos (rimel, sombras, etc.)

Muchas de las formulaciones contienen ingredientes naturales, orgánicos, y artificiales que pueden causar efectos irritantes en la piel u ojos, estos van a depender de acuerdo a la severidad en la que puedan dañar la piel o mucosa, de la concentración del agente y de forma de uso del compuesto como lo es el tiempo de exposición o contacto. Asimismo, existe una serie de medicamentos y vehículos que se aplican tópicamente para obtener efectos locales y generales y que son capaces de alterar las características físicas de la piel. El estudio de la actividad y toxicidad (entre ellas irritación) provocada por las sustancias que se aplican localmente a la piel y a las mucosas, se efectúa por lo general en el conejo y el cobayo y en algunos casos especiales en la piel humana.^{34,35}

- **Sensibilidad cutánea**

La piel reacciona con la inflamación al estímulo irritativo, al igual que otros tejidos, los estadios sucesivos de la reacción incluyen el eritema, la vesícula, la pústula y la úlcera. La prueba de sensibilidad cutánea es realizada dentro de los controles de calidad para el producto terminado y para la evaluación de una formulación en proceso de producción, estableciendo el laboratorio fabricante las especificaciones del grado o índice de irritabilidad de acuerdo al tiempo de contacto y a la forma de uso, por

ejemplo, el efecto irritante es común en los jabones y tensoactivos sintéticos, sin embargo, el tiempo de contacto con la piel en comparación con una crema es diferente. Las cremas requieren de gran cuidado en su preparación ya que son productos que están por más tiempo en contacto con la piel y por ende son los que más influyen sobre ésta, los polvos, lápices de labios y otros sólo enmascaran el rostro en forma pasajera y circunstancial.³⁴

- **Cremas**

Son formas farmacéuticas semisólidas emulsionadas que contienen uno o varios principios activos y hasta un 80 % de agua. Este término se ha aplicado tradicionalmente a los semisólidos que poseen una consistencia relativamente fluida formulados y asea como una emulsión agua en aceite o aceite en agua. Sin embargo, más recientemente el término ha estado restringido a los productos que consisten en emulsiones aceite en agua o dispersiones acuosas microcristalinas de ácidos grasos o alcoholes de cadena larga que son fácilmente lavables, cosmética y estéticamente más aceptables.³⁶

Marco Conceptual

a) **Agente antibacteriano:**

El término se refiere a una sustancia cuyas propiedades son capaces de eliminar bacterias o la inhibición de su crecimiento o proliferación sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que las porta. Son en esencia

fármacos como es el caso de los antibióticos u otros agentes químicos capaces de combatir estos cuerpos. ²³

b) **Aceite:**

Sustancia grasa, líquida a temperatura ordinaria, de mayor o menor viscosidad, no miscible con agua y de menor densidad que ella, que se puede obtener sintéticamente.

c) **Bacteria:**

Microorganismo unicelular microscópico perteneciente a los procariotes que se multiplica por fisión binaria y carece de clorofila. Se diferencian por la coloración de Gram.²³

d) **Bacteria Gram negativa:**

Aquella bacteria que no retiene el colorante primario (violeta de genciana o cristal violeta) en el método de Gram, son decoloradas por el alcohol y toman el color del colorante contraste (safranina ó fucsina) dando un color rojizo. ²³

e) **Bacteria Gram positiva:**

Aquellas bacterias que retienen el colorante primario del método de Gram, resisten la decoloración por el alcohol y no son coloreadas por el colorante de contraste reteniendo el color azul púrpura inicial.²³

f) **Colonia:**

Crecimiento visible de microorganismos, generalmente en medios sólidos, originado por la multiplicación de un solo organismo. Todos son la progenie de una única bacteria preexistente.²³

g) **Cepa bacteriana:**

Todos los organismos descendientes de un cultivo puro, por tanto, con fenotipo y genotipo definidos, están pueden ser clínicas o procedentes de un cepario, cultivadas bajo ciertos estándares. (Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS pág. 208).

h) **Cultivos:**

Método microbiológico para la multiplicación de especies bacterianas, bajo medios controlados, permitiendo el estudio profundo de la bacteria que causan enfermedades infecciosas de interés clínico.²³

i) Disco de sensibilidad:

Son discos impregnados de un antibiótico específico que es utilizado para realizar pruebas de sensibilidad por el método de difusión en agar.²³

j) Efecto antibacteriano:

Capacidad de destrucción hacia un determinado microorganismo, con la finalidad de inactivar su crecimiento y desarrollo patógeno.

k) Extracto:

Es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua. Los extractos pueden comercializarse como tinturas o en forma de polvo.

l) Escala de Duraffourd:

Escala cualitativa que determina la sensibilidad antibacteriana, determina cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro según diámetro de los halos de inhibición.

m) Halo de inhibición:

Zona alrededor del disco de sensibilidad, donde una sustancia antibacteriana es capaz de impedir el crecimiento antibacteriano después de un tiempo determinado.

n) In vitro:

Es una técnica que consiste en realizar un experimento ya sea en tubo de ensayo o un ambiente controlado (laboratorio).

o) Incubación:

Proceso de que facilita condicione adecuada para el crecimiento y desarrollo de cultivos bacterianos.

p) Medio de cultivo: Medio artificial de sustancias nutritivas necesarias para el crecimiento y multiplicación de las bacterias in vitro, que puede encontrarse en estado sólido, semisólido o líquido.²³

q) Patógeno:

Microorganismo que daña a un huésped por invasión, lesión o porque producen sustancias tóxicas.

CAPÍTULO II

2.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1.1 Descripción de la realidad problemática

El uso de plantas medicinales con fines terapéuticos, algunas de ellas con efecto antibacteriano, estuvo siempre presente en diferentes culturas y en nuestros antepasados, los cuales nos han sido transmitidos de generación en generación, sin embargo la aparición de los antimicrobianos sintéticos, se han convertido en fármacos de uso frecuente ante tratamientos de diversas patologías infecciosas, en las últimas décadas su uso inapropiado y la automedicación han generado reacciones adversas; dando lugar a mutaciones bacterianas las cuales han creado resistencia hacia los antibióticos, llegando a ser un grave problema de salud pública.²⁵

Con respecto a la OPS/OMS (2018) manifiesta que “van surgiendo nuevas formas de resistencia a nivel mundial que ponen en emergencia el manejo terapéutico de enfermedades infecciosas.²⁵ Del mismo modo; el Ministerio de Salud (MINSA), resalta el hecho que los fármacos son inapropiadamente prescritos y dispensados, creando en la población la automedicación. Así mismo los datos estadísticos del INS (Instituto nacional del Perú), reporta que los factores que influyen, es esta práctica es de índole económico, desconocimiento de drogas alternas, a esto se suma la falta de ética del profesional del establecimiento farmacéutico incumpliendo en parte la normatividad vigente de nuestro país, otro factor es sin duda la incesante promoción comercial que lejos de educar conllevan al uso irresponsable de ciertos medicamentos.²⁵

En el presente estudio, busca atender una necesidad primaria de salud, como son las lesiones dérmicas, mediante la evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de una crema elaborada de la combinación de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanolico de *Thymus vulgaris* (tomillo) en microorganismos de interés

clínico como son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, para poder cubrir esta demanda con el uso de productos naturales, seguros y eficaces, además de ello tendría gran relevancia en la industria farmacéutica, un menor costo en de producción, aumentando las posibilidades de ser usada como un alternativo al tratamiento frente a microorganismos sin poner en riesgo la salud del público en general.^{23,25}

2.1.2 Antecedentes Teóricos

Antecedentes nacionales

Rodriguez A. (2018),²⁵ en su trabajo de investigación titulada “**Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) sobre cepa de *Streptococcus mutans*”** Trujillo-Peru. El objetivo fue realizar un estudio experimental *in vitro* para determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial del clavo de olor, en cultivo puros de *Streptococcus mutans* sp. ATCC®25175. Para ello utilizó la metodología de difusión en agar, el procedimiento de la manipulación de cepas, se desarrolló siguiendo las normas técnicas establecidas, el aceite esencial a diferentes concentraciones como: 10,15, 25, 50 y 100%, una vez realizada la siembra, se incubo por 24 horas a 37°C. Los resultados obtenidos muestran promedios en los halos de inhibición correspondiente de 3.63 ± 1.41 mm; 8.36 ± 1.59 mm; 16.25 ± 3.41 mm; 27.5 ± 4.84 mm; 62.13 ± 2.10 mm; respectivamente. Se concluyó que el nivel de significancia es p= 0.000 la cual es menor a p<0.05, con lo que se demuestra que existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones, la actividad antibacteriana posiblemente se deba a la presencia de compuestos fenólicos que actúan a nivel de proteínas y fosfolípidos de la membrana celular de la bacteria produciendo muerte del microorganismo.

Montero-Recalde M. et al. (2018)²⁹ en el trabajo de investigación titulada “**Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*”** Lima- Peru. El

estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) para ello se evaluaron concentraciones al 1, 5, 10, 30, 50, 70 y 90% diluidas en etanol al 96.8%, además se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo. El inóculo bacteriano se estandarizó al 0.5 de la escala de MacFarland en espectrofotómetro, al ser sembrado en agar Mueller-Hinton determinó la Concentración Bactericida Mínima (CBM). Los resultados indican que los tratamientos al 5 y 10% no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) con valores de halos de inhibición de 15.35 mm y 15.9 mm, respectivamente, en comparación al 1% que presentó 12.2 mm de halo de inhibición, se concluye que el aceite tiene eficacia antibacteriana a altas concentraciones como al 10%.

Alba G. et al. (2014)²⁸, en la tesis titulada: “**Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *schinus molle l. (molle)* en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones.**” Lima-Perú. Se evaluó la actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Schinus molle L.* (Molle), en diferentes concentraciones en heridas infectadas, se utilizaron 40 ratones albinos, a los que se les depiló el lomo, después realizaron dos incisiones sobre el lomo. Inicialmente, se les colocó tópicamente la base de la pomada a un grupo de vacuno dos veces por día por siete días, construida en 100% por vaselina, como grupo control. Así mismo otros tres grupos se les aplicó la pomada con tres niveles de concentración 1.75, 2.0 y 3.0%, respectivamente; al cuarto grupo (+) se le colocó el producto comercial, luego se evaluó las lesiones, mediante la fuerza o tensión en gramos abriendo la herida cicatrizada, la otra incisión se conservó en formol al 10% para un análisis histopatológico. El resultado se observó que el producto natural del *Schinus molle L* contenía propiedades cicatrizantes, los realizados en ratones de cepa Balb C 53, confirmaron la experiencia siendo la concentración al 2% que presentó mayor efecto cicatrizante.

Antecedentes internacionales:

Ortega Lozano A. (2018)²⁷ en su investigación titulada " **Determinar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y oregano (*Origanum vulgare*) frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 12600**, Cuenca- Ecuador. Su objetivo fue determinar el efecto antimicrobiano de ambos aceites esenciales *in vitro* frente a bacterias de interés clínico, además de ello se realizó el análisis físico-químico. La metodología para actividad antimicrobiana fue la sensibilidad en disco de difusión, donde se utilizaron concentraciones de 10,25,50,75 y 100%. Los resultados que mayor efecto tuvo fue la concentración al 100% para ambos aceites y como control positivo se usó la vancomicina, se concluye que los aceites esenciales tienen actividad antibacteriana posiblemente se deba a los componentes químicos contenidos como los flavonoides.

Torres-Aguirre, G.A. et al (2018)³⁷, Realizaron un estudio donde " **Optimización de la extracción e identificación de compuestos polifenólicos y flavonoides** en anís (*Pimpinella anisum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) mediante HPLC- EM., Mediante el estudio se desea realizar la determinación de la presencia de los compuestos polifenólicos y flavonoides presentes en el anís (*Pimpinella anisum* L.), y clavo (*Syzygium aromaticum*). Para ello, se tuvo de estandarizar el método de extracción, haciendo variaciones en el sólido-disolvente y el tiempo de ultra-sonicación, se calculó el rendimiento, se cuantificaron los compuestos polifenólicos y flavonoides solubles totales. Determinándose que el clavo de olor fue la especia con mayor contenido de polifenoles solubles, flavonoides, con valores de altos en comparación con las otras muestras, así mismo se realizó un perfil de los extractos que mostraron el mayor contenido de polifenoles por medio de HPLC/MS. Se identificaron tentativamente, el ácido clorogénico, ferúlico y sinápico en el anís; quercetín-3-rutinósido (rutina), mientras que en el clavo de olor se pudo identificar el ácido gálico, clorogénico y elágico.

Pastrana-Puche (2017)¹⁵, en su investigación titulada **“Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos”** **Córdova- Colombia**, En el estudio realizado se enfoca a la importancia de productos naturales con características antimicrobianas y su uso en la industria alimenticia. El objetivo fue estudiar el efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre los patógenos comunes como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, el Método usado es de difusión en agar, Los resultados de los extractos de canela y clavo estudiados, no provocaron ningún efecto sobre *Salmonella* spp, mientras que, en sus concentraciones más elevadas (100 y 150 mg/mL), si mostraron un efecto positivo en *E. coli* y *S. aureus*, clasificándose como sensibles. En la metodología de diluciones dobles en caldo, se determinó que el *S. aureus* ATCC® 29213TM la CMI y la CMB fueron 512 µg/mL y 4096 µg/mL respectivamente y para *Escherichia coli* O157:H7 la CMI y la CMB fueron 2048 µg/mL y 4096 µg/mL.

Díaz Ortiz (2016)¹⁷ es tu investigación titulada **“Efecto inhibidor del aceite esencial de clavo de olor “*Syzygium aromaticum*” como agente antimicrobiano, sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Estudio in vitro”** Quito-Ecuador. Su objetivo fue demostrar mediante pruebas de laboratorio, para ello utilizó la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 35668, que se sembró en cada caja Petri y colocó discos de papel filtro embebidos de aceite esencial de clavo de olor a diferentes concentraciones como los son al 25, 50, 75 y 100%. luego se incubó a 35°C por 24 horas. Los resultados, fueron mediante la lectura de los halos de inhibición que alcanzaron un máximo de 22 mm de diámetro, medida muy buena para ser de origen natural. Es así como se comprobó que el aceite esencial de clavo de olor si inhibe a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 35668. A nivel celular se explica este fenómeno de ésta forma, el aceite esencial de clavo de olor contiene compuestos fenólicos que actúan a nivel de proteínas y fosfolípidos de la membrana celular es por eso que producen la muerte del microorganismo.

Saleh Hosseinzadeh, et al, (2015)¹⁰, realizaron un estudio titulado **“The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: *Thymus vulgaris*”** Behbahan - Iran. Su objetivo es la demostrar la aplicación de las plantas medicinales con la medicina moderna, donde resalta la planta medicinal muy utilizada en la industria alimentaria y farmacéutica. Entre las diferentes especies de *Thymus vulgaris* se usa más que otras especies en formas de dosificación terapéutica. En medicina tradicional, la mayoría de las personas cultivan *T. vulgaris* en muchos países, especialmente en áreas rurales, se han realizado reportes científicos que esta especie de hierbas medicinales para tratar muchas enfermedades, incluyendo enfermedades relacionadas con la inflamación, tales como reumatismo, hinchazón muscular, picaduras de insectos, dolores, etc. También la medicina moderna se ha podido identificar varios componentes químicos, el aceite esencial de tomillo ha demostrado que los compuestos tienen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas, pudiéndose encontrar diferentes metabolitos secundarios responsables de estos efectos beneficiosos, así mismo debemos considerar el pasado y el valor presente de las plantas medicinales, como el *Thymus vulgaris* (tomillo) , se utiliza en los estilos tradicional y moderno.

Marroquín C (2015)¹⁸, En su trabajo de investigación titulada **”Evaluación del efecto bactericida in vitro del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) en bacterias comúnmente aisladas en cavidad oral de perros”** Guatemala, su objetivo fue comprobar el efecto bactericida del aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) sobre las bacterias comúnmente aisladas mediante hisopados de la cavidad oral en 10 perros que llegaron a jornadas de castración, se sembraron en diferentes medios de cultivo con la finalidad de identificar, seleccionar y purificar las colonias bacterianas más comunes y evaluar el efecto bactericida. Las bacterias de interés fueron: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus sp.*, *Neisseria sp.* Y *Streptococcus sp.* *Pasteurella multocida*. Utilizando el método de discos de

difusión, se determinó que el aceite de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) no fue efectivo contra *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus sp.*, *Neisseria sp.* y *Streptococcus sp.* en las distintas concentraciones de 10µg/ml, 20µg/ml y 30µg/ml. La única bacteria sensible fue *Pasteurella multocida*. La actividad antimicrobiana del aceite esencial se atribuye al eugenol, compuesto fenólico que, en altas concentraciones, tiene la capacidad de degenerar las proteínas bacterianas.

Verastegui S. J. (2014)³⁸ Su estudio está enfocado en buscar el efecto antibacteriano para inhibir el crecimiento de los microorganismos *Escherichia coli* y *Candida albicans*. se realizaron varias metodologías para poder obtener los extractos de 6 especies vegetales. Las metodologías de extracción emplearon solventes de diferente polaridad tales como: agua, etanol y hexano. Las plantas medicinales estudiadas fueron: hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), matico (*Aristeguietia glutinosa*), ortiga negra (*Urtica dioica*), tomillo (*Thymus vulgaris*). Los extractos que demostraron los mejores porcentajes de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* fueron la maceración en etanol de tomillo, con una media del 100% de inhibición del crecimiento; el macerado en etanol de paico, con una media del 100% de inhibición; del tomillo, con una media del 75% de inhibición y, para la inhibición de *Candida albicans* con una media del 100% de inhibición; el macerado en etanol de tomillo, con una media del 100% de inhibición; maceración en etanol de matico, con una media del 75% de inhibición. En el caso del extracto etanólico de paico este demostró que inhibe en un 100% el crecimiento de *Escherichia coli* a una concentración de 2500 mg/l. En cambio, el extracto etanólico de tomillo inhibe el crecimiento de la bacteria a una concentración de 5000 mg/l. Para la levadura el extracto etanólico de paico y el extracto etanólico de tomillo demostraron que inhiben el crecimiento de la levadura a una concentración de 2500 mg/l. Finalmente el análisis fitoquímico determinó que las hojas de paico y tomillo contienen metabolitos secundarios tales como: aceites esenciales, taninos, flavonoides y triterpenos, esteroides, alcaloides (paico) y saponinas (tomillo).

Hamzeh Amiri, (2012)¹³, Essential Oils Composition and Antioxidant Properties of Three Thymus Species.

El objetivo del estudio fue determinar la composición y propiedad antioxidante de tres especies de *Thymus*, El aceite se obtuvieron por hidrodestilación y se analizaron por cromatografía de gases(GC) y cromatografía de gases por espectrometría de masas (GC-MS). En condiciones óptimas de extracción y análisis, se identificaron 44, 38 y 38 constituyentes (principalmente compuestos de monoterpenos) en *T. kotschyanus* Boiss. y Hohen, *T. eriocalyx* (Ronniger) Jalas, y *T. daenensis* subsp *lancifolius* (Celak) Jalas, que representaron el 89.9%, 99.7% y 95.8% de los aceites, respectivamente. Los constituyentes principales fueron el timol (16,4–42,6%), el carvacrol (7,6–52,3%) y el γ -terpineno (3–11,4%). La actividad antioxidante se empleó mediante dos sistemas de prueba complementarios, a saber, los sistemas de eliminación de radicales libres 2,2-difenil-1-picrililhidracilo (DPPH) y los sistemas de ácido β -caroteno / linoleico. La actividad antioxidante de la subfracción polar de *T. daenensis* subsp *lancifolius* (Celak) Jalas se encontró que era mayor que la de los otros en el ensayo DPPH, mientras que la subfracción no polar de *T. eriocalyx* (Ronniger) Jalas tiene la mayor actividad antioxidante en el β -caroteno / linoleico prueba ácida ($\mu\text{g} / \text{mL}$ y% de inhibición).

Solís Campoverde N. (2011)¹² En su investigación titulada “**Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo**” Chimborazo-Ecuador. Su objetivo fue evaluar el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de orégano y tomillo como conservantes naturales, con el propósito de reducir la carga microbiana durante el almacenamiento de productos alimenticios, dicho estudio es inductivo-deductivos y científico-experimentales. Los microorganismos de ensayo fueron *Samonella spp* y microorganismos proteolíticos; se aplicaron pruebas de Screening, Concentración Mínima Bactericida “in vivo” y tiempo de muerte “in vitro” e “in situ”. Se determinó actividad antimicrobiana con

concentraciones al 100%. En el tiempo de muerte se determinó la eficacia de la actividad antibacteriana del aceite de tomillo con reducción significativa de *Salmonella* spp. Los ensayos “in situ” mostraron que el aceite esencial de tomillo en el almacenamiento de carne de pollo 4°C hasta 48 horas, fue el tratamiento más efectivo para reducir la contaminación bacteriana logrando dar un producto de mejor calidad y libre de contaminación. Por lo que se recomienda el uso de los aceites esenciales en carne de pollo como una alternativa natural a los antibacterianos sintéticos.

2.1.3 Definición del Problema

Problema general:

¿De qué manera la crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de ***Syzygium aromaticum*** (clavo de olor) y extracto etanólico de ***Thymus vulgaris*** L.(tomillo) tiene actividad antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y ?

Problemas específicos:

1. ¿Qué tipos de metabolitos secundarios se pueden encontrar en mayor cantidad en el aceite esencial de ***Syzygium aromaticum*** (clavo de olor) y extracto etanólico de ***Thymus vulgaris*** (tomillo)?
2. ¿Cuál será la concentración óptima de la crema elaborada de la combinación del aceite esencial de ***Syzygium aromaticum*** (clavo de olor) y extracto etanólico de ***Thymus vulgaris*** (tomillo) con mayor actividad antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*?
3. ¿De qué manera el uso tópico de la crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de ***Syzygium aromaticum*** (clavo de olor) y

extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo) puede producir irritabilidad en la piel?

2.2 Finalidad y Objetivos de la Investigación

2.2.1 Finalidad

La finalidad de la investigación es poner al alcance de la población en general el uso de la crema antimicrobiana natural, elaborada a base de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* L. para la evaluación de su eficacia y seguridad se ha sometido a pruebas de investigación *in vitro* frente a microorganismos de interés clínico, así mismo determinar la concentración necesaria para su actividad local de uso tópico.

2.2.2 Objetivo General y Específicos

Objetivos generales:

Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de la elaboración de una crema a base de la combinación de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* L. (tomillo) frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*

Objetivos específicos

1. Identificar qué tipos de metabolitos secundarios se pueden encontrar en mayor cantidad en el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo).
2. Determinar la concentración óptima de la crema elaborada de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo) con mayor actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*.
3. Comprobar si el uso tópico de la crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo) puede producir irritabilidad cutánea.

2.2.3 Delimitación del estudio

La investigación se limitó a la evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de la elaboración de una crema a base de la combinación de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* en cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* para la cual se empleó 2 kilos de clavo de olor y 1 kilos de *Thymus vulgaris* L.(tomillo), provenientes de la ciudad de Cuzco, los cuales fueron recolectados y seleccionados de acuerdo a Procedimientos estandarizados. El estudio de la Marcha Fitoquímica y el procedimiento *in vitro* para evaluar la actividad antimicrobiana se realizaron en los ambientes del Laboratorio de Especialidad de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UIGV, ubicada en Av. Bolívar N°165 Pueblo Libre, en Lima Metropolitana en los meses de octubre a diciembre del año en curso. Así mismo los materiales y reactivos empleados estuvieron a cargo del investigador.

2.2.4 Justificación e Importancia del Estudio

En la actualidad la utilización las plantas medicinales con fines terapéuticos y sobre todo con actividad antimicrobiana, en la población peruana está aumentando, gracias a las investigaciones e importancia que se están descubriendo mediante la aplicación de la ciencia ^{2,3}, por cuales se vienen demostrando la baja o ausencia de efectos secundarios en los pacientes que lo usan, tanto en niños como en ancianos, así mismo la aplicación en pacientes de importancia clínica (inmunos suprimidos, embarazadas, etc.), de tal manera disminuir el uso de medicamentos sintéticos, entre ellos los antibióticos que su uso inapropiado, como la automedicación, han creado un problema de salud pública, como consecuencia la resistencia a diferentes antibióticos, esto nos motiva a proponer el uso de sustancias accesibles naturales para aliviar las afecciones de tipo bacteriano.²⁵

La OMS 2018²⁵, hace referencia a ciertas infecciones que son resistentes a algunos antibióticos, por tal motivo han desarrollado estrategias sobre la aplicación de Medicina Tradicional para combatir algunas dolencias o malestares^{1,2}, del mismo modo algunos aceites esenciales tienen propiedades antimicrobianas frente *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, los cuales son responsables de diferentes infecciones nosocomiales, afectando en gran parte a poblaciones vulnerables con son los niños y ancianos. entre otras, considerándose como un problema de salud.⁵

La investigación toma en consideración una realidad de salud pública que conlleva a la resistencia hacia algunos antibioticos sintéticos, por esa razón el uso de las propiedades del *Thymus vulgaris L.*(tomillo) y de *Syzygium aromaticum* se presenta como un tratamiento natural para tratar infecciones producidas por diferentes microorganismos^{11,12,17}; así mismo incentivar su aplicación en los centros de salud que no cuenta con la cantidad de medicamentos necesarios para cubrir las demanda de la población, sobre todo en aquellas postas de salud que se encuentran alejadas de nuestro territorio donde la disponibilidad de los recursos terapéuticos son limitados. Además de ello, debemos estar a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas naturales donde los beneficiarios de esta investigación será la población de escasos recursos económicos de la ciudad de Lima y del interior del país.²¹

2.3 Hipótesis

2.3.1 Hipótesis General

La crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* L.(tomillo) tiene actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*, y *Staphylococcus aureus*.

2.3.2 Hipótesis específicos

1. Los metabolitos secundarios identificados en mayor cantidad en el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo), influyen significativamente en la actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25922™).

2. Las concentraciones usadas de la crema elaborada de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo) , influyen significativamente con mayor actividad antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

3. El uso tópico de la crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo) no influye significativamente en la irritabilidad cutánea.

2.3.3 Variables e indicadores

variable independiente

Crema antibacteriana elaborada a base de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* L.(tomillo).

variable dependiente

Actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Tabla N 2. Operación de Variables

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES
VARIABLE INDEPENDIENTE Crema antimicrobiana elaborada de la combinación del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> L.(tomillo).	Marcha Fitoquímica Método: Olga Lock	*Alcaloides *Triterpenos/esteroides *Carbohidratos *Flavonoides *Polifenoles *Saponinas *Compuestos fenólicos *Antocianinas
	Concentración de la crema	5%. 10%
VARIABLE DEPENDIENTE Actividad antimicrobiana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Candida albicans</i>	Cultivos Antimicrobianos Metodo: Kirby Bauer (Disco difusión en agar)	Diámetros de los halos de inhibición en mm Escala Duraffourd: *Nula (-) : diámetro inferior a 8mm *Sensible (+): diámetro entre 8 a 14 mm *Muy sensible (++) : diámetro entre 14 y 20 mm *Sumamente sensible (+++): diámetro superior a 20 mm
	Test de Irritabilidad cutánea Método de Finklestein modificado	Puntaje: efecto (-) : no irritante (+): Irritante leve (++) .Irritante Moderado (+++): Irritante (++++): fuertemente irritante

Fuente: Elaboración propia

CAPÍTULO III MÉTODO, TÉCNICA E INSTRUMENTOS

3.1. Población y Muestra

3.1.1 Población vegetal

- 12 plantas de *Thymus vulgaris* L.(tomillo), recolectadas en un área de 5 metros, ubicada en el distrito de Cañete entre las coordenadas geográficas 12°30' a 12°20' de latitud sur y 76° 30' a 75° 30' de latitud oeste.
- 2 kilos de *Syzygium aromaticum* Clavo de olor, adquiridas en el mercado de Cañete.

3.1.2 Población microbiana:

Cepas estandarizadas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* adquiridas comercialmente del laboratorio Genlab.

3.1.3 Muestra vegetal

3 kilos de hojas frescas de *Thymus vulgaris* L.(tomillo) y 1.5 kilos de *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), seleccionadas.

3.1.4 Muestra microbiana

Cepas: de *Escherichia coli*, (ATCC® 25922™) *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™)

y *Candida albicans* activadas en ambiente de laboratorio.

3.2. Diseños utilizados en el estudio

Explicativo: Porque se van a explicar los procedimientos que se utilizaron para el proceso de investigación.

Experimental: Ya que una o más variables fueron manipuladas para determinar el efecto sobre una variable dependiente.

In vitro: Porque se realizó en un ambiente controlado que se encuentra fuera de un organismo vivo, es decir en un medio artificial.

Transversal: Las variables se las analizó por una solo ocasión en un tiempo corto y una vez terminado el estudio no hubo seguimiento

3.3. Técnicas e instrumentos de Recolección de Datos

3.3.1 Técnica de recolección de datos

Se realizó una técnica de recolección de observación estructurada para prueba experimental *in vitro* realizado en el laboratorio en condiciones controladas, en vista que la investigación es de tipo prospectiva y experimental.

3.3.2. Instrumentos de recolección de datos

Los instrumentos usados para recolectar datos fueron fichas de observación, diseñadas para cumplir la hipótesis de la tesis. Estos instrumentos fueron revisados y evaluados mediante juicio de expertos, con el fin de garantizar los criterios de validez, precisión y confiabilidad.

Las fichas de observación son:

- Marcha fitoquímica
- Actividad antimicrobiana de la crema.
- Test de irritabilidad dérmica.

3.4. Procesamiento de la parte experimental

3.4.1 Materiales, reactivos y Equipos

a) Materiales

- Frasco ámbar
- Tubos de ensayo
- Hisopo estéril Marca: Puritan
- Medio de cultivo: Agar Mueller-Hinton
- Patrón de Mac Farland
- Espátula
- Papel kraft
- Bandeja de acero inoxidable
- Bandeja de pyrex
- Soporte universal
- Beaker 500 ml
- Embudo de vidrio
- Papel filtro
- Algodón hidrófilo lt. 104020029 vcto. 04-2024
- Placas Petri
- Gradillas

b) Reactivos

- Reactivo de gelatina
- Reactivo de Rosenheim
- Reactivo de Benedict
- Reactivo de Sonneschein
- Reactivo Mayer
- Reactivo Wagner
- Reactivo de tricloruro Férrico
- Reactivo de Dragendorf
- Reactivo de Shinoda
- Reactivo de Ninhidrina

- Reactivo de Lieberman - Burchard
- Reactivo de Fehling A
- Reacción de Bortranger Hidróxido de sodio al 5%)
- Reactivo de Generación de espuma
- Propanol QP
- Benceno QP
- Cloroformo QP
- Metanol QP
- Alcohol etílico: rectificado de 96° laboratorio Alkofarma
Lt.: R1080869 vcto. : 08-2024
- Agua destilada: Laboratorio Braun Medical Perú S.A.
Lt.: 10535629 vcto.: 06 -05-2022
- Sensi -Disc Ciprofloxacín : Becfan Dckinson
LT.: 8151852 vcto.: 30-06-2021
- Blank – Discs LT.: 032519082 vcto.: 23-03-2023

c) Equipos e instrumentos

- Balanza digital Marca: sf-400
- Balanza analítica Marca: Sartorio Modelo: Practum 224-1\$
- Estufa Memmert Modelo tv 100 serie a-1940722
- Incubadora Binder Modelo: BD23
- Pipeta automática Marca: Accumax Pro
- Mechero bunsen

3.5 Procedimiento Experimental

3.5.1 Obtención de la muestra vegetal

Se recolectaron aproximadamente 4 kilos de hojas frescas, enteras e integras de varias plantas de la *Thymus vulgaris* L.(tomillo), siguiendo los criterios de selección, en un área de 5 metros, ubicada en el distrito de Cañete entre las

coordenadas geográficas 12°30' a 12°20' de latitud sur y 76° 30' a 75° 30' de latitud oeste.

La muestra recolectada se envolvió con papel kraft y se embalo en una bolsa porosa para facilitar el flujo de aire.

Selección de la muestra vegetal

- Criterios de inclusión:
 - Se consideró las hojas enteras.
 - Se consideró las hojas sin alteración en la coloración.
- Criterios de exclusión:
 - Se rechazó las hojas secas.
 - Se rechazó las hojas agrietadas o rotas.
 - Se rechazó las hojas con alteración en la coloración.
 - Se rechazó las hojas con daños por causa de plagas.

Secado de la muestra

Posteriormente de la selección y limpieza se procedió a colocar en la estufa 1 kg de hojas frescas de *Thymus vulgaris* L.(tomillo) a una temperatura de 40° C hasta su total deshidratación.

Preparación del macerado etanólico

Para la preparación se procedió de acuerdo a los estándares de maceración, se colocaron en un frasco de boca ancha de capacidad aproximadamente de un litro de color ámbar, la muestra vegetal seca y reducida tuvo un peso total de 580 gramos, el cual se incorporó al frasco junto con 1,000 ml de alcohol etanólico rectificado de 96° para su almacenamiento por 7 días, Durante la maceración se tomaron varias consideraciones por ejemplo agitar 3 veces por día y mantener en un lugar fresco.

3.5.2 Marcha Fitoquímica

Para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto seco de *Thymus vulgaris* L.(tomillo), se diluyeron 50 mg del extracto en 50ml etanol hasta obtener una mezcla homogénea, luego se vertió 1 ml de la disolución preparada en tubos de ensayo número y se añadió 1 ml de los reactivos químicos propios para la identificación de cada metabolito secundario, esta prueba química muestran reacciones cualitativas en forma de precipitado y cambios de coloración. Según sea el caso a la reacción se le asigna un valor que va de ausencia (-) a bastante con una calificación de 3+.

TABLA N 3. Marcha Fitoquímica

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVO	REACCION POSITIVA
Alcaloides	Dragendorff	La presencia de una coloración rojo ladrillo
	Mayer	La formación de un precipitado blanco
	Wagner	La presencia de un precipitado marrón
Triterpenos y Esteroides	Lieberman – Burchard	La presencia de una coloración naranja hasta rojo.
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	La presencia de una coloración verde grisácea.
Taninos	Gelatina	La presencia de una turbidez o precipitado.
Azúcares Reductores	Fehling	La formación de un precipitado de color rojo, anaranjado.
	Benedict	La presencia de una coloración rojo ladrillo.
Flavonoides	Shinoda	La presencia de una coloración rosada tenue hasta guinda.
Leucoantocianidinas	Rosenheim	La presencia de una coloración carmesí hasta rosa palido
Antraquinonas	Borntrager	La presencia de una fase acuosa rojiza , o amarilla con fluorescencia roja

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

Ausencia: (-)

Poco: (+)

Regular: (++)

Bastante: (+++)

3.5.3 Ensayo Antibacteriano:

Para determinar de la actividad antibacteriana *in vitro* de la crema elaborada de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* L.(tomillo) se utilizaron 4 grupos de estudio por cada microorganismo: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, mediante el Método de Difusión en agar con perforaciones (Kirby Bauer).

TABLA N 4: Grupos de estudio para el ensayo microbiológico

N° DE Ensayos	Diámetros de los halos de inhibición (mm)				Control (+) crema comercial	Control (-)
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> ,			
	5%	10%	5%	10%		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
Promedio						
DS						

a. Obtención y activación de las cepas bacterianas.

La adquisición de las cepas *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™) se compraron en el laboratorio GenLab.

La activación de las cepas bacterianas se realizó en el ambiente de laboratorio de microbiología para ello se utilizaron placas de agar sangre que fueron incubadas a 37° C por 24 horas.

b. Preparación del inóculo bacteriano

Para ello se aislaron colonias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de la placa sembrada previamente, con la ayuda de una asa de kolle, se tomaron 3 a 5 cepas y colocadas en un tubo con 5 cm de suero fisiológico, ajustando el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de Mac Farland (1×10^8 UFC/mL) en suero fisiológico estéril al 0.9%. Agitando suavemente durante 15-20 segundos.

c. Preparación del Agar Müller - Hinton

Para su preparación del agar se procedió de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial del medio de cultivo que viene en descrito en el frasco, se disolvió el agar base en agua destilada 8.5 gramos en 200 ml de agua hasta obtener una mezcla homogénea con un PH entre 7.2 – 7.4, luego se autoclavó a 121°C por 15 minutos, para su posterior vertido a una temperatura de 50grados en placas Petri estériles.

d. Preparación de las concentraciones de la crema vegetal

La crema antimicrobiana tiene una concentración al 10% (10 gramo del extracto seco de *Thymus vulgaris* L.(tomillo) en 90 ml en la crema base),

- En un tubo de ensayo colocar 5 ml de la crema vegetal que tiene una concentración al 10%.
- En un tubo de ensayo se agregó 5.0ml de la crema vegetal y se diluyo con 5.0ml de agua destilada, esta dilución corresponde al 5%.

e. Inoculación bacteriano en las placas (sembrado)

Para la realización de este procedimiento se tiene que seguir las normas de Bioseguridad ya que las manipulaciones de cepas bacterianas son altamente contaminantes.

- El sembrado se realiza en placas de agar Mueller-Hinton, previamente estas han sido sembradas con el inóculo bacteriano a

una concentración equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland (1 x 10⁸ UFC/mL).

- Realizar 4 perforaciones por cada placa con la ayuda de un sacabocado. Se usaron 8 placas por cada grupo de estudio.
- Colocar las muestras preparadas al 5% y 10%, control positivo (crema antimicrobiana comercial Niofen) y control negativo (agua destilada).
- Colocar en la incubadora a 37 grado por 24 horas.

h. Lectura e interpretación de los halos de inhibición

Trascurrido el tiempo de incubación, con ayuda de un vernier se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición.

Los halos de inhibición se forman alrededor de las muestras en estudio, estos resultados se registran en la ficha de observación de recolección de datos. La lectura e interpretación se determinó en función al resultado del diámetro de inhibición según la escala de Duraffourd y Lapraz (1983): nula si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (sensible = +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S = +++) si fue igual o superior a 20 mm.

Tabla N. 5. Escala interpretativa Duraffourd y Lapraz (1983)

Escala	Diámetros de halos de inhibición
Nula (-)	Inferior a 8 mm
Sensible (+)	Entre 8 a 14 mm
Muy sensible (++)	Entre 14 y 20 mm
Sumamente sensible (+++)	Superior a 20 mm

Fuente: Duraffourd y Lapraz (1983)

3.5.4 Obtención del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor).

Se utilizó el método por arrastre de vapor, consiste en llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa del material vegetal que en es el clavo de olor, de tal manera, que los vapores generados puedan ser condensados y colectados y se deben guardar en un frasco ámbar y asegurar tapar bien el frasco para evitar evaporaciones, perdida, o ingreso de la luz.

En esta técnica el vapor, el envase o balón que contiene el agua es colocada en una manta de calefacción hasta ebullición, proveniente de un generador, se hace llegar hasta el recipiente que contiene la planta, de donde arrastra los componentes volátiles que luego se condensan al pasan por el refrigerante obteniéndose así una mezcla de agua y aceite, de la cual es recolectada y llevada a una pera de decantación, el aceite esencial se separa fácilmente por simple densidad de líquidos.

3.5.5 Preparación de la crema base para un volumen total de 100ml.

1) Se lleva a calentar en una cocinilla un beaker los siguientes productos para formar la fase Oleosa:

- Alcohol cetilico 1,5 gramos.
- Acido esteárico 3,0 gramos
- Lanette 6,0 gramos
- Cetiol 6.0 gramos

Mezclar bien con la ayuda de una bageta, hasta obtener una masa homogena, una vez disuelto agregar 10 gramos de la muestra vegetal de *Thymus vulgaris* L.(tomillo) y 1ml de aceite del *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor),luego agregar la fase acuosa: Metil parabeno

1.5 gramos

- Propil parabeno 0.05 gramos
- Agua destilada cantidad suficiente para completar a 100ml.

Mezclar bien y envasar en frascos estériles para su almacenamiento.

Tabla N.6: Test de irritabilidad Método de Finklestein modificado

Escala semicuantitativa para de la prueba de Sensibilidad cutánea

Puntaje	Efecto
0	No irritante
+	Irritante leve
++	Irritante Moderado
+++	Irritante
++++	Muy Irritante

Fuente: Red de laboratorio de control de calidad 1999 (Perú)

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

4.1. Presentación de Resultados

Para determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de la crema elaborada de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris L.* (tomillo) frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se realizaron varias pruebas en el laboratorio, como la marcha fitoquímica, para identificar los metabolitos presentes en la muestra. Así mismo se realizó la prueba de la sensibilidad bacteriana de la crema, donde se trabajó con 4 grupos de estudio por cada bacteria: *Escherichia coli*, (ATCC® 25922™) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™), 2 grupos para evaluar la concentración de la crema al 5 y 10% y los otros 2 grupos, como controles: positivo y negativo. Para la interpretación de los resultados de los halos de inhibición de los cultivos se empleó la escala de Duraffourd y Lapraz.

Tabla N. 6 Resultados del Test de irritabilidad cutánea observadas en 12 y 24 horas

Test de Irritabilidad cutánea: Método de Finklestein modificado				
Ensayos en el tiempo	Conejo albino N1		Conejo albino N2	
	Crema Concentración 5%	Crema concentración 10%	Crema concentración 5%	Crema concentración 10%
Inicio	0	0	0	0
12 horas	0	0	0	0
24 horas	0	0	0	0
Promedio	0	0	0	0
DS	0	0	0	0

Leyenda:

- 0 No irritante
- + Irritante leve
- ++ Irritante Moderado
- +++ Irritante
- ++++ Muy Irritante

4.1.1 Resultados de marcha fitoquímica (Método Olga Lock)

Tabla N. 7: Resultados de los metabolitos secundarios encontrados en el extracto de *Thymus vulgaris* L.(tomillo) y del aceite esencial del *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor),

METABOLITOS	REACTIVOS	REACCION POSITIVA	Extracto etanólico del Tomillo	Aceite esencial del clavo de olor
CARBOHIDRATOS	(Molish)	Anillo violeta	-	++
	Fehling	Coloración rojo ladrillo	-	++
COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	Coloración verde o azul	+++	++
TANINOS	Gelatina	Precipitado denso blanco	-	-
FLAVONOIDES	Reactivo de Shinoda	Amarillo rojizo: Isoflavanonas	++	++
ANTOCIANINAS	Rosemheim	Coloración rojo oscuro	-	-
AMINOÁCIDOS LIBRE	Ninhidrina	Coloración violácea	-	-
ALCALOIDES	Dragendorfff	Precipitado naranja	+++	++
	Mayer	Precipitado blanco	+++	+
	Wagner	Precipitado marron	+	+
	Sonnenschein	Precipitado amarillo	+++	+
QUINONAS	Borntrager	Coloracion rojizo	++	+
TRITERPENOIDES y TERPENOS	Burchard Liberman	Rojo-naranja:Triterpenoides	+++	+++
SAPONINAS	Agua destilada	"Formación de 0.5 a 1 cm de espuma estable por 15 min"	++	++

Fuente: Elaboración propia

- Leyenda:
- (+++): Mayor cantidad
 - (++): mediana cantidad
 - (+): baja cantidad
 - (-): Ausencia

INTERPRETACIÓN

En la tabla N 7 se observan los resultados de la Marcha Fitoquímica:

El extracto de etanólico al 70% de *Thymus vulgaris* L.(tomillo), presentan metabolitos secundarios en mayor cantidad (+++) en los siguientes: Compuestos Fenólicos, Alcaloides, Triterpenos; en regular cantidad (++) en Flavonoides, Quinonas, Glicósidos y saponinas esteroidales; ausencia (-) para los carbohidratos, taninos y antocianinas.

Para el aceite esencial del *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), los metabolitos encontrados en mayor cantidad (+++) fueron, Triterpenos esteroidales; en regular cantidad (++) Carbohidratos, Compuestos Fenólicos, Flavonoides y Saponinas; baja cantidad (+) Alcaloides, y quinonas; ausencia (-) a Taninos y Antocianinas,

Según **Rodríguez A. (2018)**,²⁵ en su estudio mencionan que: El extracto etanólico de *Thymus vulgaris* presenta metabolitos secundarios; Conteniendo abundante cantidad de saponinas y carbohidratos, regular cantidad de alcaloides, poca cantidad de taninos, flavonoides y ausencia de quinonas. Así mismo podemos resaltar la presencia de metabolitos secundarios en dicho estudio, al igual, que **Ortega A. (2018)**²⁷, menciona haber encontrado componentes en regular cantidad (++) como los Flavonoides y Compuestos fenólicos.

Con respecto a los metabolitos secundarios encontrados en el aceite esencial, **Marroquín C (2015)**¹⁸, es su trabajo de investigación encontró compuestos químicos como el eugenol y compuesto fenólico, que se les atribuye actividad antibacteriana que tiene la capacidad de degenerar las proteínas bacterianas.

Según **Torres-Aguirre, G. A. et al (2018)** ³⁷, en su estudio pudo determinar cuantitativamente el rendimiento de metabolitos secundarios, encontrándose los compuestos polifenólicos y flavonoides solubles totales, dicho estudio concuerda con los encontrados en el presente trabajo, cabe resaltar que el clavo de olor fue la especia con mayor contenido de polifenoles solubles.

Se concluye que la crema elaborada a base del extracto etanólico de *Thymus vulgaris* L.(tomillo) y aceite esencial del *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), Compuestos Fenólicos, Flavonoides, Triterpenos, alcaloides y saponinas.

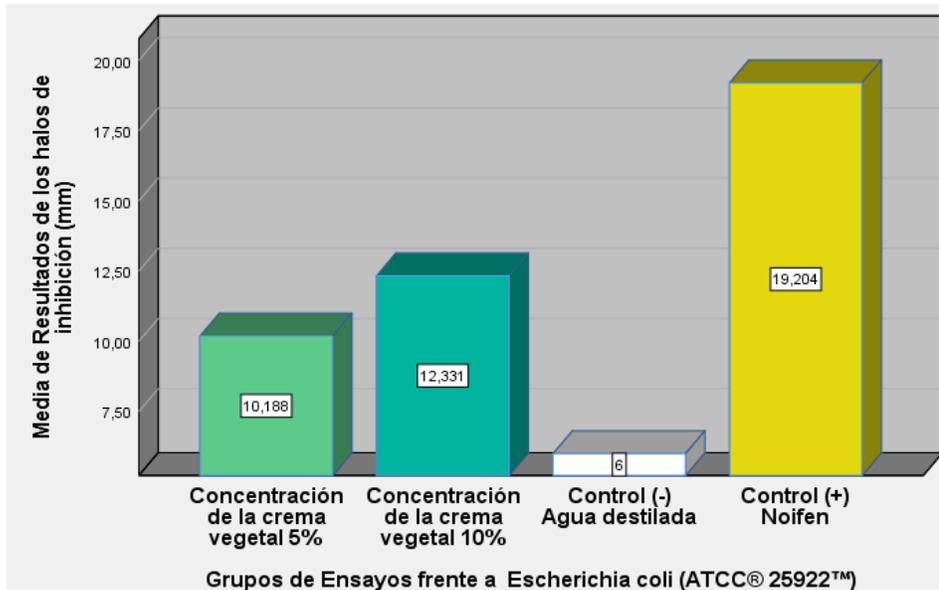


Figura N. 4: Resultado de las lecturas de los halos de inhibición de la actividad actividad antibacteriana *in vitro* de la crema frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™)

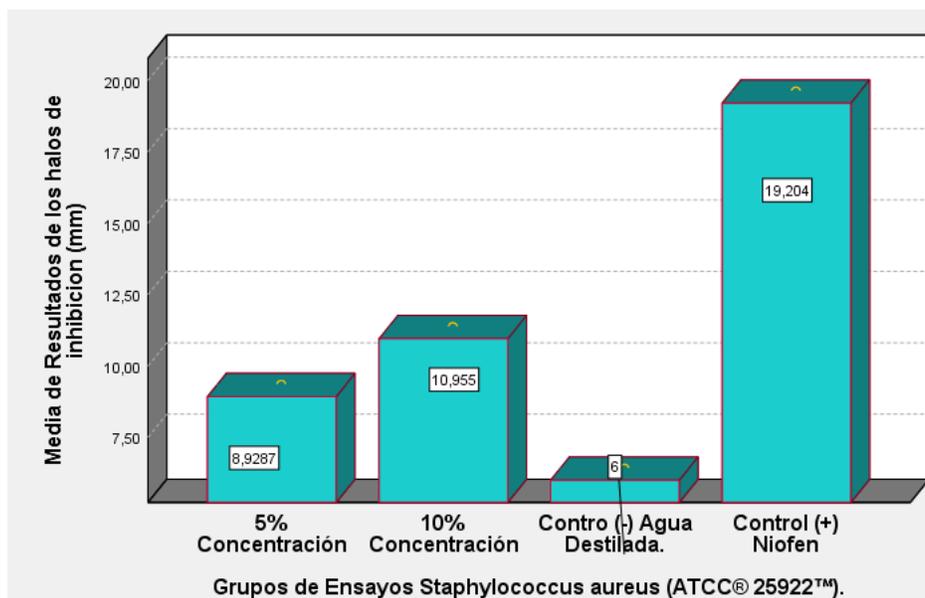


Figura N. 5: Resultado de las lecturas de los halos de inhibición de la actividad actividad antibacteriana *in vitro* de la crema frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™).

En la figura N 5, se encuentran los resultados de los halos de inhibición de los diferentes grupos utilizados para evaluar actividad antibacteriana *in vitro* de la crema frente a cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™), la concentración al 5 y 10% muestra una media de 8.92 y 10.95 mm respectivamente que se interpreta como Sensible (+). El control positivo 19.20mm como Muy sensible (++) por ser un producto comercialmente con propiedades antibacterianas, finalmente el control negativo 6.00mm, por contener agua destilada el resultado es nulo.

4.2. Contrastación de Hipótesis

Para contrastar las hipótesis de investigación se han desarrollado y procesado on los resultados de los halos de inhibición de la crema frente a las cepas en función a pruebas estadísticas. Durante el proceso experimental se trabajaron 4 grupos de estudio por cada cepa bacterianas, así mismo concentraciones al 5 y 10% para evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de la crema elaborada de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* L. (tomillo)., además de ello controles, positivo (Niofen) y control negativo (agua destilada), con 8 repeticiones por cada grupo, interpretando los resultados según la escala de Duraffourd y Lapraz.

El diseño estadístico que se empleó es el análisis de variancia (ANOVA) que permitió determinar que, si hay diferencias estadísticas significativas entre los promedios de los halos de inhibición de todos los grupos de estudio, con un intervalo de confianza al 95% y un sig. o valor $P < 0.05$.

4.2.1 Contrastación de hipótesis específica 1

H0: Los metabolitos secundarios identificados en el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo), No influyen significativamente en la actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™).

H1: Los metabolitos secundarios identificados en el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo),

influyen significativamente en la actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™).

Para la contratación de la hipótesis se realizó la marcha fitoquímica para identificar metabolitos secundarios en el extracto de *Thymus vulgaris* L.(tomillo) y del aceite esencial del *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), que estos influyan significativamente en la actividad antibacteriana.

En la Tabla N. 4 se puede observar los diferentes metabolitos secundarios presentes en aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo), algunos los metabolitos hallados en mayor cantidad (3+) en el tomillo son los compuestos fenólicos, alcaloides, saponinas. Así mismo se encontró en mediana cantidad (2+) de Quinonas y triptenoides, y baja cantida (1+) para los carbohidratos, con respecto al aceite esencial del clavo de olor se hallaron metabolitos en mayor cantidad (3+) en compuestos fenólicos, alcaloides, triterpenos y carbohidratos, del mismo modo en mediana cantidad (2+) en quinonas, flavonoides.

Los metabolitos secundarios identificados en el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo), influyen significativamente en la actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™).

Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H₀) y se acepta la hipótesis del Investigador (H₁).

4.2.2 Contratación de la hipótesis específica 2

H₀: Las concentraciones usadas de la crema elaborada de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo), No influyen significativamente con la actividad antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

H1: Las concentraciones usadas de la crema elaborada de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo), influyen significativamente con la actividad antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Para la contratación de la hipótesis se utilizó las pruebas paramétricas de comparación de medias, el estadístico ANOVA de un factor y DHS de TUKEY con el fin de establecer diferencias entre los grupos de estudio, así mismo, poder realizar las comparaciones en función a los promedios de los diámetros de halos de inhibición de la crema frente a las bacterias *Escherichia coli* (ATCC® 25922™) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™).

Tabla N.9: Estadístico Descriptivo de la actividad antibacteriana

Análisis Descriptivos de la actividad antibacteriana									
Resultados de los halos de inhibición (mm) de <i>Escherichia coli</i> (ATCC® 25922™) y <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 25922™).									
Grupos de estudio	N	Media	Desv.	95% del intervalo de confianza para la media		Media	Desv.	95% del intervalo de confianza para la media	
		<i>Escherichia coli</i>	Desviación <i>Escherichia coli</i>	Límite inferior	Límite superior	<i>Staphylococcus aureus</i>	Desviación <i>Staphylococcus aureus</i>	Límite inferior	Límite superior
Concentración de la crema vegetal 5%	8	10.19	0.793	9.52	10.85	8.93	0.437	8.56	9.29
Concentración de la crema vegetal 10%	8	12.33	0.792	11.67	12.99	10.96	0.771	10.31	11.60
Control (-) Agua destilada	8	6.00	0.000	6.00	6.00	6.00	0.000	6.00	6.00
Control (+) Noifen	8	19.20	2.713	16.94	21.47	19.20	2.714	16.94	21.47
Total	32	11.93	5.050	10.11	13.75	11.27	5.166	9.41	13.13

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N 9 se muestra las medias de los grupos usados para el estudio de la actividad antibacteriana de la crema vegetal en concentraciones al 5 y 10% con un halo de inhibición de 10.19 y 12.33 mm respectivamente frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), así mismo 8.93 y 10.96 mm para

Staphylococcus aureus (ATCC® 25923™), teniendo mayores resultados a la concentración del 10% en ambas bacterias.

Tabla N. 10: Análisis de varianza de un factor (ANOVA) de la actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922)

ANOVA					
Resultados de los halos de inhibición					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	730,17	3	243,38	112,91	,000
Dentro de grupos	60,35	28	2,15		
Total	790,51	31			

Fuente: Elaboración propia

Ho: Todos los grupos de análisis presentan igual diámetro de los halos de inhibición ($p > 0.05$).

H1: Todos o al menos uno de los grupos de análisis presentan diferentes diámetros de los halos de inhibición ($p < 0.05$).

En la prueba de ANOVA, la significancia es de 0.000, inferior al nivel de significancia 0.05; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (Ho).

Por tanto, se establece que existe diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos de estudios realizados, donde se observa la concentración al 10% un halo de inhibición mayor 12.33 mm, con una sensibilidad (++) , interpretado según la escala de Duraffourd y Lapraz. con antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922).

Tabla N. 11: Subconjuntos homogéneos, media frente a *Escherichia coli* (ATCC® 25922).

Duncan ^a	Grupos de Ensayos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
	Control (-) Agua destilada	8	6,00			
	Concentración de la crema vegetal 5%	8		10,18		
	Concentración de la crema vegetal 10%	8			12,33	
	Control (+) Noifen	8				19,20
	Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 8,000.

En esta tabla N.11 se observan los subconjuntos homogéneos de la actividad antibacteriana de la crema vegetal frente a de *Escherichia coli* (ATCC® 25922), para ello se usaron 8 repeticiones por cada grupo de estudio.

En el grupo 1 tenemos el Control (-) Agua destilada, el diámetro de los halos de inhibición (media) fue de 6.00 mm; este grupo no contiene ninguna sustancia. Se interpreta como nulo, en el segundo y tercer grupo tenemos la concentración de la crema vegetal 5% con un halo de inhibición de 10.18 mm y al 10% tenemos 12.33 mm, ambos valores se interpretan como sensible (++), de acuerdo a la escala de Duraffourd y Lapraz, el cuarto grupo corresponde al Control positivo (+), una crema comercial Niofen su diámetros de halos de inhibición (media)19.20 mm, ubicándose en la escala como sumamente sensible (+++); lo que significa que el *Escherichia coli* (ATCC® 25922), es sumamente sensible al medicamento comercial Niofen.

Tabla N. 12: Análisis de varianza de un factor (ANOVA) de la actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25922™).

ANOVA					
Resultados de los halos de inhibición					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	770,3	3	256,79	112,9	,000
Dentro de grupos	57,0	28	2,038		
Total	827,4	31			

Fuente: Elaboración propia

Ho: Todos los grupos de análisis presentan igual diámetro de los halos de inhibición ($p > 0.05$).

H1: Todos o al menos uno de los grupos de análisis presentan diferentes diámetros de los halos de inhibición ($p < 0.05$).

En la prueba de ANOVA, la significancia es de 0.000, inferior al nivel de significancia 0.05; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (Ho).

Por tanto, se establece que existe diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos de estudios realizados, donde se observa la concentración al 10% un halo de inhibición mayor 10.96 mm, con una sensibilidad 2+, interpretado según la escala de Duraffourd y Lapraz. con antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25922™).

Tabla N. 13: Subconjuntos homogéneos, media frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25922™).

	Grupos de Ensayos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan a	Control (-) Agua destilada	8	6,00			
	Concentración de la crema vegetal 5%	8		8,92		
	Concentración de la crema vegetal 10%	8			10, 95	
	Control (+) Noifen	8				19,20
	Sig.			1,000	1,000	1,000

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N.13 se observan los subconjuntos homogéneos de la actividad antibacteriana de la crema vegetal frente a de *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25922™), para ello se usaron 8 repeticiones por cada grupo de estudio.

En el grupo 1 tenemos el Control (-) Agua destilada, el diámetro de los halos de inhibición (media) fue de 6.00 mm; este grupo no contiene ninguna sustancia. Se interpreta como nulo, en el segundo y tercer grupo tenemos la concentración de la crema vegetal 5% con un halo de inhibición de 8.95 mm y al 10% tenemos 10.95 mm, ambos valores se interpretan como sensible (++), de acuerdo a la escala de Duraffourd y Lapraz, el cuarto grupo corresponde al Control positivo (+), una crema comercial Niofen su diámetros de halos de inhibición (media)19.20 mm, ubicándose en la escala como sumamente sensible (+++); lo que significa que la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25922™), es sensible al medicamento comercial Niofen.

4.2.3 Contrastación de la hipótesis específica 3

Ho: El uso tópico de la crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo) influye significativamente en la irritabilidad cutánea.

H1: El uso tópico de la crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo) no influye significativamente en la irritabilidad cutánea.

La prueba de irritabilidad cutánea, se realiza para el estudio de eficacia de la crema, la irritabilidad definido como una agresión a la piel, que se manifiesta con signos como eritema y edema a simple vista o macroscópicamente.

Para contrastar la hipótesis de llevo a cabo la prueba o test de irritabilidad cutánea usando el Método de Finklestein modificado, los valores, donde asigna puntaje de acuerdo al grado de irritabilidad que se presenta al aplicar la crema, para determinar el Test de irritabilidad cutánea se utilizó 2 conejo, de 280 gramos y 310 gramos, se siguió el procedimiento estándar para esta prueba, primero se cortó y afeitó el pelaje en 2 zonas de la parte del lomo del animal, posteriormente se colocó la crema y se cubrió con una gasa estéril evitando la así contaminación, también se usó la base de la crema como control negativo. Después de 24 horas se observan si presentan alguna reacción dérmica.

Los Test realizados muestran una piel intacta, sin ningún daño al tejido cutáneo, en ambas zonas donde se aplicó la crema antibacteriana vegetal.

Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (Ho) y se acepta la hipótesis alterna (H1), donde el uso tópico de la crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo) no produce irritabilidad cutánea.

4.3. Discusión de Resultados

1. Para la identificación de Metabolitos secundarios, se procedió de acuerdo a la metodología de **Lock O.**⁷ es una Técnica cualitativa, los valores son asignados en cruces de acuerdo a la intensidad del color o del precipitado cuando la reacción química se presenta. Así mismo se pudo identificar varios compuestos en el extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo), los Metabolitos secundarios encontrados en mayor cantidad (+++) son los siguientes: Compuestos Fenólicos, Alcaloides, Triterpenos; en regular cantidad (++) en Flavonoides, Quinonas, Glicósidos y saponinas esteroidales; ausencia (-) para los carbohidratos, taninos y antocianinas, al igual **Saleh Hosseinzadeh, et al, (2015)**¹⁰ donde desarrollaron un estudio utilizando las plantas medicinales como alternativa para el tratamiento, los metabolitos hallados fueron los compuesto fenólicos; estando de acuerdo con ello, con así mismo **Verastegui S. (2014)**³⁸ realizo varios tipos de extractos con el propósito de encontrar el mejor método de rendimiento, los metabolitos secundarios encontrados fueron Taninos, Flavonoides y Triterpenos, esteroides, Alcaloides y Saponinas, sin embargo este estudio difiere con los Taninos, dando ausente para el presente estudio. Según **Rodriguez A. (2018)**²⁵, en su estudio mencionan que el extracto etanólito de *Thymus vulgaris* Conteniendo abundante cantidad de saponinas y carbohidratos, regular cantidad de alcaloides, poca cantidad de taninos, flavonoides y ausencia de quinonas; cabe resaltar que las quinonas, se pudo hallar en regular cantidad (++) en este estudio.

Para el aceite esencial del *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), los metabolitos encontrados en mayor cantidad (+++) fueron, Triterpenos esteroidales; en regular cantidad (++) Carbohidratos, Compuestos Fenólicos, Flavonoides y Saponinas; baja cantidad (+) Alcaloides, y quinonas; ausencia (-) a Taninos y Antocianinas, de igual manera **Marroquín (2015)**¹⁸, es su trabajo

de investigación encontró compuestos químicos como el eugenol y compuesto fenólico así mismo, **Torres-Aguirre, G. et al (2018)** ³⁷, en su estudio pudo determinar cuantitativamente metabolitos como compuestos polifenólicos y flavonoides solubles totales, dicho estudio concuerda con los encontrados en el presente trabajo, cabe resaltar que el clavo de olor fue la especia con mayor contenido de polifenoles solubles.

Se concluye que la crema elaborada a base del extracto etanólico de *Thymus vulgaris* L.(tomillo) y aceite esencial del *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), presentan Compuestos Fenólicos, Flavonoides, Triterpenos, alcaloides y saponinas, probablemente la presencia de estos metabolitos contenga propiedades terapéuticas, tal como mencionan diferentes investigadores como **Verastegui (2014)** ³⁸ y **Lizcano (2007)** ¹¹. El uso de plantas medicinales como tratamiento tradiciones en comunidades andina.

2. Para determinar la actividad antibacteriana de la crema a base de la combinación del extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo) y el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), y *Staphylococcus aureus*.(ATCC® 25922™), se procedió según el Método de Difusion en Agar (Kirby Bauer), para ello se tomaron 4 grupos de estudio por cada bacteria, conformado por concentraciones al 5 y 10%, control positivo (+) la crema antibacteriana comercial Niofen y control negativo (-) el agua destilada, cada uno de ellos con 8 repeticiones una vez realizada la siembra, se incubo por 24 horas a 37°C; al igual **Rodriguez (2018)**,²⁵ y **Ortega (2018)**²⁷ ambos investigadores emplearon la misma metodología de Difusión en agar para determinar el efecto antimicrobiano de diferentes plantas medicinales con actividad terapéutica. Los resultados de los cultivos obtenidos en el presente estudio fueron medidos en mm. con ayuda de un instrumento llamado vernier, los valores fueron se registraron en la ficha de recolección de datos (tabla N.6), para la interpretación de los halos de inhibición se utilizó la escala de Duraffourd y Lapraz, bajo el criterio del tamaño de los halos en mm. Para la interpretación de los resultados

se usó la media de las lecturas de los halos de inhibición; la actividad antibacteriana de la crema frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922, la concentración al 5 y 10% muestra una media de 10.18 y 12.33 mm respectivamente que se interpreta como Sensible (+). El control positivo 19.20 mm como Muy sensible (++) por ser un producto comercialmente con propiedades antibacterianas, finalmente el control negativo fue 6.00mm, por contener agua destilada, el resultado es nulo(-) : se concluye que la crema tiene actividad antibacteriana frente a *E. coli*. Según **Montero- Recalde M. et al. (2018)**²⁹ su estudio experimental *in vitro* fue para determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial del clavo de olor, en cultivo puros de *E. coli*, las concentraciones usadas fueron 25, 50, 75 y 100%, Los resultados obtenidos muestran promedios en los halos de inhibición correspondiente de 6.63 mm; 8.36 mm; 16.25 mm; 27.5 mm; estos valores indican que aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) muestran actividad antibacteriana, del mismo modo, **Montero-Recalde M. et al. (2018)**²⁹ su estudio fue evaluar la eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*, para ello se usaron diferentes concentraciones del aceite esencial, la concentración que tuvo mayor halo de inhibición 14.50 mm, (++) fue al 10%. dicha concentración es similar al presente estudio, de igual manera tenemos a **Pastrana-Puche (2017)**¹⁵ donde realizo un estudio con el objetivo de evaluar el efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre los patógenos comunes como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, el Método usado es de difusión en agar, los resultados presentaron una media de 14.4mm, y 15.3mm, que significa que la bacteria muestra una buena sensibilidad (++).

La actividad antibacteriana *in vitro* de la crema frente a cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™), la concentración al 5 y 10% muestra una media de 8.92 y 10.95 mm respectivamente que se interpreta como Sensible (+). El control positivo 19.20mm como Muy sensible (++) por ser un producto comercialmente con propiedades antibacterianas, finalmente el control negativo 6.00mm, por contener agua destilada el resultado es nulo (-). **Solís N. (2011)**¹²

menciona, propiedades antibacterianas de Clavo de olor en diferentes bacterias.

Se concluye que la crema tiene actividad antibacteriana con una sensibilidad media para la *Escherichia coli* (ATCC® 25923™), y sensibilidad baja frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923™), podría deberse a la cantidad de flavonoides y compuestos fenólicos presenciado en la marcha fitoquímica que además han sido reportados como uno de los principales metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana; Según **Tolosa E. 2016**⁵⁰ , **Díaz Ortiz (2016)**¹⁷ es tu investigación sobre el efecto inhibitor del aceite esencial de clavo de olor "*Syzygium aromaticum*" como agente antimicrobiano, debido a la presencia de los compuestos fenólicos.

La actividad antibacteriana de esta especie podría deberse a la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas que se encontró en el análisis fitoquímico cualitativos, ya que se han reportado estudios sobre actividad antibacteriana atribuyendo la actividad a los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y saponinas como lo menciona **Lastra Valdez H. 2016**⁵¹ en su estudio centro de investigación y desarrollo de medicamentos.

3. Con respecto para la prueba de irritabilidad, el investigador **Meza y Vargas (2013)**, define como un fenómeno que se representa como una agresión a la piel, tipo inflamatorio, pudiendo manifestarse en lesiones en la epidermis, llegando a veces a nivel de la dermis, esto se puede observar a simple vista, siendo las principales: eritema y edema, así mismo **Picasso J, (2010)**, hace referencia a la prueba de irritabilidad, donde utiliza animales de laboratorio para evaluar la eficacia de una crema, al igual que el presente estudio, se realizó la prueba de test de irritabilidad en 2 conejos albinos, machos de 280 g y 320g. los resultados obtenidos fueron asignados como No reactivos, al no observarse ninguna reacción como edema o eritema, también **Maquena et al, (2010)**, aporta comentarios sobre la reacción de irritabilidad puede ser de tipo alérgico, hacia los productos cosméticos, con preparaciones a base de plantas naturales, lo cual es necesario la

evaluación de componentes químicos y microbianos para garantizar cualquier efecto en el uso tópico, del mismo modo, comenta **Medina F.(2019)**, que realizó el test de irritabilidad para evaluar la seguridad del jabón líquido a base de plantas medicinales, en humanos mediante la aplicación de parches, los resultados fueron negativos al no observarse edema ni eritema en la piel de los participantes.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- La Marcha Fitoquímica o análisis fitoquímico, es una técnica cualitativa, donde se le asigna valores según la cantidad de compuesto químico hallado en la muestra, según la Metodología de Lock: mayor cantidad (+++), regular cantidad (++) , baja cantidad (+) y ausencia o nula (-).

La presencia de metabolitos secundarios en la muestra vegetal del extracto etanólico de *Thymus vulgaris* L.(tomillo), se determinó en mayor cantidad (+++), los siguientes: Compuestos Fenólicos, Alcaloides, Triterpenos; en regular cantidad (++) en Flavonoides, Quinonas, Glicósidos y saponinas esteroidales. A sí mismo en el aceite esencial del *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), los metabolitos presentes en mayor cantidad (+++) fueron, Triterpenos esteroidales; en regular cantidad (++) Carbohidratos, Compuestos Fenólicos, Flavonoides y Saponinas; baja cantidad (+) Alcaloides, y quinonas. La presencia de estos compuestos químicos hallados en las muestras vegetales, serian los responsables de la actividad terapéutica.

- Para determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de la crema a base de la elaboración del extracto etanólico de *Thymus vulgaris* L.(tomillo) y el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), obteniéndose un halo máximo de inhibición de 12.33mm a una concentración de 10%, frente a la crema comercial (fármaco: Niofen) que fue 19.20mm. Así se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.(ATCC® 25922™), obteniéndose un halo máximo de inhibición de 10.95 mm a la misma concentración. La sensibilidad en ambas bacterias fue Sensibles (+) por estar dentro de 8-14mm, según la escala de Duraffourd y Lapraz.

- la prueba de irritabilidad, se realizó para evaluar la eficacia y seguridad de la crema como requisito para su uso y comercialización, para ello se utilizó animales de laboratorio, siguiendo el Método de Finklestein modificado, los resultados obtenidos fueron negativo o nula irritabilidad, donde se concluye que la crema no produce ninguna irritabilidad cutánea.

5.2 Recomendaciones

- Desarrollar estudios para poder cuantificar los metabolitos secundarios que presenten las plantas medicinales entre ellas el *Thymus vulgaris L.*(tomillo) y *Syzygium aromaticum* (Clavo de olor), en nuestro territorio.
- Fomentar el estudio y la investigación de las plantas medicinales como recursos de primera línea antes las necesidades de tratamiento y uso tópico ante infecciones por ser poco estudiadas.
- Continuar con la implementación de los laboratorios universitarios, así como también destinar recursos de infraestructura e incentivos económicos necesarios para la sostenibilidad de estos laboratorios en apoyo a los tesisistas.
- Plantear y formular nuevos productos cosméticos que contengan poca cantidad de insumos sintéticos, aprovechando la mega diversidad de flora en nuestro territorio.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Organización Mundial de la Salud, 2013 (OMS) Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 Catalogación por la Biblioteca de la OMS: (Clasificación NLM: WB 55) pag. 25-40
2. The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*, International Journal of Clinical Medicine, 2015, 6, 635-642 https://file.scirp.org/pdf/IJCM_2015091513262965.pdf
3. Quevedo Pereyra Rosario de Pribyl, 2009 La Medicina Tradicional en el Sistema Oficial de Salud en el Perú
4. Ginocchio G, Perez R. "efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (kunth) kuntze (pachachamcua) sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* atcc 19615" 2019, Tesis en línea, Peru UIGV.
5. Alzamora L, Morales L, Armas L, Fernández G. Medicina tradicional en el Perú: actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marco 2001; 62(2).
6. Cruz C, Espinal G, Castillo D. Sensibilidad y resistencia del *staphilococcus aureus*, *haemphillus influenzae* y *streptococcus pyogenes* frente a cuatro plantas utilizadas en atención primaria de salud por los pobladores del Batey Palavé Ciencia y Sociedad, vol. XXXIII, núm. 2, abril-junio, 2008, pp. 153-165 Instituto Tecnológico de Santo Domingo Santo Domingo, República Dominicana.
7. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. 1988.

8. Sierra M, Barros R, Gómez D, Mejía A, Suarez D. productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales, impreso bajo el ISBN 978-958-56645-4-8 y digital con el ISBN 978-958-56645-5-5 2018 Fundación Universitaria Agraria de Colombia - UNIAGRARIA Bogotá D.C – Colombia .
9. Ruíz S, Venegas E, Chávez M, Eustaquio C. Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. “noni” y cuantificación por espectrofotométrica de los flavonoides totales.
UCV - Scientia 2(2), 2010. Recibido: 11 julio 2010 | Aceptado: 23 septiembre 2010
10. Saleh Hosseinzadeh, Azizollah Jafarikukhdan, Ahmadreza Hosseini, Raham Armand, The Application of Medicinal Plants in Traditional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*, International Journal of Clinical Medicine, 2015, 6, 635-642 Published Online September 2015 in SciRes. , Behbahan, Iran
https://file.scirp.org/pdf/IJCM_2015091513262965.pdf
11. Lizcano , Gonzales Maria,Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*thymus vulgaris*) contra *botrytis cinerea*, *fusarium oxysporum* y *sclerotinia sclerotiorum*, 2007, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias microbiología agrícola y veterinaria.Bogota
12. Solís Campoverde N. “Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo” 2011, Tesis para Biquímico farmacéutico, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.Facultad de Ciencias, Rio bamba –Ecuador
13. Hamzeh Amiri , Essential Oils Composition and Antioxidant Properties of Three *Thymus* Species, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2012, Article ID 728065, 8 pages.
<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/728065/>
14. Aceite esencial de tomillo.
<http://www.cepvi.com/medicina/aromaterapia/tomillo.shtml2009/06/10>

15. Pastrana-Puche Y, Durango-Villaruego A, Acevedo –Correa D. Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustria* Vol 15 No. 1 (56-65) junio 2017. Cordova-Colombia
16. Ramirez Luz S. "Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal" *Scientia et Technica* Año XV, No 42, Pag. 263-269, Agosto de 2009.
17. Diaz Ortiz veronica "Efecto inhibitor del aceite esencial de clavo de olor "Syzygium aromaticum" como agente antimicrobiano, sobre cepas de Streptococcus mutans. Estudio in vitro" 2016 Universidad central del Ecuador, Facultad de Odontología, Ecuador.
18. Marroquín Alvarez Conrado . Evaluación del efecto bactericida in vitro del aceite de clavo de olor (Syzygium aromaticum) en bacterias comúnmente aisladas en cavidad oral de perros en los años 2012 – 2013. [Tesis Doctoral]. Guatemala. Universidad De San Carlos. 2015. [Citado 02 de mayo 2017]. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/2302/1/Tesis%20Med%20Vet%20Conrado%20Marroquin.pdf>
19. García Valladolid Alberto "efecto del aceite esencial de clavo de olor (syzygium aromaticum) sobre la caracterización y vida útil de tomates (solanum lycopersicum) frescos" peru-2019 Tesis para optar el título de ingeniero agroindustrial e industrias alimentarias, UNP. [http://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/661/IND-GAR-VILL-16.pdf?sequence=1&isAllowed=](http://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/UNP/661/IND-GAR-VILL-16.pdf?sequence=1&isAllowed=1)
20. Organización Mundial de la Salud, OMS -2018 Escherichia coli
21. Neira J. "Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las plantas medicinales utilizadas por los pobladores de Tuctumpaya, Quequeña y Chiguata, frente a bacterias gram positivas: Staphylococcus aureus – Streptococcus pneumoniae causantes de infecciones de importancia médica,

- Arequipa – Perú 2017.”[para optar el título profesional de Biólogo] Perú: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; 2018
22. Guillermo Báez Antonio, Infecciones Recurrentes, Comportamiento del Sistema Inmunitario frente a la Candidiasis, 2018. UFASTA, Rosario, Argentina.
 23. Argentina. Ministerio de Salud de la Nación Guía de medicamentos esenciales para el PNA: antimicrobianos. - 1a ed . - Ciudad Autónoma de Buenos Aires : Ministerio de Salud de la Nación. Cobertura Universal de Salud. Medicamentos, 2017. 178 p. ; 21 x 11 cm. ISBN 978-950-38-0254-0.
 24. Instituto Nacional de Salud (Peru) Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias / INS -- Lima : Ministerio de Salud, INS, 2001. 89 p. -- (Serie de Normas Técnicas; 28).
 25. Nuevo manual de la OPS guía el manejo de la resistencia a los antimicrobianos en las Américas, Washington, DC, 16 de noviembre de 2018 (OPS/OMS).
 26. Rodríguez Salinas Ana E. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) sobre cepa de *Streptococcus mutans* sp. Universidad Católica los Angeles Chimbote-Peru 2018
 27. Ortega Lozano Amanda, " Determinar el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y oregano (*Origanum vulgare*) frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, Universidad Politecnica Saleciana, 2018 Cuenca- Ecuador.
 28. Alba Gonzalez, A., Bonilla Rivera, P., & Arroyo Acevedo, J. (2014). Actividad cicatrizante de una pomada con aceite esencial de *Schinus molle* L. "Molle" en ganado vacuno con heridas infectadas y en ratones. *Ciencia Investigación*, 12(1),29-
<https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/>
 29. Montero-Recalde Mayra, Mira Juan carlos, Avilés-Esquivé Diana, Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre una cepa

de *Staphylococcus aureus*, Rev. investig. vet. Perú vol.29 no.2 Lima abr./jun. 2018.<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i2.14520>

30. S. National Committee for Clinical Laboratory, "Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar", National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., Vol. 17(1), 1997.
31. A. L. Barry, D. Amsterdam, M. B. Coyle, E. H. Gerlach, C. Thornsberry, H. R. W, "Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test." J. Clin. Microbiology., Vol. 10, pp. 910, 1979.
32. D. M. Hacek, D. C. Dressel, L. R. Peterson, "Highly Reproducible Bactericidal Activity Test Results by Using a Modified National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Technique", Journal of Clinical Microbiology, Vol. 37(6), pp. 1881, 1999
33. Guerra M, Rodriguez M, Garcia G, Llerena C. Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). Stapf Rev Cubana Plant Med v.9 n.2 Ciudad de la Habana Mayo-ago. 2004 http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962004000200005
34. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD (INS), Diseño e interpretación de pruebas farmacológicas de control de calidad, libro: Volumen II, Serie de documentos No3,Lima-1997.
<https://repositorio.ins.gob.pe/xmlui/bitstream/handle/INS/168/CNSP-0041.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
35. Alvares Torres Priscila, Peña Peña Jaime, Evaluacion de la eficacia cosmetica in vivo en formulas cosmeticas elaboradas con aceites esenciales de Aristeguietua Glutinosa (matico) y ocoteaquixos (ishpingo), Universidad Politecnica Salesiana, Cuenca-Ecuador 2018
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15042/1/UPS-CT007425.pdf>.

36. Farmacopea Argentina, Ministerio de Salud de la Nación, texto del 1º Volumen de la Séptima Edición Pag 141 Buenos Aires, 2003
http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_I/files/assets/basic-html/page15.html.
37. Torres-Aguirre, G.A. et al Optimización de la extracción e identificación de compuestos polifenólicos en anís (*Pimpinella anisum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas, Universidad Nacional Autónoma de México, Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 21(2): 103-115, Mexico 2018.
<https://www.medigraphic.com/pdfs/revespciequibio/cqb-2018/cqb182d.pdf>.
38. Verastegui S. Jose, 2014 Investigación de la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extractos de plantas medicinales frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans*, Universidad técnica, Carrera de Ingeniería Bioquímica de ampato – Ecuador.
<https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/8462?locale=es>
39. Ministerio de Salud del Perú. [Internet] Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. INS, Lima 2017.
40. Rosell Cáceres G. Determinación del contenido total de polifenoles flavonoides y actividad antioxidante y antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70% de *Thymus vulgaris* L.(tomillo) frente a *Staphylococcus aureus*, Universidad san Antonio Abad del Cusco, Perú 2014.
41. Picazo J. [internet] Metodos Basicos para el estudio de Sensibilidad a los Antimicrobianos. In Picazo J,J, editor.; 2010. p. 54. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%20.pdf>.
42. Lock OU. Métodos en el Estudio de Productos Naturales. tercera ed.: Investigación fitoquímica; 2017.
43. Farjana A M,N, S. K. Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. Asian Pacific J Trop Dis. 2014; 4(14).

44. . Huaman E, Yeny Oroche S. Yaneth. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Oenothera rosea* “Yaguar chop” *Geranium sessiliflorum* “ojotillo” frente a *Staphylococcus aureus* cepa atcc y *Escherichia coli*, univ. San Antonio Abad del Cusco, Perú 2016
45. Moquera T., Noriega, P. (2012) Evaluación de la eficacia cosmética de cremas con aceites extraídos de especies vegetales amazónicas: *Mauritia Flexuosa* (morete), *Plukenetia volubilis* (sacha inchi) .
46. Tobón M., López L., Bioanálisis predictivo de tolerancia dérmica de cosméticos para bebés in vivo, *Rev Cubana Farm* vol.47 no.2 Ciudad de la Habana abr.-jun. 2013
47. Bielsa I. Indicaciones y contraindicaciones de los cosméticos en las distintas etapas de la vida. *Med Cutan Iber Lat Am*. 2005;33(3):137-8.
48. Medina F., Santillan N. (2019) Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de *Colletia Spinossima* (roque) y *Calendula Officinalis* (caléndula) frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y formulación de un jabón líquido antibacteriano, Universidad San Antonio Abad de Cuzco.
49. Farjana A M, N, S. K. Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2014; 4(14).
50. Tolosa E, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. ; 2016. Report No.: ISSN.
51. Lastra VH, Piquet GR. *Calendula officinalis*. *SciELO*. 2016 setiembre-diciembre; 33(3)

ANEXOS

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DE LA CREMA ELABORADA A BASE DE LA COMBINACION DEL ACEITE ESENCIAL DE *Syzygium aromaticum* (CLAVO DE OLORE) Y EXTRACTO ETANOLICO DE *Thymus vulgaris* L. (TOMILLO) FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	VARIABLES INDICADORES	DIMENSIONES	METODOLOGIA
¿La crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> L. tendrá actividad antimicrobiana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> ?	Evaluar la actividad de la elaboración de una crema a base de la combinación de aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> L. frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	La crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> L. tiene actividad antimicrobiana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	VARIABLE IND. Crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> L.	<ul style="list-style-type: none"> Reacción Duggendorf FcOI3 Shimoda Molish Lieberman Borrtzger Gelatina Ninhidrina <p>Método: Look Oiga.</p>	<p>Tipo Aplicativo</p> <p>Nivel: Cuantitativo</p> <p>Espectativo</p> <p>Diseño: Experimental <i>in vitro</i></p> <p>Población: Plantas de <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo) y <i>Syzygium aromaticum</i> (Clavo de olor)</p>
PROBLEMAS ESPECIFICOS	OBJETIVOS ESPECIFICOS	HIPOTESIS ESPECIFICAS		<ul style="list-style-type: none"> Identificación de Metabolitos secundarios 	<p>Muestra: 2 kilos de <i>Thymus vulgaris</i> y 1 kilos de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor)</p> <p>Instrumentos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • gPSS • Registro
a) ¿Qué tipos de metabolitos secundarios se pueden encontrar en mayor cantidad en la crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> ?	a) Identificar qué tipos de metabolitos secundarios se pueden encontrar en mayor cantidad en la crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i>	Existen metabolitos secundarios que se encuentran en mayor cantidad en la crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> que influyen significativamente en la actividad antibacteriana.	<ul style="list-style-type: none"> Concentración de la crema 	<ul style="list-style-type: none"> • 5.0% • 10 % 	<p>Medidas de los halos de inhibición</p> <p>Escala de Durafourd y Lapraz</p>
b) ¿Cuál será la concentración óptima del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> para la evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antibacteriana de la crema?	b) Determinar la concentración óptima del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> para la evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antibacteriana de la crema.	Existe una concentración óptima en la crema a base de aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> que presenta mayor actividad antibacteriana.	<p>Cultivos Microbiológicos</p> <p>Método: Kirby Bauer</p>	<p>(-) Nula; Diámetro (< 8 mm)</p> <p>(+) Sensible; Diámetro (8 - 14 mm)</p> <p>(++) Muy sensible; Diámetro (14 - 20 mm)</p> <p>(+++ Sumamente sensible; Diámetro (> 20 mm)</p>	<p>Puntaje:</p> <p>(-) no irritante</p> <p>+: Irritante leve</p> <p>++: Irritante moderado</p> <p>+++; Irritante</p> <p>++++; Fuertemente Irritante</p>
c) ¿De qué manera el uso tópico de la crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> puede producir irritabilidad cutánea?	c) Comprobar si el uso tópico de la crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> puede producir irritabilidad cutánea.	el uso tópico de la crema elaborada a base de la combinación del aceite esencial de <i>Syzygium aromaticum</i> (clavo de olor) y extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> no produce irritabilidad cutánea.	<p>VARIABLE DEP. Actividad antibacteriana</p>	<p>Test de Irritabilidad cutánea</p> <p>Método de Finklestein Modificado</p>	

ANEXO 2: VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO



**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
ESCUELA DE POST GRADO**

DATOS GENERALES:

- **Apellidos y nombres del experto:** _____
- **Institución donde labora:** _____
- **Registro del colegio profesional:** _____
- Nombre del instrumento: Ficha de recolección de datos para determinar actividad anti bacteriana *in vitro* de la crema elaborada de la combinación de aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo)
- **Instrucciones:** Luego de analizar la ficha de recolección de datos y cotejar la investigación con la Matriz de consistencia, le solicito que, en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación.

1. Muy poca	2.- Poca	3.- Regular	4. Aceptable	5.-Muy aceptable
-------------	----------	-------------	--------------	------------------

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTUACIÓN				
		1	2	3	4	5
CLARIDAD	El instrumento esta formulado con un lenguaje apropiado.					
OBJETIVIDAD	El instrumento evidencia recojo de datos observables.					
ACTUALIDAD	El instrumento se adecua a criterios científicos y tecnológicos					
ORGANIZACIÓN	El instrumento presenta una organización lógica.					
SUFICIENTE	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento.					
INTENCIONALIDAD	Es adecuado para relacionar las variables en mención.					
CONSISTENCIA	Se basa en aspectos teóricos científicos de la Farmacéutica como de La Bioquímica					
COHERENCIA	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, dimensiones y variables.					
METODOLOGIA	La categoría responde al propósito de la problemática de la investigación.					
PERTINENCIA	Muestra relación entre los componentes de la investigación y método científico.					
	TOTAL					

VALORACIÓN TOTAL: _____

Fecha: ____/____/____

FIRMA: _____

10-20	No valido, Reformular
20-30	No valido, Modificar
30-40	Valido, Mejorar
40-50	Valido, Aplicar

ANEXO 3:FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

MARCHA FITOQUIMICA

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DE LA CREMA ELABORADA DE LA COMBINACION DEL ACEITE ESENCIAL DE *Syzygium aromaticum* (CLAVO DE OLOR) Y EXTRACTO ETANOLICO DE *Thymus vulgaris* (TOMILLO).

OBJETIVO: Identificar los metabolitos presentes en la muestra vegetal.

FUNDAMENTO: La Marcha Fitoquímica, permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos

METABOLITOS	REACTIVOS	PROCEDIMIENTO	REACCION POSITIVA	RESULTADO
CARBOHIDRATOS	(Molish)	MP +Molish+H ₂ SO ₄ cc"	Anillo violeta	
	Fehling	MP+Fehling A+ Fehling B +calentar en B.M	Coloración rojo ladrillo	
COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	MP+FeCl ₃ 10%	Coloración verde o azul	
TANINOS	Gelatina	MP+3 gotas de gelatina	Precipitado denso blanco	
FLAVONOIDES	Reactivo de Shinoda	MP+2 virutas de Mg+ HCl	Amarillo rojizo: Isoflavanonas	
ANTOCIANINAS Y FLAVONOIDES CATÉQUICOS	Rosenheim	MP + Rosenheim"	Coloración rojo oscuro	
AMINOÁCIDOS LIBRES Y GRUPOS AMINO	Ninhidrina	MP+ Ninhidrina+ calentar en baño Maria	Coloración violácea	
ALCALOIDES	Dragendorff	MP+ HCl 10%+ Dragendorff	Precipitado naranja	
	Mayer	MP+ HCl 10%+ Mayer	Precipitado blanco	
	Wagner	MP+ HCl 10%+ Wagner	Precipitado marron	
NAFTAQUINONA ANTRAQUINONA Y ANTRANONAS	Borntrager	MP+ Borntrager	Coloración roja	
TRITERPENOIDES	Burchard	MP+cloroformo+anhídrido acético+H ₂ SO ₄ cc	Verde-azul:Esteroides. Rojo-naranja:Triterpenoides	
ESTEROIDES				
SAPONINAS	Agua destilada	MP+ Agua destilada	"Formación de 0.5 a 1 cm de espuma estable por 15 min"	
GLICÓSIDOS	Baljet	MP+ácido pícrico 1%+NaOH al 5 %	Coloración anaranjada	
CUMARINAS	NH ₄ OH cc ó NaOH 10%	MP+papel humedecido con NH ₄ OH cc ó NaOH 10% en boca de tubo +calentar por 5 min"	Fluorescencia celeste	

Leyenda:

Ausencia: (-) Poco: (+) Regular: (++) Bastante: (+++)
--

ANEXO 4: FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DE LA CREMA ELABORADA DE LA COMBINACION DEL ACEITE ESENCIAL DE *Syzygium aromaticum* (CLAVO DE OLOR) Y EXTRACTO ETANOLICO DE *Thymus vulgaris* (TOMILLO).

OBJETIVO: Identificar la sensibilidad de los microorganismos frente a determinadas concentraciones de la crema elaborada de la combinación del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y extracto etanolico de *Thymus vulgaris* (tomillo).

FUNDAMENTO: El método de Difusión en Agar (Kirby Bauer), consiste en depositar, en la superficie del agar de una placa previamente inoculada con el microorganismo y sobre ella colocar discos impregnados con la crema a evaluar para su posterior incubación y finalmente la visualización del diámetro de los halos de inhibición con un instrumento de medición llamado vernier.

Actividad antibacteriana de la crema:

N° DE Ensayos	Diámetros de los halos de inhibición (mm)				Control (+)	Control
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus,</i>		crema comercial	(-)
	5%	10%	5%	10%		
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
Promedio						
DS						

LEYENDA: Resistente (-): Para diámetros de inhibición inferiores a 9 mm
Intermedia (+): Para diámetros de inhibición entre 10 a 14 mm
Sensible (++) : Para diámetros de inhibición entre 14 y 20 mm
Altamente sensible (+++): Para un diámetro de inhibición > 20 mm

ANEXO 5: Preparación del extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo).



Limpieza y selección de las Planta *Thymus vulgaris* (tomillo).



Maceración y Filtración del extracto *Thymus vulgaris* (tomillo).



extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo).



Marcha Fitoquímica del extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo).

ANEXO 6: Extracción del aceite esencial del *Syzygium aromaticum* (clavo de olor)



Extracción del aceite esencial por el Método de arrastre del vapor

ANEXO N.7 Marcha Fitoquímica de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor)



aceite esencial
del *Syzygium
aromaticum*
(clavo de olor)



Marcha Fitoquímica del aceite esencial del *Syzygium
aromaticum* (clavo de olor)

ANEXO N.8 Marcha Fitoquímica extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo).



Marcha Fitoquímica del extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (tomillo).

ANEXO N.9 Determinación de la actividad antibacteriana



Activación de las cepas bacterianas ATCC

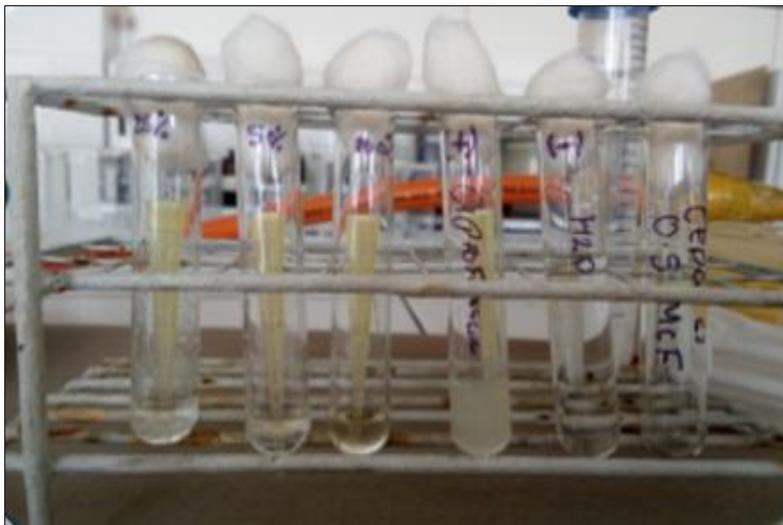


Sembrado de las cepas ATCC



Técnica de sembrado

ANEXO N 10. Preparacion del inoculo bacteriano



Grupos de estudios :
5%, 10%
control (+) y
Control (-)

por cada factor
Bacteria



Estándares de
turbidez de McFarland

ANEXO N.11
Preparacion

de los medios de cultivos



Preparacion y sembrado en Agar Mueller Hinton

ANEXO N 12: Sembrado, cultivo y incubacion de las placas petri.



Discos de sensibilidad para los grupos



Discos con la materia vegetal

ANEXO N 13. Resultados de los cultivos y medidas de los halos de inhibicion.

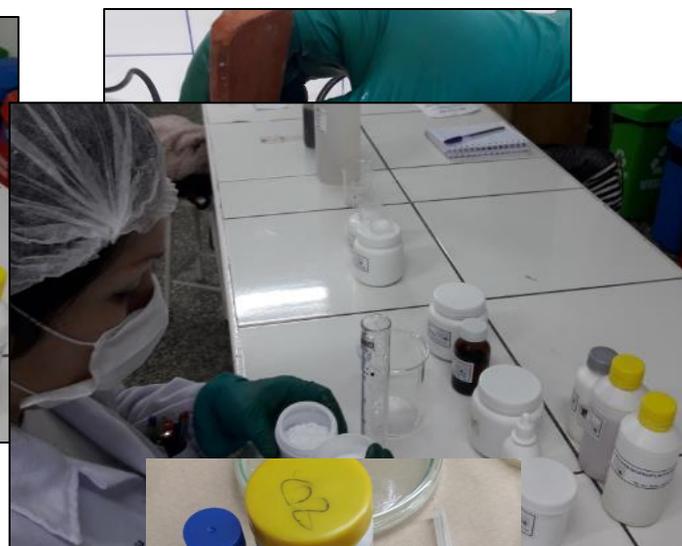


Resultados de los cultivos (halos de inhibicion) al 5%, 10% , controles (+) y Control (-).
Escherichia coli (ATCC® 25922).



Resultados de los cultivos (halos de inhibicion) al 5%, 10% , controles (+) y Control (-).
Staphylococcus aureus (ATCC® 25923™)

ANEXO N. 14: Preparacion de lo crema antibacteriana



ANEXO N 15. Prueba de Irritabilidad



