

Información Importante

La Universidad Santo Tomás, informa que el(los) autor(es) ha(n) autorizado a usuarios internos y externos de la institución a consultar el contenido de este documento a través del catálogo en línea, página web y Repositorio Institucional del CRAI-USTA, así como en las redes sociales y demás sitios web de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

Se permite la consulta a los usuarios interesados en el contenido de este documento, para todos los usos que tengan **finalidad académica**, siempre y cuando mediante la correspondiente cita bibliográfica se le dé crédito al trabajo de grado y a su autor, nunca para usos comerciales.

De conformidad con lo establecido en el Artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, la Universidad Santo Tomás informa que “los derechos morales sobre documento son propiedad de los autores, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.”

Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación, CRAI-USTA
Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

**Estudio de la composición química y actividad biológica de aceites esenciales de
Cardamomo (*Elettaria cardamomum*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*)**

Silvia Fernanda Parra Sepúlveda

Trabajo de grado para optar el título de Química Ambiental

Director(es)

Martha Cervantes Díaz, Química M. Sc.

Codirector(es)

Laura Viviana Herrera Sandoval, Bact. Y L. C, M. Sc.

Ricardo Restrepo Manrique, Biólogo, Espec.

Universidad Santo Tomás, Bucaramanga

División de Ingenierías y Arquitectura

Facultad de Química Ambiental

2020

Este trabajo está dedicado a mis padres y hermana pues son ellos el principal cimiento de mi desarrollo profesional, por demostrarme siempre su amor y confianza, por ser ejemplo de unión y apoyo incondicional, por enseñarme e impulsarme siempre a seguir mis sueños.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios por haberme guiado y acompañado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad y por permitirme concluir esta gran meta.

Así mismo, agradezco a mi directora Martha Cervantes, y a mis codirectores Laura Herrera y Ricardo Restrepo por la confianza, apoyo, los conocimientos que me transmitieron y la dedicación brindada en la realización de este trabajo de grado.

Gracias a la Universidad Santo Tomas por abrirme sus puertas, brindarme la oportunidad de formarme académicamente y moralmente, y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro de su establecimiento educativo.

Agradezco a mis padres por su constante entrega y esfuerzo, por brindarme su dedicación y consejos que me enseñaron a nunca rendirme aun cuando todo parecía difícil, por darme la oportunidad de estudiar esta carrera y por ser un ejemplo de vida.

Tabla de contenido

Introducción	15
1 Objetivos	18
1.1 Objetivo General	18
1.2 Objetivo Específicos	18
2 Marco referencial	19
2.1 Generalidades de los aceites esenciales	19
2.2 Métodos de obtención y caracterización de aceites esenciales	19
2.3 Propiedades biológicas de aceites esenciales	21
2.4 Fitotoxicidad de aceites esenciales	21
2.5 Resistencia microbiana	23
2.6 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	23
2.7 Microorganismos bajo estudio	26
2.7.1 <i>Streptococcus mutans</i>	26
2.7.2 <i>Porphyromonas gingivalis</i>	27
2.8 Compuestos de referencia	28
2.8.1 Vancomicina	28
2.8.2 Metronidazol	29
3 Estado del arte	30
3.1 <i>Thymus vulgaris</i>	30
3.2 <i>Elettaria cardamomum</i>	35
4 Metodología experimental	38
4.1 Obtención y caracterización aceites esenciales	39
4.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales	41
4.3 Microorganismos de interés	42
4.4 Evaluación de aceites esenciales y compuestos de referencia.	43

4.4.1	Compuestos de referencia.	43
4.4.2	Determinación de concentraciones de aceites esenciales y compuestos de referencia.	44
4.5	Determinación de la concentración inhibitoria mínima.....	45
4.6	Determinación de la fitotoxicidad de los aceites esenciales.	47
4.6.1	Ensayo de toxicidad en <i>Allium cepa</i> .	47
4.6.2	Ensayo de toxicidad con semillas.	48
5	Consideraciones Éticas	49
6	Análisis y Resultados	50
6.1	Obtención y caracterización de aceites esenciales de <i>Elettaria cardamomum</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	50
6.2	Evaluación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de tomillo y cardamomo	61
6.2.1	Evaluación de los compuestos de referencia.	61
6.2.2	Evaluación de la concentración inhibitoria y bactericida mínima de aceites esenciales.	63
6.3	Determinación de la fitotoxicidad de los aceites esenciales	66
6.3.1	Evaluación de la toxicidad aguda de los AE en estudio.	66
6.3.2	Evaluación de genotoxicidad de AE de tomillo y cardamomo.	69
7	Conclusiones	73
8	Recomendaciones	74
	Referencias bibliográficas	76

Lista de tablas

Tabla 1. Estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> frente a <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Porphyromonas gingivalis</i>	35
Tabla 2. Estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Elettaria cardamomum</i>	38
Tabla 3. <i>Condiciones de crecimiento y cultivo de las cepas de estudio</i>	43
Tabla 4. <i>Concentraciones por evaluar para los aceites esenciales y compuestos de referencia</i>	45
Tabla 5. <i>Condiciones de crecimiento para la determinación de la concentración inhibitoria mínima</i>	45
Tabla 6. <i>Composición química del aceite esencial de tomillo determinado mediante GC-MS</i>	51
Tabla 7. <i>Composición química del aceite esencial de cardamomo determinados mediante GC-MS</i>	56
Tabla 8. <i>Datos obtenidos de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> y <i>Elettaria cardamomum</i> y compuesto de referencia frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i> y <i>Streptococcus mutans</i></i>	64
Tabla 9. <i>Evaluación de la fitotoxicidad de los aceites esenciales de tomillo y cardamomo</i>	68
Tabla 10. <i>Aberraciones cromosómicas presentes en las células de cebollas expuestas a los aceites esenciales de tomillo y carda momo, y al DMSO</i>	72

Lista de Figuras

	pág.
Figura 1. Diagrama esquemático de la técnica analítica de CG-MS.....	20
Figura 2. Morfología de las semillas y plántulas en estudio.	22
Figura 3. Determinación de CIM y CBM mediante dilución en caldo.	24
Figura 4. Morfología del <i>Streptococcus mutans</i>	26
Figura 5. Morfología de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	27
Figura 6. Estructura química de la Vancomicina.....	29
Figura 7. Estructura química del Metronidazol.	30
Figura 8. Planta de tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>).....	31
Figura 9. Estructura química de los compuestos mayoritarios del aceite esencial <i>Thymus vulgaris</i>	31
Figura 10. Mecanismo de acción de los compuestos mayoritarios del AE timol y carvacrol	33
Figura 11. Semilla de <i>Elettaria cardamomum</i>	36
Figura 12. Estructura química de los compuestos mayoritarios del aceite esencial <i>Elettaria cardamomum</i>	37
Figura 13. Descripción de las etapas del proceso experimental para el estudio de la actividad antimicrobiana y fitotóxica de los aceites esenciales en estudio.	39
Figura 14. Procedimiento de obtención de AE de tomillo y cardamomo empleado el método de hidrodestilación asistida por microondas.....	40
Figura 15. Procedimiento experimental para la determinación de la actividad antimicrobiana (CIM y CBM) de los aceites esenciales de tomillo y cardamomo.....	42
Figura 16. Espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier (SHIMADZU), modelo IRAffinity- 21.....	44
Figura 17. Distribución de la placa de ELISA de 96 pozos.	46
Figura 18. Crecimiento de las raíces al transcurrir los 7 días de contacto con los aceites esenciales y controles.....	47
Figura 19. Montaje y semillas empleadas para la determinación de fitotoxicidad de los aceites esenciales de tomillo y cardamomo.	49
Figura 20. Corriente iónica total reconstruida del AE de tomillo analizada por GC-MS operado en el modo full scan.....	53
Figura 21. Espectro de masas para el compuesto mayoritario timol presente en el AE de tomillo ..	54
Figura 22. Espectro de masas para el compuesto mayoritario p-cimeno presente en el AE de tomillo.	54

<i>Figura 23.</i> Espectro de masas para el compuesto mayoritario γ -terpineno presente en el AE de tomillo	55
<i>Figura 24.</i> Corriente iónica total reconstruida del AE de cardamomo analizado por GC-MS operado en el modo full scan.....	58
<i>Figura 25.</i> Espectro de masas del compuesto 1,8-cineol (eucaliptol) presente en el aceite esencial de cardamomo.....	58
<i>Figura 26.</i> Espectro de masas del linalool presente en el aceite esencial de cardamomo	59
<i>Figura 27.</i> Espectro de masas del acetato de linalilo presente en el aceite esencial de cardamomo.	60
<i>Figura 28.</i> Espectro de masas del acetato de α terpinilo presente en el aceite esencial de cardamomo.	60
<i>Figura 29.</i> Espectro IR del compuesto de referencia vancomicina.....	62
<i>Figura 30.</i> Espectro IR del compuesto de referencia metronidazol	63
<i>Figura 31.</i> Crecimiento de raíz e hipocótilo en los bioindicadores a) repollo y b) tomate luego de transcurrir las 120 horas de exposición en diferentes concentraciones de AE.....	67
<i>Figura 32.</i> Crecimiento de la raíz en el bioindicador <i>Allium cepa</i> luego de estar en contacto con los aceites esenciales a) tomillo y b) cardamomo.....	67
<i>Figura 33.</i> Curva de Dosis-Respuesta de aceites esenciales de tomillo y cardamomo frente al bioindicador <i>Allium cepa</i>	69
<i>Figura 34.</i> Índice mitótico de las diferentes soluciones de AE de tomillo y cardamomo frente al bioindicador <i>Allium cepa</i>	70
<i>Figura 35.</i> Porcentaje de aberraciones cromosómicas causadas por los aceites esenciales evaluados a las células de cebolla.	71

Lista de Abreviaturas

AC	Aberraciones Cromosómicas
AE	Aceite Esencial
CE ₅₀	Concentración Efectiva Media
CG-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CBM	Concentración Bactericida Mínima
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
IM	Índice Mitótico

Glosario

Aceite esencial: los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, obtenidas mediante la técnica de destilación de arrastre con vapor de agua o hidrodestilación son los compuestos responsables del aroma de las plantas, tienen diferentes aplicaciones como por ejemplo, en la industria cosmética para la fabricación de perfumes y aromatizantes, de alimentos para la elaboración de condimentos y saborizante y en la industria farmacéutica para la producción de saborizantes, entre otros. (Martínez, 2001)

Antimicrobianos: Son sustancias químicas empleadas en tejidos vivos destinadas a prevenir u obstruir el crecimiento o la acción de los microorganismos por inhibición de su actividad o por la muerte de ellos. (Negroni, 2009)

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM): Es la mínima concentración del antimicrobiano que, en un periodo de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* visible de un inóculo bacteriano. (Taroco, Seija, & Vignoli, 2008)

Concentración Bactericida Mínima (CBM): Es la mínima concentración de un antimicrobiano que en un periodo de tiempo es capaz de inducir la muerte *in vitro* del 99,9% de una población bacteriana. (Taroco, Seija, & Vignoli, 2008)

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas: Es una técnica analítica utilizada para la separación, identificación y cuantificación de mezclas de sustancias volátiles y semivolátiles. La separación de la sustancia en estudio depende de las diferentes distribuciones de la sustancia entre la fase móvil y estacionaria. (Joseph O . Ricaldi sarapura, 2014)

Enterobacterias: Son microorganismos Gram-negativos encontrados en la naturaleza y aislados del material biológico que habitan el tracto gastrointestinal de los seres humanos como parte del microbiota natural de este sistema orgánico, convirtiéndolo en un reservorio potencial para este patógeno. (Silva lavagnoli, Kutz, Cerutti, Bassetti, & Kaiser, 2017)

Fitotoxicidad: es la capacidad que tiene una sustancia química o una mezcla de aspersión o un compuesto determinado de generar desórdenes fisiológicos en las plantas y que producen alteraciones en el aspecto, crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas. (Moreno Florez & Peñaranda, 2019)

Hidrodestilación: Es un método de extracción de aceites esenciales en el cual el material vegetal se sumerge directamente al agua, la cual se somete a ebullición permitiendo así que los vapores generados se condensen y pueda recolectarse el aceite esencial por diferencia de densidad. (Stashenko, 2009).

Patógeno: Organismo que tiene la capacidad de generar enfermedad. Esa capacidad depende de diversos factores, que incluyen la dosis infectante del microorganismo, la puerta de entrada al organismo y la susceptibilidad del huésped. (Torres, 2015)

Terpenos: Son un conjunto de sustancias que conforman uno de los grupos de fotoquímicos más importante. Estos compuestos tienen un origen biosintético común y, aunque con estructuras químicas distintas, todos ellos proceden de la condensación del isopreno, un hidrocarburo de cinco átomos de carbono. (López Carreras, Miguel, & Aleixandre, 2012)

Toxigenicidad: capacidad de un agente patógeno para producir toxinas. Algunas forman parte de la estructura microbiana, otras pueden ser originadas y excretadas por las bacterias u otras sólo pueden ayudar al fenómeno invasivo. (Rojas, Rodríguez, Pérez, Chaves, & Arias, 2014)

Resumen

Los aceites esenciales (AE), son mezclas complejas, de componentes de diversa naturaleza química. Una de las actividades biológicas más ampliamente estudiada en los AE es la antimicrobiana como una alternativa a la resistencia bacteriana. Por otra parte, el estudio de la fitotoxicidad de los AE es de gran importancia para determinar su efecto ecotoxicológico al interactuar con otras especies.

Los (AE) de tomillo (*Thymus vulgaris*) y cardamomo (*Elettaria cardamomum*) se obtuvieron mediante hidrodestilación asistida por microondas y analizaron por CG-MS. Se determinó la CIM y CBM para cada AE frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* empleando el método de microdilución en placa. Se evaluó la CE_{50} , el Índice Mitótico (IM) y la identificación de Aberraciones Cromosómicas (AC), empleando como bioindicadores las semillas de repollo (*Brassica oleracea*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y bulbos de cebolla (*Allium cepa*).

El AE de tomillo, cuyo compuesto mayoritario es timol (21,2%) presentó una CIM 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ y CBM 1000 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. mutans*; y para el *P. gingivalis* mostró una CIM 250 $\mu\text{g/mL}$ y CBM 500 $\mu\text{g/mL}$. Por otro lado, el AE de cardamomo está compuesto principalmente por acetato de α -terpenilo (40%). Este AE mostró una CIM 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ y CBM 500 $\mu\text{g/mL}$ frente *P. gingivalis*. Sin embargo, no evidenció actividad antimicrobiana para *S. mutans*.

En cuanto a la fitotoxicidad, los AE de tomillo y cardamomo no presentaron actividad fitotóxica en los bioindicadores de tomate y repollo ($CE_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$). Sin embargo, para los bulbos de cebolla, se determinó una CE_{50} 415 $\mu\text{g/mL}$ para el AE de tomillo y una CE_{50} 743 $\mu\text{g/mL}$ para el AE de cardamomo; y se identificaron aberraciones cromosómicas como cromosomas pegajosos, vagabundos y puentes.

Palabras Clave: Aberraciones Cromosómicas (AC), Aceite Esenciales (AE), Actividad Antimicrobiana, Bioindicador, Concentración Efectiva Media (CE_{50}), Fitotoxicidad, Índice Mitótico (IE), *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*.

Abstract

Essential oils (AE) are complex mixtures of components of different chemical nature. One of the most complex biological activities studied in EAs is antimicrobial bioactivity as an alternative to bacterial resistance. On the other hand, the study of the phytotoxicity of AE is of great importance to determine its ecotoxicological effect when interacting with other species.

Thyme (*Thymus vulgaris*) and cardamom (*Elettaria cardamomum*) (AE) were obtained by microwave-assisted hydrodistillation and GC-MS analysis. The MIC and CBM were determined for each AE against *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* using the plate microdilution method. The EC₅₀, the Mitotic Index (IE) and the identification of Chromosomal Aberrations (CA) were evaluated, using cabbage (*Brassica oleracea*), tomato (*Lycopersicon esculentum*) and onion bulbs (*Allium cepa*) as bioindicators.

Thyme EA, whose majority compound is thymol (21.2%) presented an MIC 500-1000 µg / mL and CBM 1000 µg / mL compared to *S. mutans*; and for *P. gingivalis* it showed an MIC of 250 µg / mL and CBM 500 µg / mL. On the other hand, cardamom EA is mainly composed of α -terpenyl acetate (40%). This AE showed an MIC 500-1000 µg / mL and CBM 500 µg / mL versus *P. gingivalis*. However, there is no evidence of antimicrobial activity for *S. mutans*.

Regarding phytotoxicity, thyme and cardamom EAs have no phytotoxic activity in tomato and cabbage bioindicators (EC₅₀ > 1000 µg / mL). However, for onion bulbs, an EC₅₀ 415 µg / mL for thyme EA and an EC₅₀ 743 µg / mL for cardamom AE were determined; and chromosomal aberrations were identified as sticky chromosomes, tramps, bridges and late anaphase.

Keywords: Chromosomal Aberrations (CA), Essential Oil (EA), Antimicrobial Activity, Bioindicator, Average Effective Concentration (EC₅₀), Phytotoxicity, Mitotic Index (IE), *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*.

Introducción

Planteamiento del problema

El fenómeno de resistencia microbiana o farmacoresistencia ha tomado una gran trascendencia frente al alto impacto de las enfermedades infecciosas que afectan constantemente a los seres humanos y que a su vez responden con menor frecuencia a las antibióterapias disponibles. Esto ha causado el incremento de las tasas de morbi-mortalidad, mayor reporte de efectos secundarios y toxicidad en los tratamientos por dosis altas y prolongadas, así como aumento significativo de los costos de los sistemas de salud más aun cuando se considera que la era de los antibióticos esta por culminar. (OMS, 2018)

La liberación en el medio natural de antibióticos y otros compuestos antimicrobianos, como los desinfectantes y los metales pesados, puede favorecer la evolución de las bacterias resistentes. Las principales vías de contaminación se relacionan con el consumo y excreción de fármacos y sus correspondientes metabolitos presentes en orina y heces; también se cuenta con la eliminación inadecuada o insuficiente de medicamentos vencidos o no consumidos. Estos compuestos ingresan al medio ambiente acuático por medio de las aguas residuales, entre las cuales se tienen las urbanas, hospitalarias, industriales y las de origen agrícola o ganadero y a su vez pueden quedar retenidos en el suelo, almacenándose y perturbando las distintas propiedades de la tierra. (Cabrera, Gómez, & Zúñiga, 2007).

Los antibióticos están considerados dentro del grupo de contaminantes emergentes más importantes, ya que luego de su ingesta al organismo éste metaboliza solo una fracción del medicamento consumido, mientras que lo restante es excretado mediante la orina y heces, provocando así alteraciones toxicológicas en los organismos acuáticos. Además de esto, los antimicrobianos causan daños en la salud humana como lo son defectos congénitos, daños hepáticos y efectos feminizadores en hombres. (Gil, Soto, Usma, & Gutiérrez, 2012).

Considerando lo anterior, existe una urgente necesidad de explorar la acción de nuevas moléculas y enfoques alternativos para tratar las bacterias patógenas. Una de las alternativas propuestas es el uso de aceites esenciales, debido a que estas sustancias de origen vegetal están conformadas en su mayoría por compuestos tipo fenólicos, los cuales han sido reportados como

promisores de propiedades biológicas como lo son la actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos.

En los últimos años los aceites esenciales se han convertido en un tema de investigación gracias a sus propiedades farmacológicas. Dos especies vegetales que actualmente han sido de gran interés son el tomillo (*Thymus vulgaris*) y cardamomo (*Elettaria cardamomum*), debido a que cuentan con actividades antiespasmódica, antifúngicas y fitoterapéuticas. Sus aceites esenciales han demostrado ser excelentes promisores como agentes antimicrobianos frente a microorganismos grampositivos y gramnegativos. Por esta razón, se propone el estudio de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos del tomillo (*Thymus vulgaris*) y cardamomo (*Elettaria cardamomum*) frente a patógenos orales como *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivales* y su posible fitotoxicidad empleando como bioindicadores semillas de repollo (*Brassica oleracea*) y tomate (*lycopersicon esculentum*) y bulbos de cebolla (*Allium cepa*).

Justificación

Actualmente la ciencia farmacéutica ha manifestado un gran interés hacia los productos herbales en comparación con los productos clásicos o sintéticos, debido a una mejor asequibilidad, aceptabilidad y compatibilidad con la fisiología humana y a su vez la producción de efectos secundarios mínimos. La predilección por los productos a base de plantas aromáticas para los medicamentos, perfumería, cosméticos, los pacientes y los médicos ha incrementado a medida que se evidencia las propiedades biológicas de estas especies vegetales. Entre todos estos medicamentos herbales, son los aceites esenciales quienes reciben mayor interés debido a sus diferentes propiedades y utilidades biológicas. (Abdulrahman khazim , Md Tanwir, Ahmed Abdullah, & Mohammend Salim, 2017)

Desde la antigüedad, las plantas medicinales cumplen un papel importante en la atención sanitaria y pueden representar una fuente importante de nuevos agentes antimicrobianos para combatir microorganismos resistentes. Estos nuevos agentes antimicrobianos pueden encontrarse

en los aceites esenciales de algunas plantas medicinales y aromáticas. (Aleksic Sabo & Knezevic, 2019)

Entre los aceites esenciales que presentan mayor interés por parte de los científicos para el estudio de la actividad antimicrobiana son los obtenidos a partir de las plantas aromáticas de *Thymus vulgaris* y *Elettaria cardamomum*. Debido a que presentan diferentes propiedades biológicas, se encuentran en muchas regiones del mundo, su cultivo se da en condiciones asequibles, presenta gran variedad de aplicaciones en la industria alimentaria y cosmética, debido a la variedad de componentes presentes en cada uno de ellos. (Risaliti, y otros, 2019).

En el caso de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Elettaria cardamomum*, se atribuye principalmente a la presencia de monoterpenos oxigenados tales como timol, carvacrol 1,8-cineol, como mayoritarios en su composición química. Estudios realizados han comprobado la acción antimicrobiana de estos aceites esenciales contra microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, entre otros. (Abdulrahman khazim , Md Tanwir, Ahmed Abdullah, & Mohammend Salim, 2017)

Este trabajo se realizó con la finalidad determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, y *Elettaria cardamomum* frente a de los microorganismos *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivales* y su capacidad de inhibir el crecimiento debido a que son las cepas que presentan mayor resistencia frente a los antimicrobianos convencionales y a su vez, se estableció su fitotoxicidad empleando bioindicadores semillas de repollo (*Brassica oleracea*) y tomate (*lycopersicon esculentum*) y bulbos de cebolla (*Allium cepa*), con el fin de determinar el efecto que pueden ejercer los aleloquímicos de los aceites esenciales en la reproducción de otros organismos.

1 Objetivos

1.1 Objetivo General

Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Efectiva Media (CE_{50}) de los aceites esenciales obtenidos del tomillo (*Thymus vulgaris*) y cardamomo (*Elettaria cardamomum*) frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivales*, empleando el método de microdilución en placa y de semillas repollo y tomate (*Brassica oleracea* y *lycopersicon esculentum*) y de bulbos de cebolla (*Allium cepa*), respectivamente.

1.2 Objetivo Específicos

- Obtener y caracterizar los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y cardamomo (*Elettaria cardamomum*) empleando hidrodestilación asistida por microondas y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS), respectivamente, con el fin de determinar su composición química.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) y concentración mínima bactericida (CBM) de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y cardamomo (*Elettaria cardamomum*) frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivales*.
- Determinar CE_{50} e Índice Mitótico (IM), así como también la identificación de Aberraciones Cromosómicas (AC) de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*) y cardamomo (*Elettaria cardamomum*) empleando como bioindicadores semillas de repollo (*Brassica oleracea*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) y bulbos de cebolla (*Allium cepa*).

2 Marco referencial

2.1 Generalidades de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas de sustancias volátiles obtenidas a partir de plantas aromáticas, las cuales presentan como características principales su composición química, sus propiedades biológicas y su capacidad de generar olores. Los aceites esenciales se encuentran distribuidos en las diferentes partes de la planta como en las raíces, tallos, hojas, flores y frutos. Así mismo, los aceites esenciales tienen una gran variedad de aplicaciones gracias a las propiedades biológicas que estos presentan, estos son usados frecuentemente en las industrias químicas, de alimentos y farmacéuticas, para la elaboración de perfumes productos de aseo, jarabes, especias y agentes saborizantes en alimentos (Peredo Luna, Palou García, & López Malo, 2009)

2.2 Métodos de obtención y caracterización de aceites esenciales

Los aceites esenciales se pueden obtener por diversos métodos, algunos de estos son: Arrastre con vapor, destilación e hidrodestilación asistida por microondas (Figura 14). Este método consiste en sumergir el material vegetal en agua (aproximadamente la tercera parte de él) en un equipo de destilación tipo Clevenger, sometiéndose a la acción de la radiación del microondas. La interacción de la radiación con el material vegetal sumergido en agua causa un calentamiento localizado, generando así la facción de las glándulas que contienen el aceite esencial y de igual modo origina la evaporación del agua y el AE. Esto favorece la extracción del AE ya que se da en un menor tiempo y el rendimiento del AE mejora. Luego de esto, el aceite obtenido es transportado por el vapor de agua al condensador donde se forma la mezcla líquida del condensado. La mezcla líquida luego fluye hacia un separador donde el agua y el AE son separados por diferencia de densidad. (Siti Nuurul Huda Mohammad Azmin, 2016) Los aceites esenciales obtenidos mediante este método se encuentran libres de productos de combustión y de otros contaminantes. (Contreras, 2010)

Una vez obtenido el aceite esencial es importante determinar sus propiedades fisicoquímicas, biológicas, organolépticas y su composición química. Una de las técnicas más utilizadas para la determinación de la composición química de aceites esenciales es la Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-MS), esta técnica es apropiada para el estudio de la

composición química de los aceites esenciales debido a que maneja un sistema con alta sensibilidad, combina el principio de dos técnicas (capacidad de separación e identificación cuantitativa y cualitativa de compuestos individuales presentes en una muestra, empleando un espectro característicos de cada molécula), permite la adquisición de datos y proceso confiable. Además, esta técnica trabaja en fase gaseosa y necesita una pequeña cantidad de muestra para su análisis (Gutiérrez Bouzán & Droguet, 2002). La CG-MS permite realizar en una sola operación, para una muestra del orden de 1 μ l, un análisis cualitativo junto con una indicación de las proporciones en las que se encuentran componentes. (Joseph O . Ricaldi sarapura, 2014)

En esta técnica analítica, la muestra a analizar se inyecta en la columna cromatográfica del equipo, en la cual se lleva a cabo el proceso de separación, obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos compuestos se registra en forma de pico cromatógrafo y se identifica mediante su respectivo espectro de masas. En este proceso el espectrómetro de masas, además de proporcionar los espectros, actúa como detector cromatógrafo al registrar la corriente iónica total generada en la fuente iónica. Esta corriente generada por todos los iones da lugar a un pico gaussiano de área proporcional a la concentración del compuesto detectado. Este principio se puede observar en la figura 1 (Gutiérrez Bouzán & Droguet, 2002).

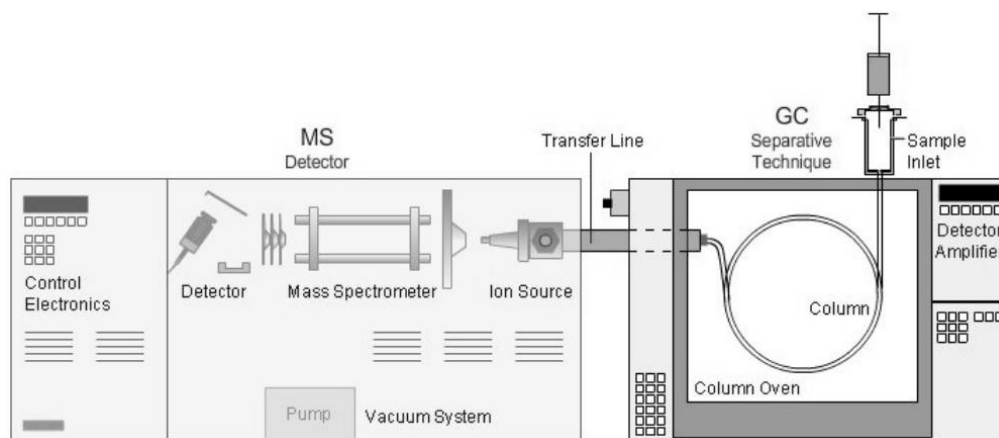


Figura 1. Diagrama esquemático de la técnica analítica de CG-MS.

Fuente: (Hussain & Maqbool, 2014)

2.3 Propiedades biológicas de aceites esenciales

Las propiedades biológicas de aceites esenciales están relacionadas con la composición de los volátiles (terpenoides, compuestos fenólicos y sus derivados, moléculas no terpénicas como alcoholes, ésteres, ácidos, entre otros, y algunos menos frecuentes compuestos heterocíclicos) de los AE de las plantas y sus grupos funcionales, y una posible interacción sinérgica entre sus componentes. (Marqués Camarena, 2015). Algunas propiedades que presentan los aceites esenciales son: antioxidante, anticancerígenas, antisépticos, organoléptica, actividad digestiva, actividad analgésica, actividad antiinflamatoria, actividad antiviral, actividad antifúngica y la actividad antimicrobiana.

Estas propiedades medicinales se consideran seguras para la salud humana y animal, sin embargo, su uso inadecuado puede causar efectos adversos como irritación, convulsiones, hepatotoxicidad y daño renal cuando la ingesta en el sistema es alta, por tanto, es necesario moderar la concentración en que estos se suministran al organismo y evaluar la fitotoxicidad y genotoxicidad *in vitro* del compuesto con el fin de determinar si es apto para uso humano. (Velandia, Flechas, Stashenko, & Ocazonez, 2016)

2.4 Fitotoxicidad de aceites esenciales

Se pueden usar varias pruebas para la evaluación de los efectos genotóxico, mutagénicos y fitotóxicos que pueden causar diversas sustancias, entre las cuales está los ensayos de toxicidad aguda y genotoxicidad en bioindicadores como lo son *Brassica oleracea* y *lycopersicon esculentum* y *Allium cepa*. (Lima Braga, y otros, 2018) .

El bioensayo de toxicidad con semillas es una prueba estática de toxicidad aguda en que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante su primer periodo de crecimiento, de igual manera se puede determinar la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo. Este bioensayo es muy sensible a cualquier cambio lo cual puede afectar el crecimiento de la plántula (figura 2). Durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que

la presencia de una sustancia tóxica puede alterar de manera negativa la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. (Sobrero & Ronco, 2004)

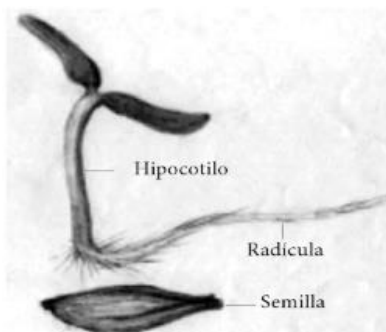


Figura 2. Morfología de las semillas y plántulas en estudio.

Fuente: (Ramírez Romero & Mendoza Cantú, 2008)

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semilla, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración muy bajos que no son suficientes para inhibir la germinación, sin embargo, pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocótilo, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto. (Sobrero & Ronco, 2004)

Por otra parte, el ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla (*Allium cepa*) permite evaluar la inhibición del crecimiento promedio de las raíces, determinando rápida y fácilmente el efecto de las sustancias orgánicas sobre el ADN de los organismos vivos. Los cambios en el ADN son conocidos como aberraciones cromosómicas (AC). Estas aberraciones se caracterizan por los cambios cromosomales que pueden padecer las estructuras genéticas. Las AC pueden ser generadas por varios factores como el rompimiento del ADN o la inhibición de la síntesis y replicación del ADN alterado. Muchas de las AC son resultado de diversas rupturas del ADN entre las que se encuentran efectos clastogénicos cuando se trata de puentes o rompimientos de cromosomas o anaegénicos cuando resultan de mutilaciones, cromosomas pegajosos y multipolaridad. (Restrepro, Reyes, Ortiz, Rojas, & Kouznetsow, 2012)

2.5 Resistencia microbiana

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia a los antimicrobianos es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible. Esto representa un riesgo y una amenaza a la salud humana y animal, dado que, los tratamientos usualmente utilizados se vuelven ineficientes y la transmisión de las infecciones persiste. Sin embargo, esto no solo afecta a la salud humana y animal, sino que también se ve afectada la agricultura, el medio ambiente y el comercio (Ministerio de salud. Gobierno de Colombia, 2018). Uno de los principales efectos incluyen la toxicidad aguda o crónica de especies de plantas y animales expuestos a estos antibióticos, debido principalmente a que la mayoría de los antibióticos se excretan sin metabolizar junto a las bacterias resistentes a través de la orina y heces fecales, llegado así al agua y la tierra, donde se mezclan con bacterias ambientales en presencia de otros contaminantes que pueden ejercer una presión adicional, directa o indirecta, en favor de la selección para la resistencia a los antibióticos. (Acevedo Barrios, Severiche Sierra, & Jaimes Morales, 2015)

2.6 Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

La actividad antimicrobiana se define como la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto planeado frente a un microorganismo. Se basa en la medición de alguna propiedad del compuesto, por ejemplo, su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo. (Pedraza Arias & Castellanos Rivera, 2009)

La propiedad antimicrobiana de los aceites esenciales se atribuye principalmente a la composición química conocida como quimiotipo, en la que intervienen un amplio grupo de compuestos volátiles, como terpenos, alcoholes, aldehídos, cetonas o fenoles. Actualmente, la mayor parte de los estudios realizados sobre la propiedad antimicrobiana de los aceites esenciales se han centrado en microorganismos patógenos para el hombre y aquellos presentes en los alimentos, como lo son las bacterias Gram-positivas (Huerta Lorenzo, 2011).

El mecanismo de acción antimicrobiana de los AE se da en la membrana celular al interferir en la bicapa de fosfolípidos, generando el incremento de su permeabilidad, lo cual ocasiona fugas de iones y otros componentes presentes al interior de la célula. (Yáñez & Cuadro, 2012)

Hoy en día se cuentan con diversos métodos para evaluar la actividad antimicrobiana en sustancias sintéticas como en aceites esenciales. Sin embargo, ni los mecanismos de acción ni los métodos para evaluar la actividad antimicrobiana que tienen los aceites esenciales se han definido completamente. (Reyes Jurado, Palou, & López, 2014) Es por esto, que el método más empleado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) y la concentración mínima bactericida (CBM) es el método de dilución en caldo o en agar (figura 3). La concentración mínima inhibitoria (CIM) se refiere aquella concentración que causa la muerte del microorganismo, por lo que requiere un plaqueo del cultivo que corrobore este hecho y la concentración mínima bactericida (CBM) se define como la concentración más baja que puede eliminar el 99,9% de los microorganismos después de un tiempo de incubación (Sánchez, castillo, & García, 2016).

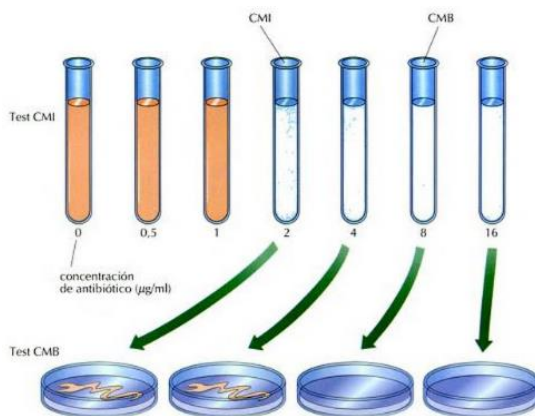


Figura 3. Determinación de CIM y CBM mediante dilución en caldo.

Nota: Prueba de CIM y CBM. Al sembrar en la placa, a partir de los tubos en los cuales no se observa crecimiento (determinación de la CIM), se puede determinar si un compuesto es bacteriostático (detiene el crecimiento) o bactericida (mata al microorganismo). Fuente: (Ingraham & Ingraham, 1998)

El método de micro-dilución en caldo se lleva a cabo en tubos o microplacas con medios líquidos (caldos), los cuales contiene concentraciones crecientes de aceite esencial en el caldo, en el cual se inocula un número definido de células bacterianas. El volumen final de la prueba define si el método se denomina de dilución o de micro-dilución. Posteriormente a la incubación, la presencia de turbidez o sedimentación indica crecimiento del microorganismo. (Reyes Jurado, Palou, & López, 2014). Finalmente, la evaluación de la CBM se realiza una vez haya determinado la concentración mínima inhibitoria. Para establecer CBM es necesario sembrar en agares las diluciones preparadas anteriormente.

Por otra parte, debido a la resistencia que presentan las bacterias a los compuestos antimicrobianos se ha visto afectada su eficiencia. La sobreutilización de los antibióticos y la automedicación han sido las principales causas de que estos microorganismos hayan adquirido inmunidad a los fármacos. Es por esta razón que se ha empezado a profundizar en el estudio del uso de los aceites esenciales con el fin de que estos puedan ser una alternativa en el consumo de los antibióticos debido a que los AE cuentan con una gran variedad de compuestos químicos y propiedades biológicas que pueden ayudar a controlar el crecimiento de microorganismos patógenos.

Los antimicrobianos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de un organismo, posee funciones antibacterianas (Seija & Vignoli, 2008). En la actualidad, se ha notado un aumento alarmante en la tasa de morbilidad debido al incremento de las infecciones causadas por agentes patógenos como las bacterias tales como *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivales*. La mayor parte de estos microorganismos se encuentran en la cavidad oral de las personas y animales, aguas residuales, hospitalarias, urbanas o agrícolas, lodos de aguas residuales y en el estiércol de animales.

2.7 Microorganismos bajo estudio

Las bacterias, pertenecientes al reino procariota, son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria, replicando al mismo tiempo su material genético, de tal manera que cada célula hija tendrá el mismo genoma (Vargas flores & Kuno Vargas, 2014). El tamaño de las bacterias oscila entre 0,5 y 3 μm , pudiendo llegar en algunos casos a 10 μm . las bacterias de interés médico tienen un tamaño entre 0,4 y 2 μm . Solo son visibles al microscopio óptico o microscopio electrónico. La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencias según su forma en cocos, bacilos y espirilos. (Pírez & Mota, 2008)

2.7.1 *Streptococcus mutans*. *Streptococcus mutans* (figura 4), es un coco Gram positivo, se agrupa en cadenas no móviles, anaerobio facultativo y presenta una serie de condiciones para que su crecimiento sea óptimo (tabla 3). Este microorganismo se encuentra comúnmente en la cavidad oral después de la erupción dental, debido a que requiere la presencia de tejido duro para colonizar. Sin embargo, también se puede encontrar en las heces humanas y de algunos animales.

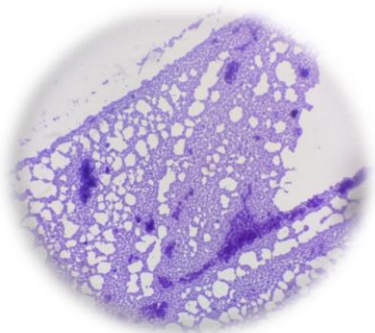


Figura 4. Morfología del *Streptococcus mutans*.

Nota: Morfología del microorganismo *Streptococcus mutans*. Observada en el microscopio (OLYMPUS CX23) a 100X. Fuente: elaboración propia.

Streptococcus mutans es uno de los principales causantes de la carie dental y enfermedades como la periodontitis y endocarditis bacteriana (Gamboa Jaimes, 2014). Además, está relacionado con patologías extraorales como micro hemorragias cerebrales, nefropatía por IgA y aterosclerosis.

(Lemos, y otros, 2019). Con el fin de mitigar la producción de enfermedades causada por esta bacteria se utilizan tratamientos antimicrobianos tales como Penicilina, Amoxicilina, Cefazolina, Clorhexidina, Eritromicina, Clindamicina y Vancomicina. Este último, es el compuesto más utilizado para combatir la acción del *Streptococcus mutans*. (Gamboa , García, Lamby, & Sarralde, 2016).

2.7.2 *Porphyromonas gingivalis*. *Porphyromonas gingivalis* (figura 5), es un cocobacilo anaerobio facultativo Gram negativo, no móvil, asacarolítico, es decir, su alimentación depende de péptidos y aminoácidos y su suministro de hierro es la hemina, forma colonias uniformes de coloración verdosas, pardas o negras debido a la hemina que almacena en la superficie celular, asociado en la patogénesis de la periodontitis (Moreno & Contreras, 2013). Además de ser un factor predominante en la enfermedad periodontal, se ha evidenciado que este microorganismo, puede ser un mediador importante en el desarrollo de una serie de enfermedades crónicas, como la artritis reumatoide y los cánceres aerodigestivos. Igualmente, se han realizado estudios sobre la posible influencia directa e indirecta de *P. gingivalis* en algunas enfermedades sistémicas como la aterosclerosis. (Mysak, y otros, 2014)

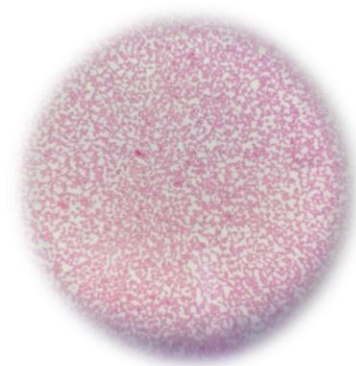


Figura 5. Morfología de Porphyromonas gingivalis.

Nota: Morfología del microorganismo *Porphyromonas gingivalis*. Observada en el microscopio (OLYMPUS CX23) a 100X. Fuente: elaboración propia.

Para combatir y mitigar el daño que causa este microorganismo se emplean tratamientos antimicrobianos. Este tratamiento se basa en el uso de fármacos tales como Penicilina,

Amoxicilina, Ácido Clavulánico, Azitromicina, Ciprofloxacino, Tetraciclinas, Eritromicina, Metronidazol, entre otros medicamentos. (Martínez, 2006). Este último medicamento, es uno de los antibióticos bacteriostáticos actualmente más utilizados para combatir el potencial infeccioso de este patógeno, debido a que presenta muy buena actividad frente a bacilos Gram negativos anaerobios y espiroquetas. Sin embargo, carece de actividad frente a bacterias aerobias y cocos anaerobios, motivo por el cual se recomienda que este medicamento se asocie con otro antibiótico en el tratamiento de algunos procesos infecciosos, especialmente en aquellos de carácter agudo, donde la etiología suele ser mixta. (Liñares & Martín Herrero, 2003)

2.8 Compuestos de referencia

2.8.1 Vancomicina. La Vancomicina es un antibiótico perteneciente al grupo de los glicopéptidos, que aún es activo contra la mayoría de estas bacterias; sin embargo, ya se han descrito cepas de estafilococos y de enterococos resistentes también a este compuesto, con el inconveniente de que en esas condiciones solo quedan pocos fármacos que pueden ser eficaces para mitigar los procesos infecciosos causados por estos patógenos.

La estructura química de la Vancomicina se puede observar en la figura 6. Su peso molecular es de 1449.3 g/mol. Es un compuesto complejo formado por (Damaso 90) un residuo de glucosa, ácido aspártico, N-metil-leucina, ácido 3-metil-4-cetohexanóico, dos grupos ortometil-hidroxibenceno y dos grupos para-metil-hidroxibenceno. (Montañés Pauls, 2009)

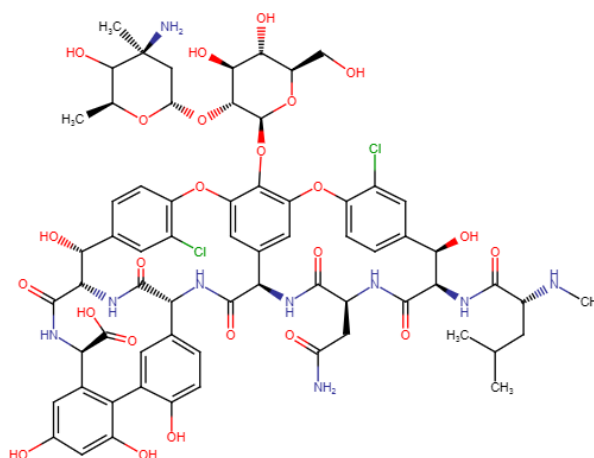


Figura 6. Estructura química de la Vancomicina.

Nota: Estructura química de la vancomicina compuesto de referencia en el estudio de la actividad antimicrobiana de *Streptococcus mutans*. Fuente: (Lorenzo, y otros, 2008)

El mecanismo de acción de la vancomicina se basa en inhibir la síntesis de la pared bacteriana, en un paso anterior al que actúan los beta-lactámicos. El mecanismo específico de acción consiste en unirse a la porción terminal del disacárido pentapéptido, ubicado en la membrana citoplasmática, y de esa manera inhibir a la enzima involucrada en la síntesis de los peptidoglicanos de la pared celular. Causando así debilidad en el peptidoglicano y la célula se torna susceptible a la lisis (Arguedas Quesada, 2006).

2.8.2 Metronidazol. El metronidazol (figura 7) cuyo nombre IUPAC es 2-(2-metil-5-nitro-1H-imidazol-1-il) etanol. Se presenta en forma de polvo cristalino blanco o amarillo pálido, es estable al aire libre, se torna oscuro al estar expuesto a la luz, moderadamente soluble en agua y alcohol, poco soluble en éter, cloroformo, u otros solventes. Su punto de fusión es de 159-163°C y su peso molecular es de 171,2 g/mol. (Loaiza, 2017)

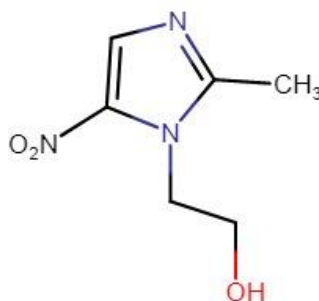


Figura 7. Estructura química del Metronidazol.

Nota: Estructura química del metronidazol compuesto de referencia en el estudio de la actividad antimicrobiana de *Porphyromonas gingivalis*. Fuente: (Lorenzo, y otros, 2008)

El Metronidazol pertenece al grupo de los nitroimidazoles, es un compuesto 5-nitro-imidazol. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de las bacterias anaerobias por su grupo nitro, que puede reducirse mediante una proteína de transporte de electrones en las bacterias anaeróbicas, produciendo así la desestructuración del ADN, ruptura de la cadena e inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y muerte celular. (Ping Ye, 2017)

3 Estado del arte

Debido a la problemática que actualmente se presenta con respecto a la resistencia que han adquirido algunos microorganismos patógenos como *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans* frente algunos agentes antimicrobianos, ha despertado un interés en la comunidad científica por investigar alternativas de origen natural que presenten actividad antimicrobiana, con el fin de mitigar la acción biológica de estos microorganismos. Estos estudios se basan en la obtención, determinación de la composición química y actividades biológicas que presenta los metabolitos secundarios de las plantas.

3.1 *Thymus vulgaris*

El *Thymus vulgaris* (figura 8), es un subarbusto perteneciente a la familia de las Labiadas, es una planta aromática, rica en aceite esencial, cuyo principal componente es el timol. Es una planta

originaria de países mediterráneos occidentales, se conoce comúnmente como tomillo y se utiliza su aceite esencial como un medicamento antiséptico (Gimeno Gasca, 2001).



Figura 8. Planta de tomillo (*Thymus vulgaris*)

Nota: planta de tomillo utilizada para la extracción del aceite esencial a evaluar. Fuente: (Hudak, 2009)

El AE de *Thymus vulgaris* está constituido principalmente por monoterpenos oxigenados (timol, carvacrol y linalool) y monoterpenos hidrocarbonados (γ -terpineno, *p*-cimeno, α -pineno y α -tujueno) (figura 9), también puede contener ésteres acéticos, cetonas y aldehídos. Además de estos compuestos, el tomillo presenta en su composición química compuestos tales como ácidos fenólicos, triterpenos, saponinas, taninos, serpilina y vitaminas B1 y C. (Rosas Gallo & López Malo, 2011)

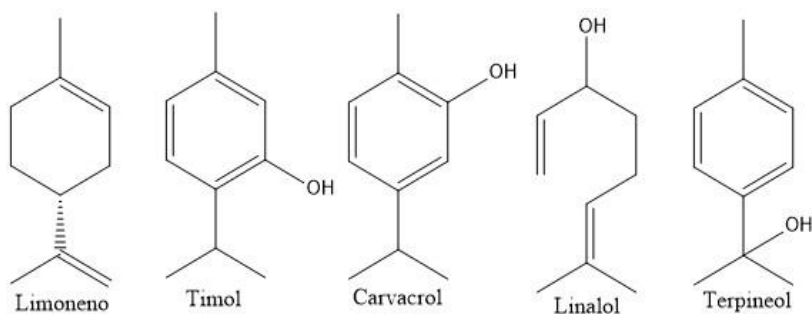


Figura 9. Estructura química de los compuestos mayoritarios del aceite esencial *Thymus vulgaris*

Nota: en la figura 9 se muestran los compuestos mayoritarios que presenta el aceite esencial de tomillo.

Fuente. (Sonmezdag, 2018)

El aceite esencial de tomillo se usa frecuentemente como tónico, carminativo, digestivo, antiespasmódico, antimicrobiano, antioxidante, antiviral, antiinflamatorio, sedante y expectorante. Las principales industrias que demandan el AE de tomillo son farmacéutica, cosmética, veterinaria, agroalimentaria, avícola y ganadera. Las propiedades del AE de tomillo se deben principalmente a sus componentes mayoritarios (timol y carvacrol). El timol conforma el 50% del AE de tomillo, ha sido reportado como agente antimicrobiano, capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias, gracias a que se une a la membrana bacteriana de manera hidrofóbica por puentes de hidrógeno, lo que genera perturbaciones en la membrana, incrementando así la permeabilidad, que conduce a la fuga de iones de potasio y ATP intracelular, y finalmente la muerte celular. También se ha reportado que este compuesto inhibe el crecimiento de esporas y multiplicación celular bacteriana. (Lopez Ambrocio, Ruiz Posada, & Delgadillo Martinez, 2016)

El Carvacrol es un isómero del timol, cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo, su mecanismo de acción es similar al del timol (figura 10). Este componente interactúa con la membrana celular disolviéndose en la bicapa fosfolipídica, lo que causa la desestabilización de la misma, aumentando su fluidez y permeabilidad. La posición orto de su radical hidroxilo le permite actuar como intercambiador de protones, inicialmente se difunde a través de la membrana hacia el citoplasma donde libera su protón, seguido a esto vuelve al exterior de la célula transportando y liberando un catión, y el carvacrol capta un nuevo catión repitiendo el ciclo, causando así disminución de ATP, deterioro de procesos vitales y finalmente la muerte de la célula bacteriana. (Lopez Ambrocio, Ruiz Posada, & Delgadillo Martinez, 2016)

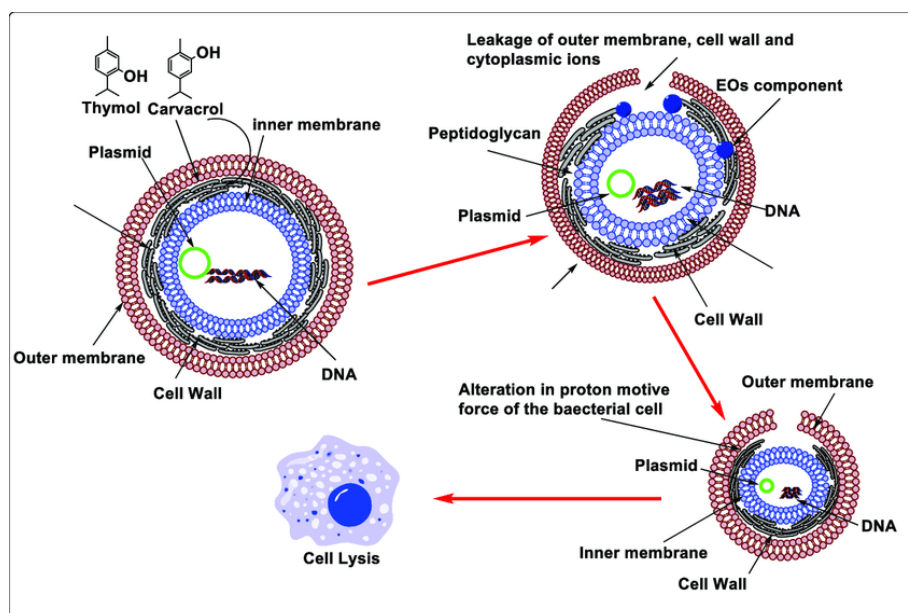


Figura 10. Mecanismo de acción de los compuestos mayoritarios del AE timol y carvacrol

Algunos artículos reportan que la fuerte acción antimicrobiana del timol y carvacrol está asociada a la presencia del radical hidroxilo, debido a que P-cimeno, precursor biológico de estos componentes carece de este hidroxilo y presenta menor actividad. (Lopez Ambrocio, Ruiz Posada, & Delgadillo Martinez, 2016)

Por otro lado, la abundancia de componentes principales y las actividades biológicas que presenta el AE depende en gran medida del quimiotipo de la planta (Homaidan Shmeit, y otros, 2019). El *Thymus vulgaris* posee seis quimiotipos, estos se clasifican según sea el componente mayoritario de su aceite esencial (timol, carvacrol, linalol, geraniol, tuianol o terpineol). Los quimiotipos más destacados del tomillo son el quimiotipo timol, constituido entre 40 y 50% de fenoles, y presenta propiedades antisépticas, antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante y es eficaz contra diversos trastornos de las vías respiratorias, sistemas cardiovascular y nervioso. Por otra parte, el quimiotipo linalool cuenta con una elevada concentración de este compuesto y una concentración muy baja de fenoles, presenta propiedades antisépticas, sin embargo, su acción es más suave, por esta razón es utilizado para infecciones cutáneas. Por último, el quimiotipo tuianol tiene una concentración de 25-40% de tuianol y carece de fenoles, este quimiotipo presenta

acciones antisépticas, tonificantes y regeneradoras de hepatocitos. (Quevedo, LOS QUIMIOTIPOS DEL TOMILLO, 2018)

El aceite esencial del tomillo es efectivo contra agentes patógenos como lo es *Porphyromonas gingivalis*, el cual es causante de enfermedades como la periodontitis y algunas de carácter sistémico. El extracto del tomillo desestabiliza y penetra las membranas de las células bacterianas interfiriendo con la función de la membrana, inhibiendo el paso de oxígeno, lo que ocasiona una reducción de los niveles de ATP y la muerte celular (Rovetto, y otros, 2009). Así mismo, uno de los componentes mayoritarios del aceite esencial del tomillo (timol) ejerce un efecto antimicrobiano frente a *Streptococcus mutans*. Esto se debe a la perturbación de la fracción lipídica de la membrana plasmática bacteriana que resulta en la fuga del material intracelular. (Marchese, y otros, 2016). Algunos estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana de este aceite se pueden observar en la tabla 1.

Teniendo en cuenta la revisión bibliográfica realizada, se puede concluir que el aceite esencial de tomillo presenta un efecto antimicrobiano frente a microorganismos patógenos tales como *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*, debido a la presencia de diferentes compuestos tales como timol, carvacrol, linalool, γ -terpineno, p-cimeno, α -pineno, entre otros, a los que se les otorga en diferentes estudios esta actividad biológica.

Tabla 1. Estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*

ESTUDIO	MÉTODO	RESULTADOS	BIBLIOGRAFÍA
Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> frente a <i>Porphyromonas gingivalis</i>	Difusión de agar	MIC: 0,31mg/mL MBC: 0,37mg/mL	(Lagos, 2012)
Revisión bibliográfica de la actividad antimicrobiana y antifúngica del compuesto mayoritario (timol) del aceite esencial <i>Thymus vulgaris</i>	Microtitulación en placa	MIC: 125 µg/ml	(Marchese, y otros, 2016)
In Vitro Antimicrobial Activity of <i>Thymus vulgaris</i> Essential Oil Against Major Oral Pathogens	Microdilución de caldo y Difusión de disco de agar	<i>S. mutans</i> MIC: 3.6 µg / mL <i>P.gingivalis</i> MIC: 16-256 µg / mL	(Fani & Kohanteb, 2017)
Antibacterial activity of essential oils against strains of <i>Streptococcus</i> and <i>Staphylococcus</i>	Microdilución en placa	MIC: 0.25% MBC: 0.25%	(Freire, y otros, 2014)
The chemical composition of the pharmacologically active <i>Thymus species</i> , its antibacterial activity against <i>Streptococcus mutans</i> and the antiadherent effects of <i>T.vulgaris</i> on the bacterial colonization of the <i>in situ</i> pellicle	Microdilución en caldo y difusión en agar	CIM: 750 µg / mL	(Schött, y otros, 2017)

3.2 *Elettaria cardamomum*

Elettaria cardamomum es una planta herbácea perteneciente de la familia *Zingiberácea*, originaria de los bosques de la India, crece en bosques lluviosos a temperaturas entre los 10 y 35°C, es una planta perenne con raíces hasta de 1,5 m de largo y tallos de 2 a 4 metros de altura, sus flores crecen en los nudos de los tallos, su fruto es una cápsula oblonga, terminando en un ápice corto, este mide entre un rango de 0,5 a 2,5 cm de largo, dentro de cada cápsula se aproximadamente entre 15 a 26 semillas. (Villada Ramírez, y otros, 2017). La semilla de *Elettaria cardamomum*

(figura 11) está constituida por compuestos fitoquímicos como esteroides, ácidos fenólicos, lípidos, almidón, flavonoides, proteínas y aceite esencial.



Figura 11. Semilla de *Elettaria cardamomum*

Nota: Semilla donde se extrae el aceite esencial de *Elettaria cardamomum*. Fuente: (Gil Pavas & Sáez Vega, 2008)

El aceite esencial de cardamomo se constituye principalmente de monoterpenos oxigenados que representan el 71,4% de los compuestos mayoritarios del aceite esencial. (Noumi, 2018). Algunos de los compuestos mayoritarios del aceites esencial son acetato de α -terpenilo (28,6-50%), linalol (5-10%), limoneno (2,5%), 1,8-cineol (55%), entre otros. (Anwar, Abbas, Alkharfy, & Gilani, 2016) Estos componentes volátiles (figura 12) permiten que el aceite esencial de cardamomo presente actividades, tales como antioxidante, antihipertensivo, gastro protector, analgésicas, antiinflamatorias, antiespasmódicas y antibacteriano.

Por otra parte, el aceite esencial de cardamomo es utilizado para el tratamiento de encías, los dientes, infecciones en la garganta, congestión en los pulmones, tuberculosis pulmonar, alta presión arterial, enfermedades de corazón y trastornos digestivos. Además, este aceite esencial es ampliamente utilizado como agente saborizante en la preparación de dulces, productos de panadería, en la industria de alimentos, en la industria cosmética se utiliza para la preparación de perfumes, licores e industria farmacéutica como odorizante de drogas y en medicamentos que estimulan las funciones gastrointestinales. (Hassan Sereshti, 2012)

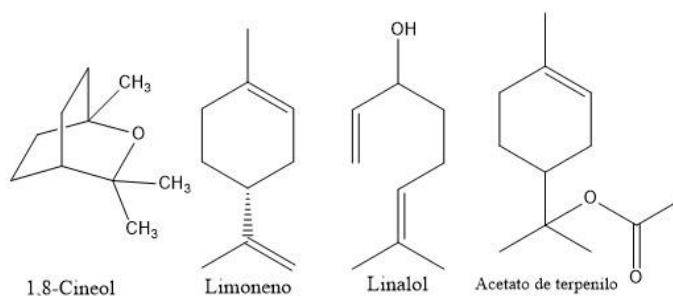


Figura 12. Estructura química de los compuestos mayoritarios del aceite esencial *Elettaria cardamomum*.

Nota: compuestos químicos mayoritarios presentes en el aceite esencial de cardamomo. Fuente: (Noumi, 2018)

La actividad antibacteriana del aceite esencial de cardamomo se atribuye a su compuesto mayoritario 1,8-cineol, el cual inhibe la síntesis de peptidoglicanos (Ogunlana, Hoeglund, Onawunmi y Skoeld, 1987), lo cual genera daños en las estructuras de la membrana microbiana (Cox, Mann, Bell y Warmington, 2000) y modifica la hidrofobia de la superficie de la membrana bacteriana (Turi, Turi, Koljal y Mikelsaar, 1997). (El Malti, Mountassif, & Amarouch, 2007)

Se han realizado estudios sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de cardamomo, demostrando así una actividad antimicrobiana significativa contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos evaluados. Sin embargo, no se ha reportado investigaciones de la actividad antimicrobiana de este aceite frente a los microorganismos de interés (*Porphyrromonas gingivali* y *Streptococcus mutans*). Algunos estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana de este aceite se pueden observar en la tabla 2.

Tabla 2. *Estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Elettaria cardamomum*

<i>ESTUDIO</i>	<i>MÉTODO</i>	<i>RESULTADOS</i>	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>
Evaluation of the single and combined antibacterial efficacy of essential oils for controlling <i>Campylobacter coli</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , and mixed cultures	Microdilución en placa	MIC: 0,012-15,00 y 3,75-15,00 µL/ml	(Mutlu-Ingok, 2019)
Antimicrobial activity of essential oils and extracts from <i>black pepper</i> , <i>cumin</i> , <i>coriander</i> and <i>cardamom</i> against some pathogenic and saprophytic microorganisms	Difusión de agar	MIC: 600 ppm	(Teneva, 2015)

4 Metodología experimental

El presente proyecto contempla las siguientes etapas experimentales: obtención y caracterización de los aceites esenciales, evaluación de las actividades biológicas: antimicrobiana y fitotoxicidad de los aceites esenciales. En la figura 13 se presenta un esquema experimental del trabajo de investigación.

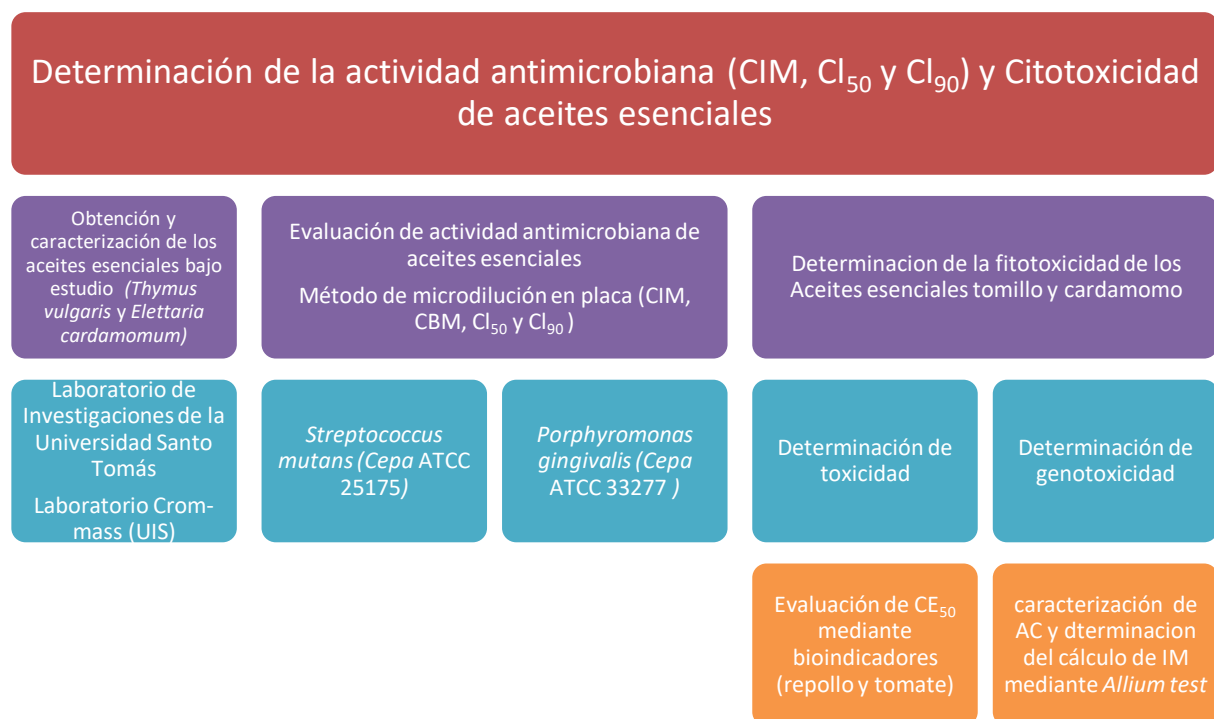


Figura 13. Descripción de las etapas del proceso experimental para el estudio de la actividad antimicrobiana y fitotóxica de los aceites esenciales en estudio.

4.1 Obtención y caracterización aceites esenciales

Se empleó material fresco de las especies vegetales para la obtención de aceites esenciales de plantas pertenecientes a las familias labiadas y zingiberáceas; se aprovechó todas las partes de la planta incluyendo hojas, tallo y flores en el caso de *Thymus vulgaris* y Semillas para el caso de *Elettaria cardamomum*. Los aceites esenciales bajo estudio se obtuvieron mediante hidrodestilación asistida por microondas. Se realizaron 3 extracciones de 20 minutos con un intervalo de 10 minutos de descanso entre cada extracción a una potencia de 40W. La cantidad de veces que realizó el proceso de extracción del material vegetal estuvo determinada por el rendimiento del aceite, este proceso se realizó hasta obtener aproximadamente 8 mL de muestra. Una vez extraído el aceite esencial de cada planta se procedió a determinar su rendimiento, éste se calculó mediante la ecuación 1.

Ecuación 1. Rendimiento de aceites esenciales

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{gramos de AE obtenido}}{\text{gramos de biomasa}} \times 100$$

A continuación, en la figura 14 se puede observar el procedimiento realizado para la obtención de aceite esencial de tomillo y cardamomo empleando el equipo de hidrodestilación asistida por microondas, el cual se encuentra disponible en el Laboratorio de Investigación Ambientales de la Universidad Santo Tomás, seccional Bucaramanga.



Figura 14. Procedimiento de obtención de AE de tomillo y cardamomo empleado el método de hidrodestilación asistida por microondas.

Nota: etapas realizadas para la obtención de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Elettaria cardamomum*. Inicialmente se recolectó el material vegetal fresco y se procedió a pesar aproximadamente 200 g, seguido de esto, se traspasó el material vegetal previamente pesado a un balón fondo redondo de 2000 mL y se le adicionó 1000 mL de agua, luego, se realizó el montaje del balón en el equipo de hidrodestilación asistida por microondas y se llevó a cabo la obtención de la muestra. Finalmente se obtuvo aproximadamente 8 mL de cada aceite esencial y se almacenaron en frascos ámbar.

La caracterización química de los aceites esenciales se realizó mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, esto se llevó a cabo mediante la

modalidad de servicios técnicos en el Laboratorio CROM-MASS de la Universidad Industrial de Santander.

Las condiciones que se llevaron a cabo para el análisis de las muestras de aceites esenciales. Método acreditado con la ISO/IEC 17025:2005 por el **ONAC**, con el código de acreditación 10-LAB-067: Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS); documento normativo: Norma ISO 7609-1985 (E): *Essential oils – Analysis by gas chromatography on capillary columns – general method*; empleando como material de referencia la mezcla certificada de hidrocarburos $C_6 - C_{25}$ (*AccuStandard, new haven, CT*). La preparación de las muestras se realizó por dilución e inyección directa de los aceites esenciales al equipo cromatográfico. El análisis cromatográfico se efectuó en un cromatógrafo de gases AT 6890 *Series plus* (*Agilent technologies, palo alto, California, EE. UU.*), acoplado a un detector selectivo de masas (*Agilent technologies, MSD 5975*) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*). La columna empleada en el análisis fue DB-5MS (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE. UU.*) [5%-fenil-poli(dimetilsiloxano), 60m x 0,25 mm x 0,25 μ m]. La inyección se realizó en modo *Split* (30:1), $V_{iny} = 2 \mu$ L.

4.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales

La evaluación de la actividad antibacteriana para los respectivos aceites esenciales frente a *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans* se realizó según lo establecido en el protocolo M7-A9 (NCCLS) de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el protocolo del Laboratorio de Investigación y Ciencias Básicas de la Universidad Santo Tomás, Seccional Bucaramanga (CLSI, 2012). En la figura 15 se ilustra el procedimiento experimental que se llevó a cabo para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en estudio.

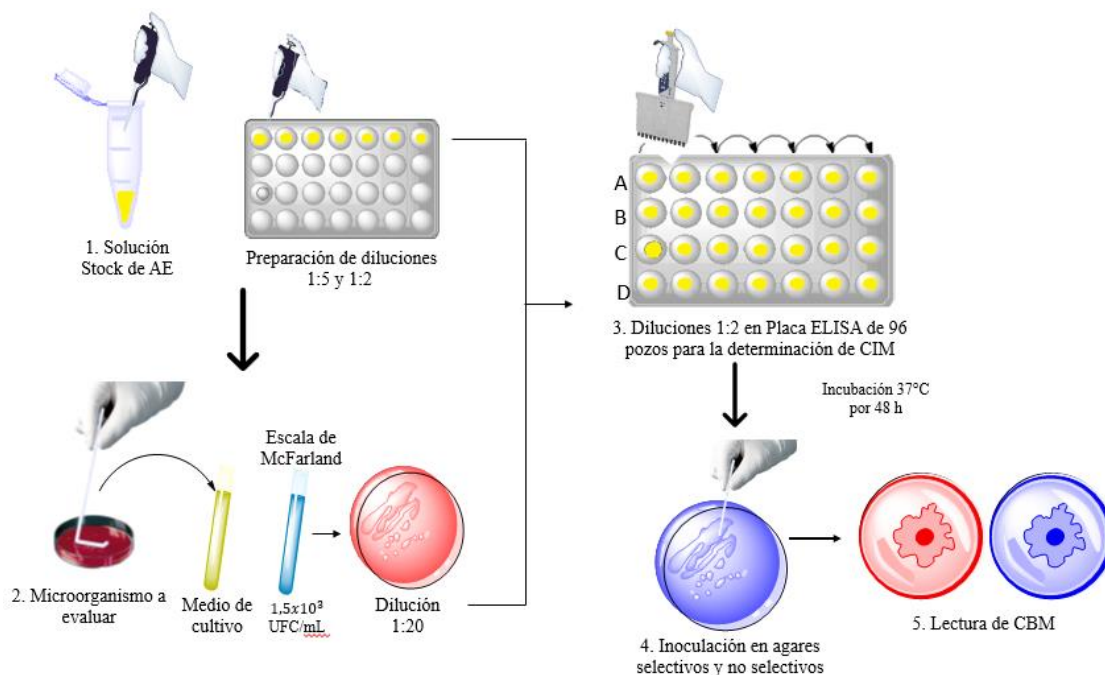


Figura 15. Procedimiento experimental para la determinación de la actividad antimicrobiana (CIM y CBM) de los aceites esenciales de tomillo y cardamomo.

Nota: En la figura 15 se explica las gestiones realizadas para la determinación de la actividad antimicrobiana de los AE en estudio. 1) preparación de los medios donde se llevará a cabo el cultivo de los microorganismos de interés. 2) a partir de la solución *stock* de los AE de tomillo y cardamomo se realizó las diluciones 1:5 y 1:2 de estos AE en una placa de 24 pozos, 3) preparación del inóculo, teniendo en cuenta la escalada de McFarland, 4) dilución seriada 1:2 del medio de cultivo en placa ELIZA de 96 pozos y determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los AE, 5) inoculación de los pozos seleccionados en agares selectivos y no selectivos, 6) determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) de los AE.

4.3 Microorganismos de interés

Las cepas que se emplearon para la determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales son las siguientes: ATCC 33277 para el microorganismo *Porphyromonas gingivalis* y ATCC 25175 para *Streptococcus muntans*, estas fueron crio preservadas y subcultivadas previo a los ensayos, esto se ejecutó con el fin de garantizar que todas las cepas a estudiar provinieran del

mismo lote. Cada microorganismo cuenta con unas condiciones especiales para su crecimiento, estas condiciones se describen en la tabla 3.

Tabla 3. *Condiciones de crecimiento y cultivo de las cepas de estudio*

Microorganismos	ATCC	Medio de Cultivo	Atmosfera de incubación	Tiempo de incubación	Temperatura de incubación (°C)	Colonia	Coloración	Textura	Tinción
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	3327 7	Agar sangre o Agar columbi a	Anaerob ia: 80% N2, 10% CO2 y 10% H2	7-14 días	37	Esféricas	amarillo crema, después de 4 días toma coloración negra	Lisas	Gram negativo: rosado
<i>Streptococcus mutans</i>	2517 5	Agar Mitis Salivari us y Agar Sangre	Anaerob ia: 95% N2 y 5% CO2	24-48 horas	37	Esféricas u Ovaladas	Moradas as mucosas y opacas	Esponjosas, mucosas y opacas	Gram positivo: morado

4.4 Evaluación de aceites esenciales y compuestos de referencia.

4.4.1 Compuestos de referencia. Los compuestos de referencia se seleccionaron mediante estudios previos y revisiones bibliográficas. Los antimicrobianos que se emplearon fueron el metronidazol comercial (AMEGIAR, casa comercial: Coasphama S.A.S., Colombia) y vancomicina (casa: Sigma-Aldrich, 99,9% de pureza, Saint Louis, EE. UU.).

La purificación del antimicrobiano metronidazol se realizó mediante la disolución de tres tabletas de 500 mg en 150 mL de acetona, seguido de esto, se agregaron 1,5212 g de carbón activado y se agitó durante 15 minutos. Una vez obtenida la solución se procedió a filtrar y

rotoevaporar con el fin de eliminar el solvente, posteriormente, se cristalizó el sólido obtenido añadiendo 20 mL de n-heptano y dejando la solución en un baño de agua-hielo durante 20 minutos. A continuación, se filtró la muestra obtenida y se secó en una mufla a 120°C durante 20 minutos. Finalmente se pesó la muestra seca obteniendo así 0,5905 g de metronidazol. (JoVE Science Education Database.Organic Chemistry. , 2019). Por otra parte, no fue necesario realizar un procedimiento de purificación para el compuesto de referencia vancomicina ya que este cuenta con un 99,9 % de pureza.

La caracterización de los compuestos de referencia se llevó a cabo en un espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier (SHIMADZU), modelo IRAffinity-1 (figura 16) con software IRPrestige-21 y una pastilla de KBr para la realización de la mezcla previa de cada muestra de antimicrobiano. Este equipo se encuentra disponible en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Santo Tomás, seccional Bucaramanga.



Figura 16. Espectrofotómetro infrarrojo de transformada de Fourier (SHIMADZU), modelo IRAffinity-21.

4.4.2 Determinación de concentraciones de aceites esenciales y compuestos de referencia. Los rangos de concentración que se utilizaron para los aceites esenciales y los compuestos de referencia se determinaron mediante un proceso de solubilidad entre el aceite esencial de interés y el solvente dimetilsulfóxido (DMSO 99%) el cual fue ajustado 10 veces la primera concentración a evaluar en el ensayo de actividad antimicrobiana, obteniendo así una concentración final de DMSO de 0,38%. Esta concentración fue menor al 2%, lo cual no genera ningún riesgo para los microorganismos evaluados. Con respecto a los compuestos de referencia, la solución stock se preparó diluyendo el antimicrobiano en el medio de cultivo correspondiente.

Por otra parte, para la evaluación de las soluciones de los aceites esenciales se prepararon diluciones 1:2. Los rangos de concentración que se emplearon para evaluar los aceites esenciales se tomaron del protocolo establecido por la NCCLS y de revisiones bibliográficas. En la tabla 4 se presentan los rangos de las concentraciones evaluadas para cada compuesto de referencia y aceite esencial.

Tabla 4. Concentraciones por evaluar para los aceites esenciales y compuestos de referencia.

COMPUESTOS	<i>Porphyromonas gingivalis</i>		<i>Streptococcus mutans</i>	
	CONCENTRACIÓN INICIAL (µg/mL)	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)	CONCENTRACIÓN INICIAL (µg/mL)	CONCENTRACIÓN FINAL (µg/mL)
Tomillo	2000	0,98	3000	1,46
Cardamomo	2000	0,98	2000	0,98
Vancomicina	-	-	512	0,25
Metronidazol	256	0,12	-	-

4.5 Determinación de la concentración inhibitoria mínima

Para la determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales frente a los microorganismos patógenos *P. gingivalis* y *S. mutans*, se tuvieron en cuenta las condiciones de crecimiento de cada uno de estos (tabla 5).

Tabla 5. Condiciones de crecimiento para la determinación de la concentración inhibitoria mínima

<i>Microorganismo</i>	<i>Medio de cultivo en placa ELISA</i>	<i>Tiempo de incubación (h)</i>	<i>Temperatura de incubación (°C)</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	BHI con 1% de sacarosa	24-48	37
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	BHI	48	37

La evaluación de la CIM para cada uno de los aceites se realizó mediante el método de microdilución en placa. Se emplearon placas de ELISA de 96 pozos (figura 17). Esta placa incluye

pozos para cada aceite esencial, control positivo (50 μL de caldo específico para cada microorganismo + 50 μL de inóculo de concentración $1,5 \times 10^8$ microorganismos/mL), control negativo (50 μL caldo específico de cada microorganismo) y compuestos de referencia. Posteriormente, las placas fueron incubadas teniendo en cuenta las condiciones establecidas en la tabla 5. Finalmente, se determinó la CIM de manera visual iniciando desde el pozo de menor concentración.

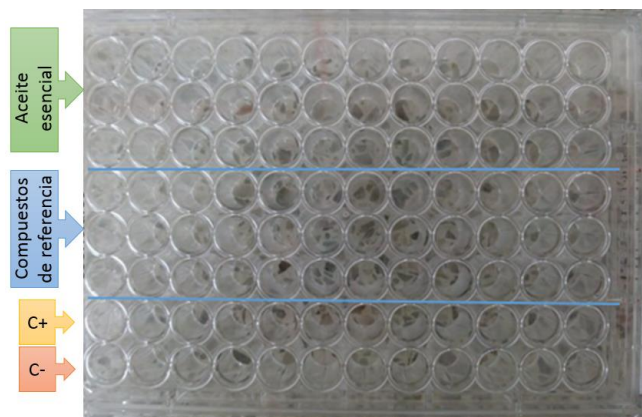


Figura 17. Distribución de la placa de ELISA de 96 pozos.

Nota: montaje de los aceites esenciales, controles positivo y negativo en una placa de ELISA de 96 pocillos. Disponible en el Laboratorio de Investigaciones Ambientales de la Universidad Santo Tomás, Seccional Bucaramanga.

Así mismo, se determinó la concentración bactericida mínima (CBM), la cual es la concentración mínima capaz de inducir la muerte *in vitro* del 99,9% de la población microbiana inicial. (Andrews, 2001). Para ello se seleccionaron los pozos que se encontraban en el rango evaluado de la CMI. Posterior a esto, se sembraron entre 6 a 8 pozos de cada muestra en agares selectivos y no selectivos siguiendo los parámetros establecidos en la NCCLS M7-A9 y condiciones establecidas en la tabla 3 para cada microorganismo. Finalmente, se realizó la lectura correspondiente de los resultados obtenidos para las placas de menor concentración de cada solución donde no se observó crecimiento bacteriano. Todos los ensayos se realizaron por triplicados y se validaron a partir de los resultados obtenidos en CIM y CBM de los compuestos de referencia.

4.6 Determinación de la fitotoxicidad de los aceites esenciales.

4.6.1 Ensayo de toxicidad en *Allium cepa*. Se escogió una cantidad determinada de cebollas moradas de tamaño pequeño, teniendo en cuenta que su tamaño fuera similar entre ellas. Seguido a esto, se les retiró la primera capa y su base radicular teniendo cuidado de no eliminar las raíces, luego se sumergieron en agua comercial durante 30 minutos. Pasado este tiempo, cada cebolla se puso en contacto con cada solución de aceite esencial previamente preparadas de concentraciones de 1,10,100,1000 y 10000 ppm, control negativo y control positivo. Posterior a esto, se dejaron en la oscuridad durante un periodo de tiempo de 5 días, esto con el fin de permitir un nuevo desarrollo radicular.

Transcurrido este periodo de tiempo, se procedió a determinar la CE_{50} y el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces (figura 18), esto se realizó mediante la comparación de la longitud de las raíces en cada concentración de aceite esencial y las raíces que se crecieron en el control positivo (DMSO) y negativo (Agua comercial).



Figura 18. Crecimiento de las raíces al transcurrir los 7 días de contacto con los aceites esenciales y controles.

Finalmente, se determinaron las Aberraciones Cromosómicas y se calculó del índice Mitótico (IM) de los aceites esenciales mediante el siguiente procedimiento. Se cortó el ápice de las raíces que midieron menos de 2,5 cm que surgieron en los bulbos de cebolla expuestos a cada concentración evaluada. Los ápices se expusieron a una solución de HCl 6N por 25 minutos, con el fin de romper la pared celular. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua comercial y se sumergieron en aceto-orceína durante 20 minutos. Esto permitió observar los cromosomas en las distintas fases del ciclo mitótico. Una vez transcurrido el tiempo de exposición con el colorante, se depositaron los ápices sobre una lámina porta objetos, una gota de colorante, se cubrió con una lámina cubre objetos y se ejerció presión sobre esta con el objetivo de que el tejido se expandiera sobre la lámina porta objetos. A continuación, se observó en el microscopio (OLUMPUS CX24, modelo CX23LED RFS2) con un objetivo de 40x identificando las fases de la división celular. (Hister, Laughinghouse, Da Silva, Do Canto Dorow, & Tedesco, 2009). Por último, se calculó el índice mitótico aplicando la ecuación 2 y se identificaron las aberraciones cromosómicas presentes en las etapas mitóticas (ecuación 3).

Ecuación 2. Índice mitótico.

$$IM = \frac{\text{Número de células en división}}{\text{Número total de células}} * 100$$

Ecuación 3. Cálculo de Aberraciones cromosómicas

$$\% AC = \frac{\text{Número total de aberraciones celulares}}{\text{Número total de células en división}} * 100$$

4.6.2 Ensayo de toxicidad con semillas. Se seleccionaron aproximadamente seis cajas de Petri y se adicionaron en cada una de ellas 20 semillas de *Brassica oleracea* (Envasado y Comercializado por ANASAC S.A.C.e.I. Chile. Importado por Semillas Arroyave S.A.S. Resolución ICA N° 003573 del 12 de agosto del 2013. Distribuido por ANASAC Colombia Ltda. Lote 6003CIN10) (figura 19) sobre un papel de filtro. Seguido a esto, se procedió agregar aproximadamente 2 mL de las soluciones de los aceites esenciales previamente preparadas a una concentración definida (1,10,100 y 1000 ppm), a continuación, se sellaron con vinilpex y papel

aluminio y se colocaron en un sitio fresco ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) y a oscuras durante un periodo de tiempo de 5 días.



Figura 19. Montaje y semillas empleadas para la determinación de fitotoxicidad de los aceites esenciales de tomillo y cardamomo.

Trascurrido este tiempo, se procedió a determinar el porcentaje de crecimiento de las raíces y embriones de las semillas mediante la medición de la longitud de las raíces y los embriones en cada concentración evaluada y en el control negativo. Una vez obtenidos los resultados se estableció la CE_{50} . Este procedimiento se realizó de igual manera para las semillas de *Lycopersicon esculentum*.

5 Consideraciones Éticas

De acuerdo con lo descrito en el título IV, capítulo I de la resolución 8430 de 1993 con respecto a la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos, se garantiza que la Universidad Santo Tomás cuenta con laboratorios de seguridad microbiológica y cumple a cabalidad con lo establecido en el artículo 63, es decir, el laboratorio debe contar con instalaciones y equipos adecuados y normas técnicas que garantizan la correcta manipulación de los microorganismos. El proyecto deberá seguir el protocolo señalado en el artículo 67

denominado “*National committe For Clinical Laboratory Standars*”, (NCCLS). De acuerdo con lo establecido en este artículo, se verificará el riesgo que presentan los microorganismos para los investigadores y para el personal en general.

6 Análisis y Resultados

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en la parte experimental del trabajo de grado; “Estudio de la composición química y actividad biológica de aceites esenciales de Cardamomo (*Elettaria cardamomum*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*) y su respectivo análisis”.

6.1 Obtención y caracterización de aceites esenciales de *Elettaria cardamomum* y *Thymus vulgaris*

La obtención del aceite esencial de tomillo se realizó mediante la técnica de hidrodestilación asistida por microondas. El porcentaje de rendimiento de AE de la planta de tomillo obtenido experimentalmente fue de 0,256%. Al comparar este resultado con el porcentaje de rendimiento reportado en la literatura (0,2%), se determinó que el AE de tomillo obtenido experimentalmente presenta un porcentaje de rendimiento similar al establecido por López Ambrocio, Delgadillo Martínez y Ruiz Posadas en 2015. (López Ambrocio, Delgadillo Martinez, & Ruiz Posadas, 2015).

Por otra parte, para la obtención del aceite de cardamomo se empleó el método de destilación por arrastre de vapor (CENIVAM), bajo las siguientes condiciones experimentales: Presión de caldera: 80 psi, temperatura del destilador 96-98°C, flujo del condensador: 800 mL/min, tiempo de destilación 90 minutos, densidad de empaquetamiento del material vegetal: 230 kg/m³. Los compuestos mayoritarios presentes en el AE de tomillo, se presenta en la tabla 6. Estos se identificaron empleando la técnica analítica GC-MS.

Tabla 6. Composición química del aceite esencial de tomillo determinado mediante GC-MS

<i>T_R</i> , min	<i>Identificación tentativa</i>	<i>Cantidad relativa, %</i> 988833-04-AI
		Tomillo
9,95	Metilbutanoato de metilo	0,3
16,44	1,7,7-Trimetiltriciclo[2.2.1.0,2,6] heptano (Triciclono)	0,1
16,56	α -Tujeno	2,1
16,93	α -Pino	1,6
17,70	Canfeno	1,3
18,88	Octenol	1,6
18,93	β -Pino	0,5
19,11	Octanona	0,1
19,31	β -Mirceno	2,2
19,60	Octanol	0,3
20,14	α -Felandreno	0,3
20,25	Δ^3 -Careno	0,2
20,62	α -Terpineno	3,0
21,07	<i>p</i>-Cimeno	20,2
21,22	Limoneno	0,9
21,37	1,8-Cineol	2,0
21,76	<i>trans</i> - β -Ocimeno	< 0,1
22,45	γ-Terpineno	10,5
22,90	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	1,6
23,14	Nonenol	0,1
23,49	Terpinoleno	0,3
23,67	<i>p</i> -Cimeneno	0,1
24,03	Linalol	5,4
24,18	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	0,7
25,11	<i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol	0,1
26,12	Alcanfor	0,7
26,21	Borneol	0,4
27,09	<i>endo</i> -Borneol	2,7
27,25	Butanoato de hexenilo	0,1
27,35	Terpinen-4-ol	1,4
27,85	α -Terpineol	0,1
27,95	Compuesto NI, <i>m/z</i> (%):136 (39), 121 (50), 93 (61), 81 (41), 59 (100), 43 (34)	0,4
28,10	<i>trans</i> -Dihidrocarvona	0,2
29,01	Timol metil éter	1,9

Continuación Tabla 6

29,37	Carvacrol metil éter	1,6
29,90	Geraniol	0,3
31,34	Timol	21,2
31,56	Carvacrol	2,3
33,26	Acetato de timilo	0,1
34,49	Ylangeno	0,1
34,62	Propionato de isobornilo	0,1
34,74	α -Copaeno	0,1
35,10	β -Bourboneno	0,2
36,49	<i>trans</i> - β -Cariofileno	5,3
36,76	Compuestos NI, <i>m/z</i> (%): M^+ 204 (2), 189 (1), 166 (35), 151 (100), 133 (28), 119 (7), 105 (31), 91 (13), 77 (16)	0,6
37,09	Aromandendreno	< 0,1
37,18	<i>trans</i> - β -Farneseno	< 0,1
37,67	α -Humuleno	0,5
37,84	γ -Muuroleno	0,1
38,12	Cadina-1(6),4-dieno	< 0,1
38,20	γ -Amorfenol	0,4
38,35	δ -Amorfenol	< 0,1
38,49	Gemacreno D	0,1
38,79	Eremofileno	0,1
38,94	α -Muuroleno	0,2
39,13	β -Bisaboleno	0,2
39,46	γ -Cadineno	0,5
39,55	β -Cadineno	0,5
39,69	Calameneno	0,1
40,16	α -Cadineno	< 0,1
40,29	<i>p</i> -Cimen-2,5-diol	0,1
40,41	Butanoato de geraniol	< 0,1
41,67	Óxido de Cariofileno	1,0
42,51	<i>epi</i> -Cubenol	0,1
42,80	γ -Eudesmol	0,1
43,20	α - <i>epi</i> -Cadinol	0,1

Nota: datos analizados por el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS, de la Universidad Industrial de Santander.

De acuerdo con la información de la anterior tabla, los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Thymus vulgaris* son timol (21,2%), *p*-cimeno (20,2%) y γ -terpineno (10,5%). Así mismo, el AE de tomillo cuenta con una gran variedad de compuestos, los cuales se encuentran en menor concentración, los cuales, pueden generar un efecto sinérgico, aumentando así la actividad antimicrobiana del aceite esencial. Algunos de estos son: α -Pineno, limoneno 1,8-cineol, linalool, borneol, geraniol y carvacrol. (Abdulrahman khazim , Md Tanwir, Ahmed Abdullah, & Mohammend Salim, 2017). El respectivo perfil cromatógrafico se presenta en la figura 20.

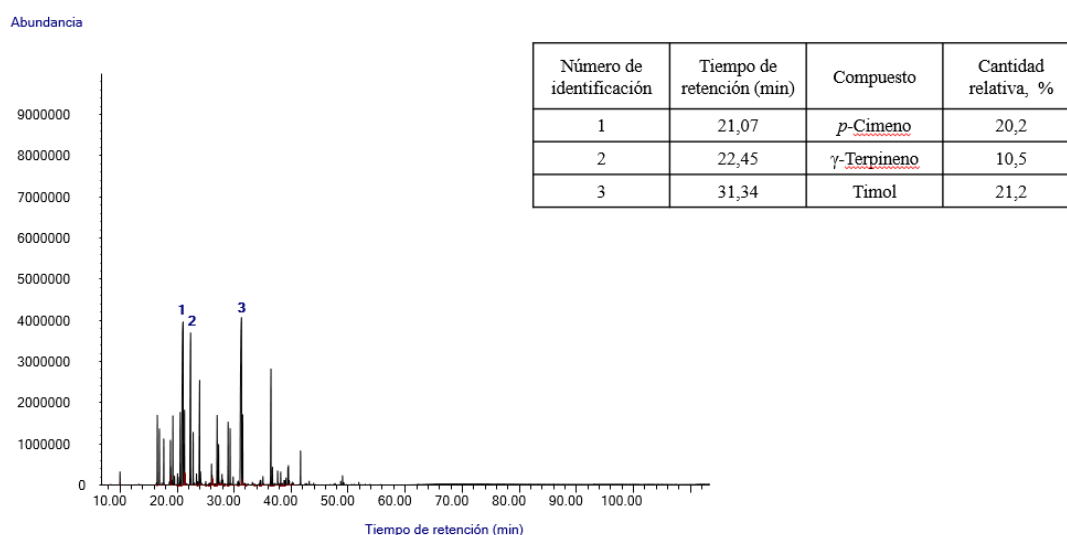


Figura 20. Corriente iónica total reconstruida del AE de tomillo analizada por GC-MS operado en el modo *full scan*.

La figura 21 muestra la fragmentación propuesta para timol, componente en mayor proporción del AE de tomillo. El espectro de GC-MS de este compuesto presenta el pico del ion molecular a un $m/Z=150$. Este al perder el radical hidroxilo, se genera el catión con $m/Z=135$. A partir de este catión se obtiene la molécula con $m/Z=91$, debido a la ausencia de un radical isopropilo. Finalmente, el ion molecular al perder un radical isopropilo y al darse un reordenamiento en el anillo aromático, se forma el catión $m/Z=115$.

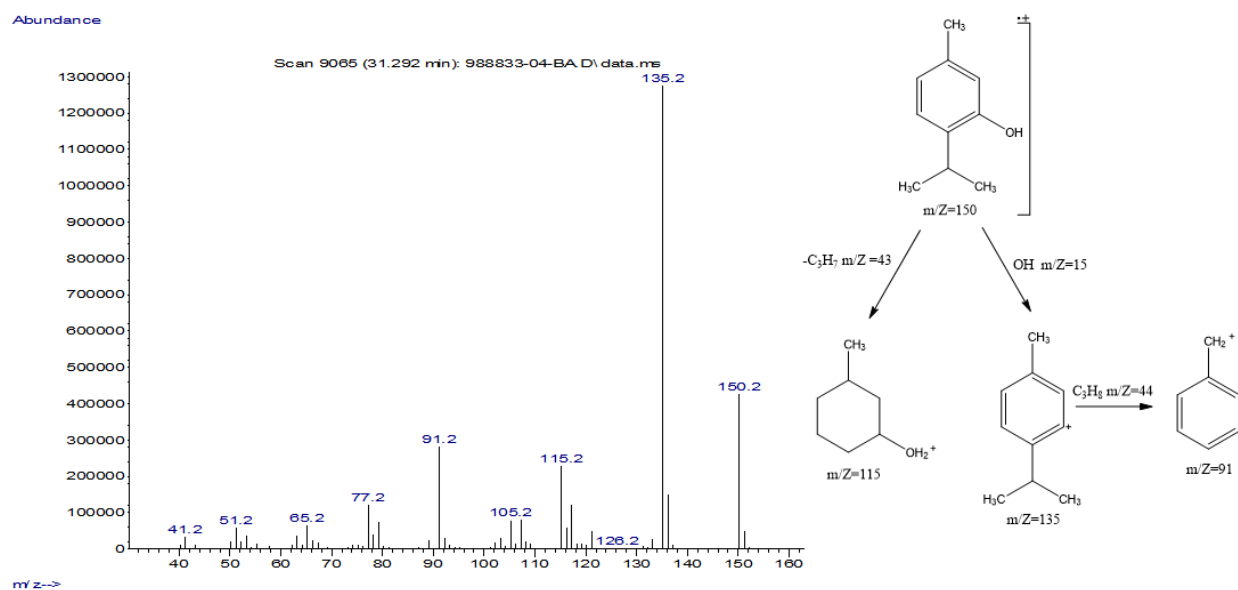


Figura 21. Espectro de masas para el compuesto mayoritario timol presente en el AE de tomillo

La figura 22 presenta la fragmentación propuesta para *p*-cimeno. De acuerdo con los picos más intensos en el cromatograma, se propone el ion molecular a un m/z =134, por la pérdida del radical metilo se deriva el pico con m/z =119. Finalmente, el ion molecular al perder el radical isopropilo ($-C_3H_7$) se obtiene el catión con m/z =91.

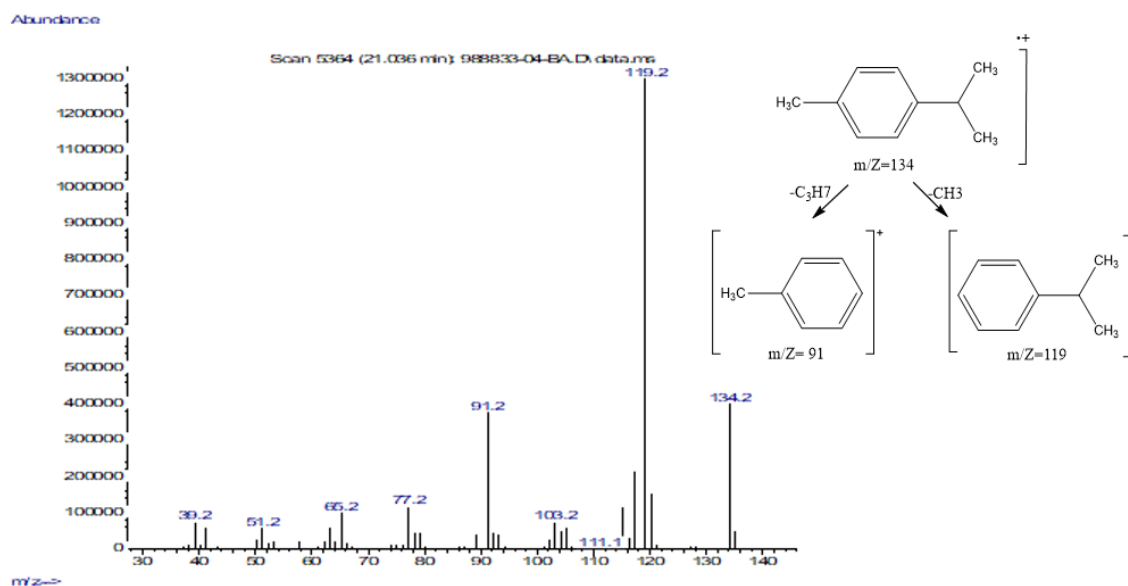


Figura 22. Espectro de masas para el compuesto mayoritario *p*-cimeno presente en el AE de tomillo.

En la figura 23 se observa la fragmentación propuesta para el compuesto mayoritario γ -terpineno. Presenta su ion molecular a $m/Z=136$. Debido a la separación del radical metilo ($-\text{CH}_3$) se obtuvo un ion con $m/Z=121$, así mismo, dada la ruptura de radicales alquílicos, se derivan los cationes con $m/Z=105$, $m/Z=93$ y $m/Z=77$.

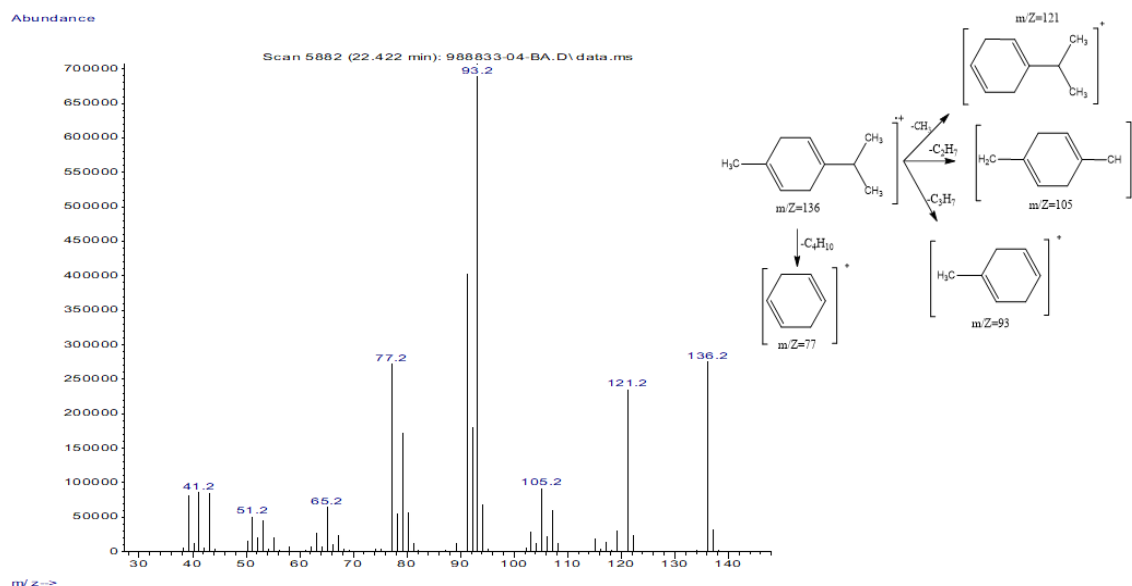


Figura 23. Espectro de masas para el compuesto mayoritario γ -terpineno presente en el AE de tomillo

A continuación, se muestran los compuestos mayoritarios presentes en el AE de cardamomo (tabla 7). Estos se identificaron mediante GC-MS.

Con relación a la tabla 7, se estableció que los compuestos mayoritarios presentes en el AE de cardamomo son acetato de α -terpinilo (40%), 1,8-cineol (10,5%), acetato de linalilo (10,3) y linalool (8,0 %). Así mismo, este aceite esencial cuenta con una diversidad de compuestos, que se presentan a una menor concentración y que a su vez cuentan con propiedades biológicas como lo es la actividad antimicrobiana. Algunos de los compuestos minoritarios que muestran esta propiedad biológica son α -pineno, sabineno, limoneno, γ -Terpineno, terpinen-4-ol, nerol, y geraniol, entre otros. (Duke, Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases, 2019). El perfil cromatográfico del aceite esencial de cardamomo obtenido por GC-MS operando en el modo *full scan* se presenta en la figura 24.

Tabla 7. Composición química del aceite esencial de cardamomo determinados mediante GC-MS

<i>T_R, min</i>	<i>Identificación tentativa</i>	<i>Cantidad relativa, %</i>
		988833-05-AI Cardamomo
16,52	α -Tujeno	0,1
16,90	α -Pineno	0,6
18,65	Sabineno	1,2
18,92	β -Pineno	0,2
19,04	6-Metil-5-hepten-2-ona	0,1
19,28	β -Mirceno	0,8
19,89	Octanal	0,1
20,57	α -Terpineno	0,2
20,91	<i>p</i> -Cimeno	0,6
21,15	Limoneno	1,7
21,36	1,8-Cineol	10,5
21,72	<i>trans</i> - β -Ocimeno	0,1
22,31	γ -Terpineno	0,5
22,83	<i>cis</i> -Hidrato de sabineno	0,4
23,46	Terpinoleno	0,3
24,02	Linalool	8,0
24,13	<i>trans</i> -Hidrato de sabineno	0,3
24,46	4,8-dimetil-1,3,7-Nonatrieno	0,1
25,08	<i>cis-p</i> -Menth-2-en-1-ol	0,2
25,78	<i>trans-p</i> -Menth-2-en-1-ol	0,2
26,90	δ -Terpineol	0,4
27,04	<i>endo</i> -Borneol	0,2
27,35	Terpinen-4-ol	3,6
27,51	<i>p</i> -Cimen-8-ol	0,2
27,68	<i>cis</i> -Decenal	0,1
27,92	α -Terpineol	7,6
28,34	<i>trans</i> -Piperitol	0,2
28,69	<i>cis</i> -Carveol	0,1
28,79	Nerol	0,2
29,32	Neral	0,6
29,71	Acetato de linalilo	10,3
29,76	Geraniol	1,0
30,37	Geranial	0,8
31,45	Acetato de tujilo	0,2
32,10	Acetato de δ -terpinilo	0,6

Continuación Tabla 7

32,26	Metil-dimetil-octadienoato	0,2
33,60	Acetato de α -terpinilo	40,0
34,41	Acetato de geranilo	0,4
36,45	<i>trans</i> - β -Cariofileno	0,1
36,56	α -Acetato de (1R,4R)-2-ciclohexeno-1-metanol,4-hidroxi-a,a,4-trimetilo	0,1
36,62	Propionato de terpenilo	0,3
37,42	Aromandendreno	0,2
38,49	Germacreno D	0,1
38,61	Aristolecheno	0,2
38,79	Eremofileno	0,4
38,98	α -Selineno	0,2
39,20	β -Bisaboleno	0,3
39,46	γ -Cadineno	0,5
40,68	<i>trans</i> -Nerolidol	3,2
40,78	8-Acetoxi-1- <i>p</i> -menten-6-ona	0,5
41,00	(E,E)-4,8,12-Trimetil-1,3,7,11-tridecatetraeno	0,5
43,95	Intermedeol	0,1
45,41	<i>trans,trans</i> -Farnesal	< 0,1
47,36	2-((1S,4aS,8aS)-5,5,8a-Trimetil-2-metilenedecahidronaftalen-1-il)acetaldehído (Ambrial)	0,1
51,17	(E)-15,16-Dinorlabda-8(17),11-dien-13-ona	< 0,1
53,98	3-((E)-2-((1S,4aS,8aS)-5,5,8a-Trimetil-2-metilenedecahidronaftalen-1-il)vinil)furano (Coronarin E)	0,2

Nota: datos analizados por el Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS, de la Universidad Industrial de Santander.

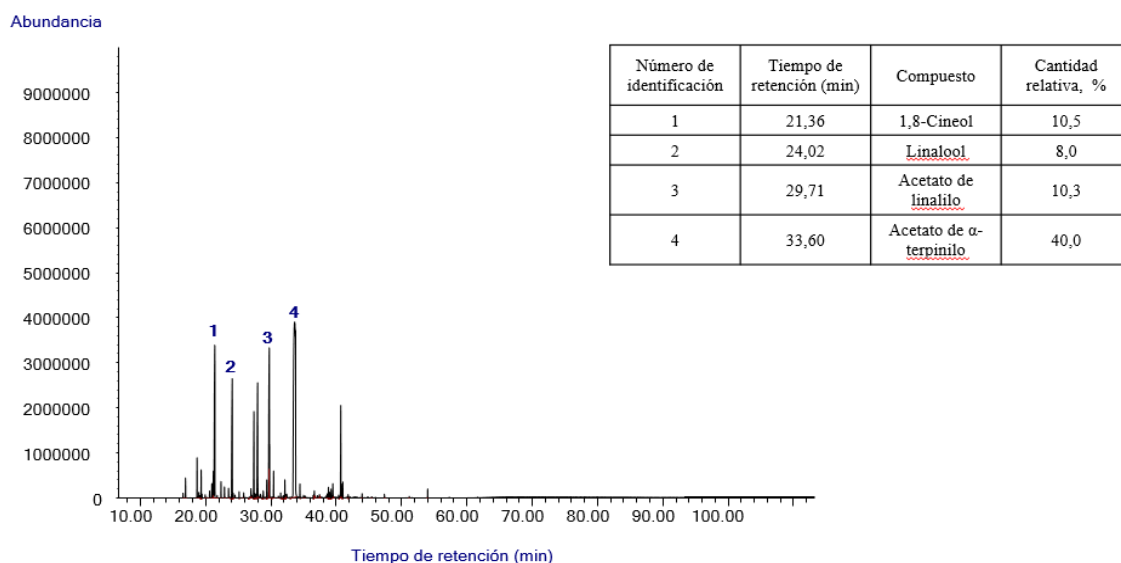


Figura 24. Corriente iónica total reconstruida del AE de cardamomo analizado por GC-MS operado en el modo full scan.

A continuación, en la figura 25 se presenta el espectro de masas para 1,8-cineol (eucaliptol). Este presenta un ion molecular con $m/Z=154$, al darse la ruptura de un radical metilo, se forma el catión $m/Z=139$. Debido a la pérdida de oxígeno que conforma el éter y un radical metilo, se obtiene los iones con $m/Z=108$ y $m/Z=93$. Este último ion presenta un reordenamiento en sus carbonos, dando así un catión con $m/Z=81$. Por último, su pico base presenta un $m/z=43$, debido a la ruptura y reordenamiento de los carbonos α con respecto al oxígeno.

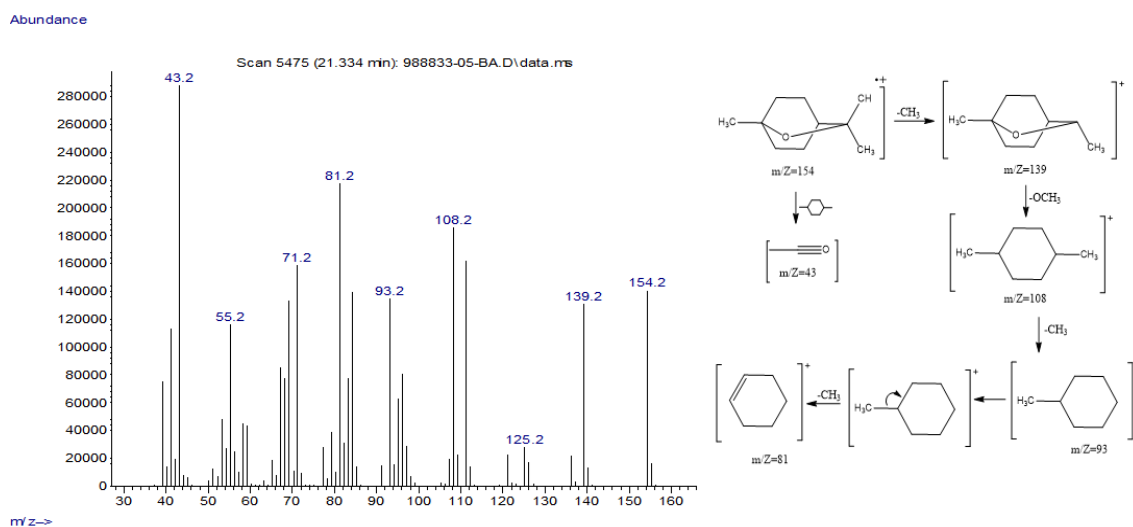


Figura 25. Espectro de masas del compuesto 1,8-cineol (eucaliptol) presente en el aceite esencial de cardamomo.

En la figura 26 se presenta el espectro de masas y la fragmentación sugerida para el compuesto mayoritario linalool presente en el AE de cardamomo, presenta su ion molecular con $m/Z=154$. A causa de la ruptura de los radicales metilo, hidroxilo e hidrógeno, y al reordenamiento que se da en los enlaces del carbono se genera un ion con $m/Z=93$. Por otro lado, el ion molecular presenta una separación de un radical alquílico obteniendo así el pico base con $m/Z=71$. De este pico se originan dos cationes, el primero con $m/Z=55$ formado a partir de la separación de un radical metilo y la transposición del hidrógeno del grupo hidroxilo. El segundo catión con $m/Z=43$ se da por el reordenamiento de los enlaces del carbono, la pérdida del radical hidroxilo y metilo.

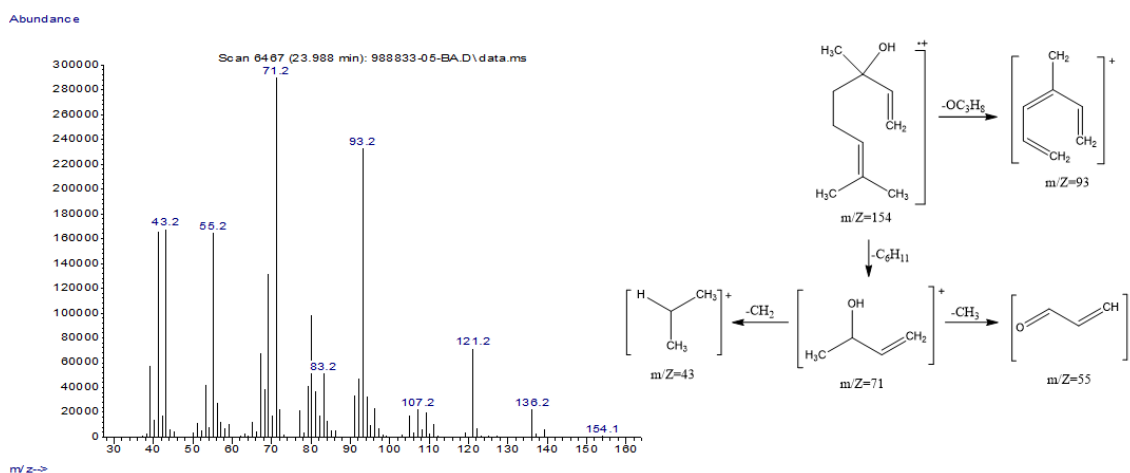


Figura 26. Espectro de masas del linalool presente en el aceite esencial de cardamomo

La figura 27 muestra el espectro de masas y la fragmentación propuesta para el compuesto acetato de linalilo. Su ion molecular se encuentra a un $m/Z=196$. Gracias a la ruptura del grupo éster, se obtuvo un catión con $m/Z=121$. Debido a la pérdida del grupo vinil y la separación del enlace C-H, se deriva un catión con $m/Z=93$ que a su vez es el pico base, y un catión con $m/Z=80$. Por último, debido al reordenamiento y ruptura del enlace C-O, se observa un pico con $m/Z=43$.

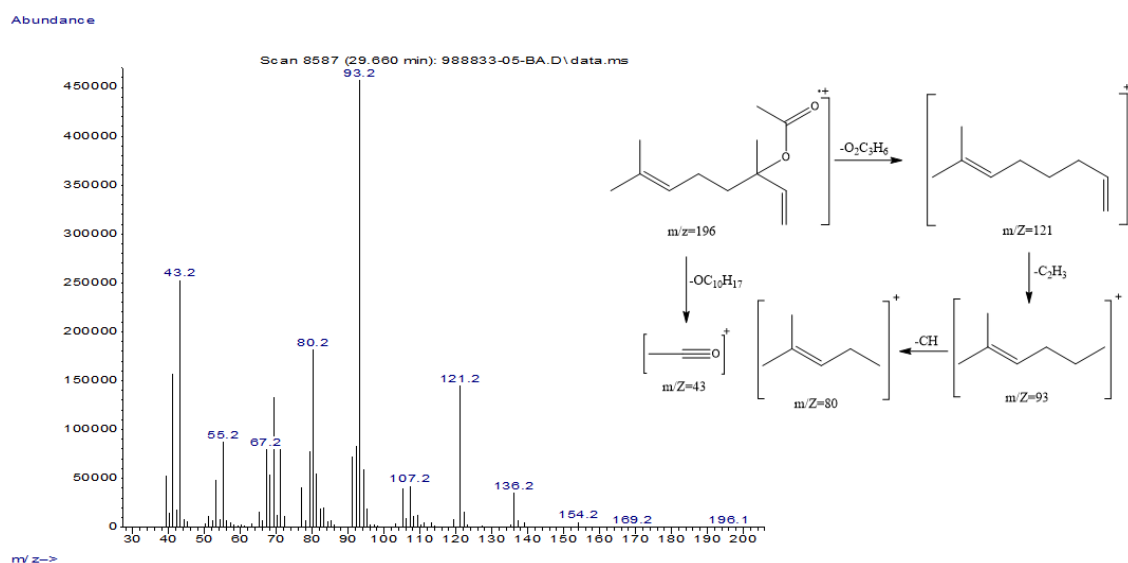


Figura 27. Espectro de masas del acetato de linalilo presente en el aceite esencial de cardamomo.

La figura 28 presenta el espectro de masas y la fragmentación sugerida para el compuesto de acetato de α terpinilo. Este presenta un ion molecular con $m/Z=196$. De este resultan los cationes con $m/Z=43$ por la pérdida de radicales metilo y el anillo aromático y $m/Z=136$ dada la ruptura del grupo éster. A partir de este último catión se obtiene un ion con $m/Z=121$ que a su vez es el pico base, por el rompimiento del radical metilo. Por la separación de un radical en el ion del pico base, se formó un catión con $m/Z=93$.

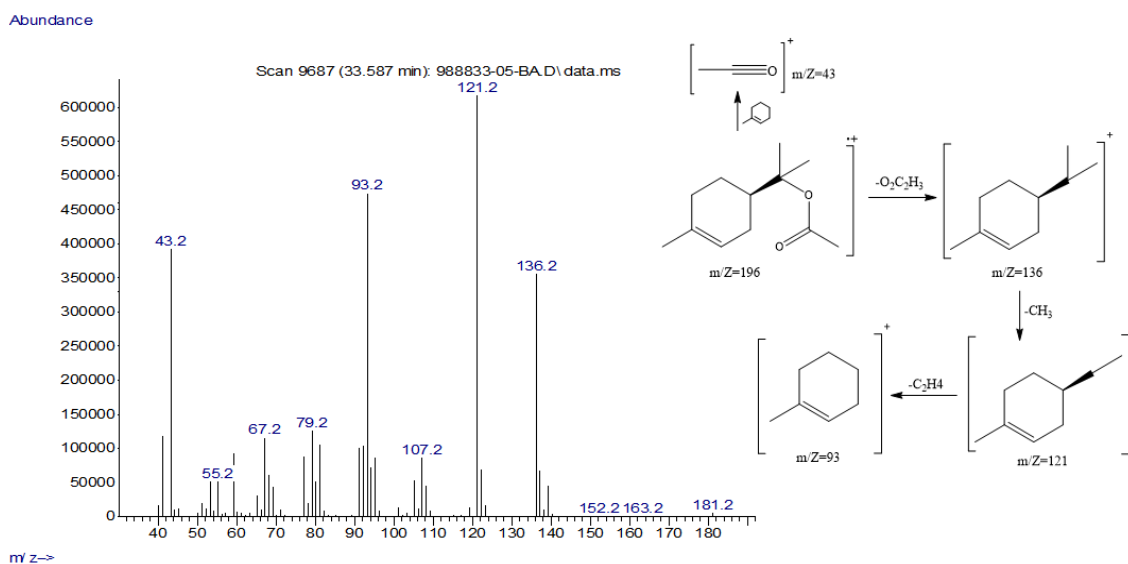


Figura 28. Espectro de masas del acetato de α terpinilo presente en el aceite esencial de cardamomo.

6.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de tomillo y cardamomo

6.2.1 Evaluación de los compuestos de referencia. Para validar la pureza de los compuestos de referencia Vancomicina y Metronidazol se empleó la espectroscopía de infrarrojo. En la figura 29 se presenta el espectro infrarrojo característico del compuesto de referencia vancomicina. En este se observa una banda ancha de absorción distintiva de la vibración de tensión del O-H en la región de $3277\text{-}3527\text{ cm}^{-1}$ debido a la presencia de los grupos hidroxilos y carboxilos en la molécula de vancomicina. De igual manera, se encuentra una banda entre $2899\text{-}2931\text{ cm}^{-1}$ debidas a las vibraciones de tensión del C-H del anillo aromático, además, estos picos débiles se asocian a las vibraciones de tensión asimétricas y simétricas del grupo metilo.

En la región comprendida de $1800\text{ a }2400\text{ cm}^{-1}$, se hayan bandas correlacionadas características de las sustituciones del anillo del benceno. En el área comprendida entre $1687\text{-}1774\text{ cm}^{-1}$ se observan dos bandas propias del grupo amídico debidas a la interacción y vibraciones de tensión del grupo carbonilo presente en la amida, así mismo, la región de 1608 cm^{-1} es característica de la flexión fuerte en el plano de N-H. Por otra parte, en la zona de 1498 cm^{-1} se observa una banda de absorción atribuida a la vibración de tensión del C=C del anillo aromático. En 1261 cm^{-1} se observa una banda de absorción asociada a la vibración de tensión asimétrica del C-O-C. En la región ubicada entre $1076\text{-}1116\text{ cm}^{-1}$ se presentan unos picos característicos de la vibración de tensión del C-N. Por último, entre $763\text{ y }773\text{ cm}^{-1}$ se observa una frecuencia de la absorción de tensión del C-Cl.

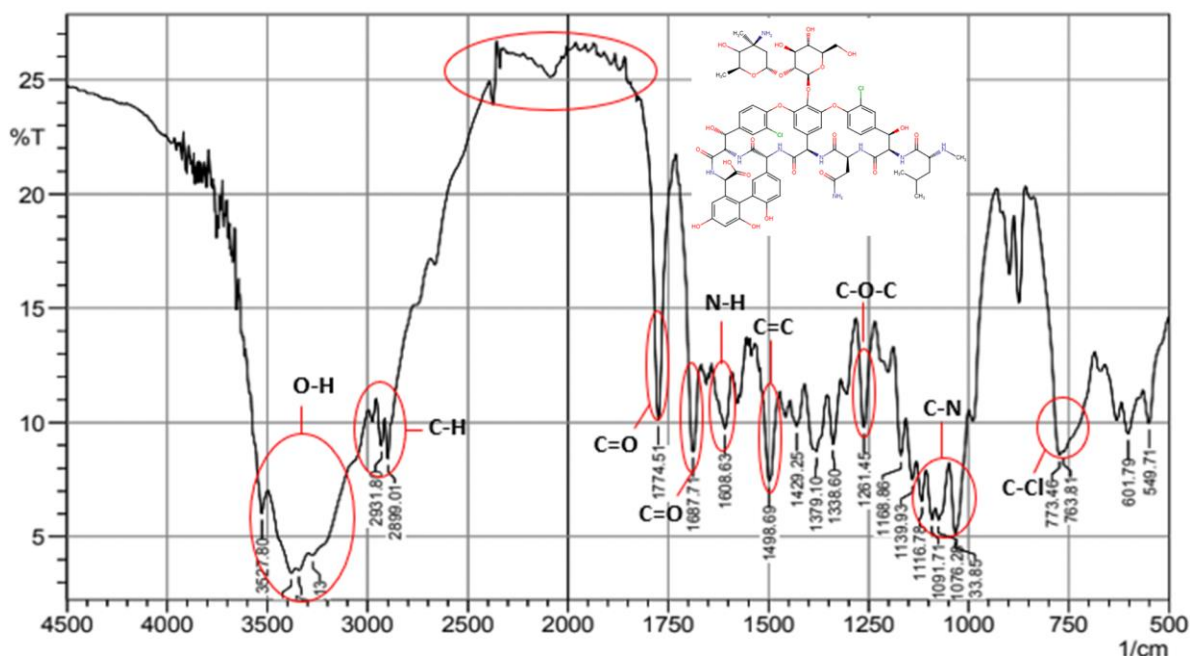


Figura 29. Espectro IR del compuesto de referencia vancomicina

En la figura 30 se observa el espectro infrarrojo del compuesto de referencia metronidazol. En este se observa dos bandas de absorción características de la presencia de un grupo hidroxilo del alcohol correspondiente a la molécula en estudio. La primera banda de absorción distintiva de la vibración de tensión del O-H se encuentra en la región de 3215 cm^{-1} . La segunda banda de absorción se observa en la región de 1338 cm^{-1} asociada a la vibración de flexión del O-H. En la frecuencia de 3018 cm^{-1} se encuentra una banda característica de la vibración de tensión del $\equiv\text{C-H}$ del anillo aromático.

En la región comprendida de $2848\text{--}2920\text{ cm}^{-1}$ se haya un doblete debido a las vibraciones de tensión asimétricas y simétrica del C-H, independiente del tamaño de la molécula. En 1371 cm^{-1} se observa una banda de absorción asociada a la deformación simétrica del C-H, también en el área comprendida entre $1431\text{--}1471\text{ cm}^{-1}$ se observan dos bandas propias de una vibración de flexión asimétrica del metilo. La región de 1537 cm^{-1} es característica de una banda de tensión asimétrica del -N=O de un nitrocompuesto. Por otra parte, en la zona de 1265 y 1186 cm^{-1} se observa una banda de absorción propia de un doblete debido al carácter de doble enlace del C-N cuando esta conjugado con el par de electrones del átomo de nitrógeno en el anillo aromático. Por último, en

la región ubicada en 1074 cm^{-1} se observa una banda de absorción propia de una vibración de tensión simétrica del C-O de alcoholes.

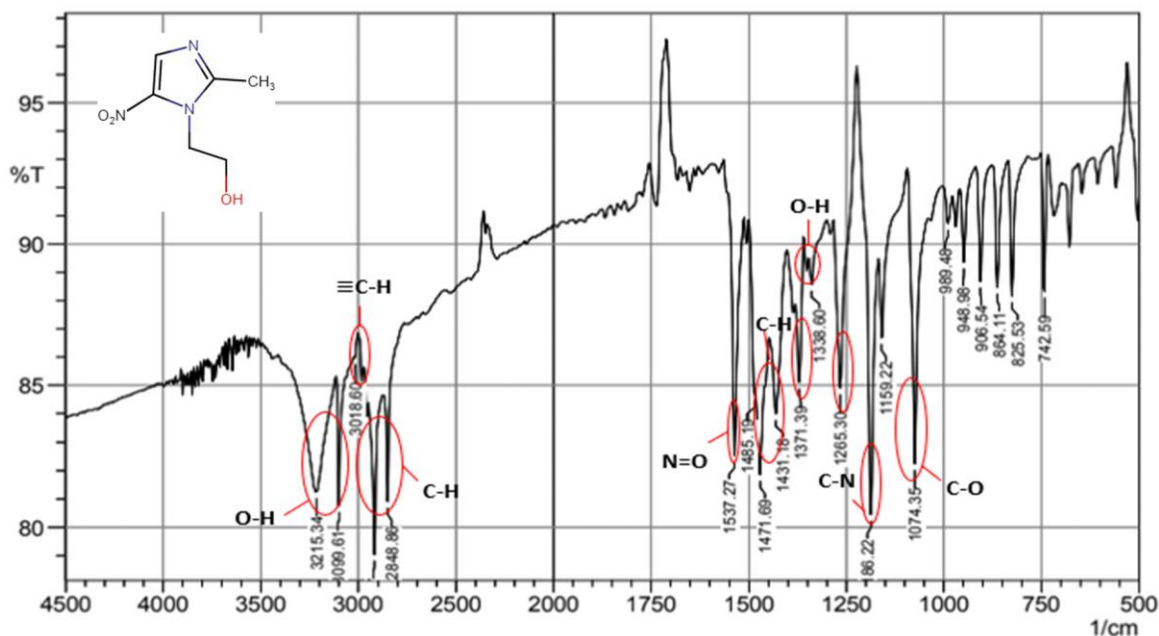


Figura 30. Espectro IR del compuesto de referencia metronidazol

6.2.2 Evaluación de la concentración inhibitoria y bactericida mínima de aceites esenciales. A continuación, se presentan en la tabla 8 los resultados obtenidos en la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Elettaria cardamomum* frente a los microorganismos *Porphyromonas gingivalis*. y *Streptococcus mutans*.

Conforme a los resultados presentados en la tabla 8, se establece que el microorganismo *Porphyromonas gingivalis* mostró sensibilidad frente a los aceites esenciales de tomillo y cardamomo, siendo el AE de tomillo quien presentó una mayor actividad antimicrobiana. Esto se puede concluir debido a que el AE de tomillo mostró una CIM de $250\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y CBM de $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ frente al microorganismo, mientras que el AE de cardamomo presentó una CIM de $500\text{--}1000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y CBM de 500.

Tabla 8. Datos obtenidos de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Elettaria cardamomum* y compuesto de referencia frente a *Porphyromonas gingivalis* y *Streptococcus mutans*.

Aceite esencial y compuesto de referencia	<i>Porphyromonas gingivalis</i>		<i>Streptococcus mutans</i> .	
	CIM ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CIM ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
<i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo)	250	500	500-1000	1000
<i>Elettaria cardamomum</i> (Cardamomo)	500-1000	500	>2000	>2000
Metronidazol	256	128	-	-
Vancomicina	-	-	4-8	2-4

Nota: CIM (concentración inhibitoria mínima), CBM (concentración bactericida mínima).

Ahora bien, al contrastar los resultados obtenidos experimentalmente con los datos alcanzados por los investigadores Fani & Kohanteb en 2017, se determinó que el AE de tomillo obtenido experimentalmente ejerció un potencial antimicrobiano frente a *P.gingivalis* similar al reportado en la literatura, esto se puede comprobar mediante el resultado de la CIM, para el que los autores reportaron una CIM de 16-256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en nuestro caso se presenta un valor de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La relación entre la actividad antimicrobiana presentada por el AE de tomillo y su composición química, muestra que su potencial puede deberse a la presencia de compuestos como timol, compuesto mayoritario de naturaleza fenólica, el cual ha sido reportado como potente agente antimicrobiano, capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias, ya que se une a las membrana bacteriana de forma hidrofóbica, lo cual genera perturbaciones en la membrana, incrementado así la permeabilidad, que conlleva a la pérdida de iones de potasio y ATP intracelular causando finalmente la muerte celular (Lopez Ambrocio, Ruiz Posada, & Delgadillo Martinez, 2016).

En cuanto al AE de Cardamomo, se determinó que presenta un efecto antimicrobiano frente al microorganismo *Porphyromonas gingivalis*, sin embargo, los resultados obtenidos experimentalmente no se pudieron comparar con estudios previos en la literatura, debido a que no se ha reportado investigaciones de la actividad antimicrobiana de este aceite esencial frente al microorganismo en estudio. El efecto antimicrobiano de este aceite puede deberse a la presencia de compuestos mayoritarios tales como acetato de α -terpinilo y la interacción sinérgica de los compuestos minoritarios α -pineno, sabineno, limoneno, 1,8-cineol, γ -terpineno, linalol, terpinen-4-ol, nerol, neral, geraniol y geranial.

En cuanto a la concentración inhibitoria mínima del compuesto de referencia metronidazol, se estableció una CIM de $256 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. En literatura se encuentra reportada una CIM (0,016-256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Jaramillo Echeverri, y otros, 2008), la cual coincide con el valor experimental encontrado lo que ayuda a validar el experimento. El metronidazol se emplea como compuesto de referencia para tratar las afectaciones de *P.gingivalis*. sin embargo, su CIM no está estandarizada, por esta razón se encuentra un amplio rango de la actividad antimicrobiana.

Por otra parte, los resultados reportados en la tabla 8, se determinó que el microorganismo *Streptococcus mutans* es susceptible al AE de *Thymus vulgaris*, en tanto que, el AE de *Elettaria cardamomum*, no presentó actividad antimicrobiana (CIM y CBM) para este microorganismo en las concentraciones evaluadas.

En la tabla 8 se presenta una CIM para el aceite esencial de tomillo de $500\text{-}100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y CBM de $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ frente *S. mutans*. Schött, G y otros en 2017, reportaron un valor de CIM $750 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ lo cual nos indica que este aceite presenta un efecto antimicrobiano. Dicha actividad puede estar relacionada con la presencia de compuestos con potencial antimicrobiano como por ejemplo α -pineno, limoneno, 1,8-cineol, linalol, borneol y geraniol, entre otros. (Duke, Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases, 2019)

Por otro lado, el AE esencial de cardamomo no ejerce actividad antimicrobiana frente *S. mutans*, debido a que presenta una CIM y CBM superior a $2000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Este resultado no puede ser

comparado con otros estudios debido a que no se registran investigaciones previas. Sin embargo, si se analiza la composición química de este aceite podría considerarse como un potencial antimicrobiano debido a la presencia de compuestos como el α -terpinilo, 1,8-cineol, acetato de linalilo, linalol y α -terpineol, reportados con esta actividad biológica.

En cuanto a los resultados obtenidos para el compuesto de referencia vancomicina, se estableció que la CIM alcanzada experimentalmente ($4-8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), se encuentra en el rango de la CIM registrada por el CLSI, donde se determinó una $\text{CIM} \geq 4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para el microorganismo *S. mutans*. (Cavalieri, y otros, 2005)

6.3 Determinación de la fitotoxicidad de los aceites esenciales

6.3.1 Evaluación de la toxicidad aguda de los AE en estudio. La evaluación de la toxicidad aguda empleando semillas de tomate, repollo y bulbos de cebollas, es una prueba estática de toxicidad que dura aproximadamente unas 120 horas de exposición, en las cuales se pueden determinar los procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia pura o mezcla compleja como los aceites esenciales pueden inferir en el desarrollo y crecimiento normal de la planta. (Rodríguez Romero, y otros, 2014).

La valoración de los efectos en la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas se llevó a cabo mediante la ponderación de los efectos tóxicos que generan los compuestos volátiles presentes en los aceites esenciales, a niveles de concentración bajos que no poseen la concentración necesaria para inhibir el crecimiento, pero sin embargo inhiben los procesos de elongación de la radícula o del hipocótilo, esto se puede observar en las figuras 31 y 32. Los datos de las mediciones de la elongación de la radícula o del hipocótilo tanto para las semillas de tomate y repollo como para los bulbos de cebolla (tabla 9) permitieron establecer la CE_{50} de los aceites esenciales de tomillo y cardamomo.

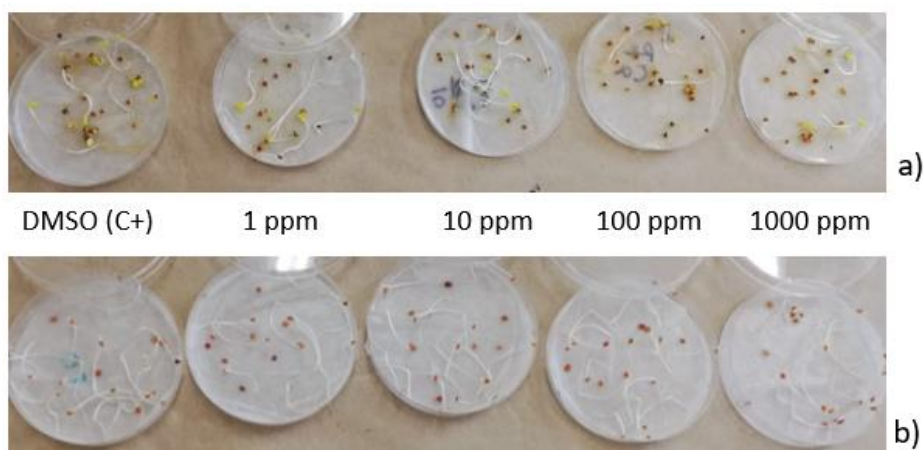


Figura 31. Crecimiento de raíz e hipocótilo en los bioindicadores a) repollo y b) tomate luego de transcurrir las 120 horas de exposición en diferentes concentraciones de AE.

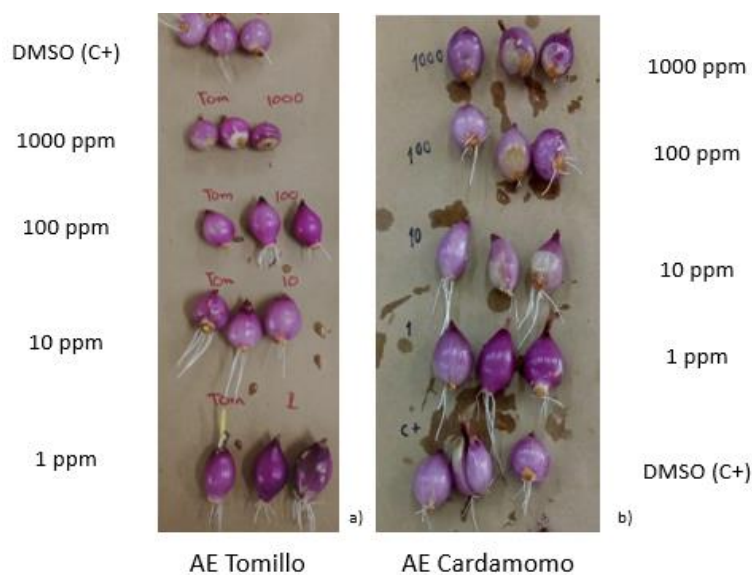


Figura 32. Crecimiento de la raíz en el bioindicador *Allium cepa* luego de estar en contacto con los aceites esenciales a) tomillo y b) cardamomo.

En la tabla 9, se presentan los valores de CE_{50} para los AE de tomillo y cardamomo, los cuales fueron superiores a las concentraciones evaluadas (1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) frente a los bioindicadores utilizados (semillas de tomate, repollo y bulbos de cebollas). Esto permite concluir que las concentraciones evaluadas de AE de tomillo y cardamomo no generaron un efecto toxicológico, debido a que los niveles de concentración evaluadas no presentan valores capaces de

inhibir en un 50% el proceso de elongación de la radícula y del hipocótilo de las semillas de repollo y tomate. Los resultados obtenidos de las pruebas de toxicidad aguda realizados en semillas son representativos ya que permite estimar el posible riesgo ecológico asociado a la exposición de los aceites esenciales evaluados.

Tabla 9. Evaluación de la fitotoxicidad de los aceites esenciales de tomillo y cardamomo.

Bioindicador		CE_{50} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) del AE	CE_{50} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) del AE
		Tomillo	Cardamomo
<i>Brassica oleracea</i>	Embrión	>1000	>1000
	Raíz	>1000	>1000
<i>Lycopersicon esculentum.</i>	Embrión	>1000	>1000
	Raíz	>1000	>1000
<i>Allium cepa</i>	Raíz	415,35	743,16

Por otra parte, en la determinación de la toxicidad aguda empleando como bioindicador los bulbos de cebolla se evidenció un retardo o inhibición en el proceso de elongación de la radícula, causada por la inhibición de división celular de los meristemas radiculares, lo que puede ocasionar el retardo del proceso de mitosis o destrucción de las células, generando así un impedimento en el crecimiento normal de la raíz y, por lo tanto su elongación. (Restrepo Manrique, Ortiz Villamizar, & Reyes Quesada, 2011). Como se muestra en la figura 32, para *Allium cepa*, hay una total inhibición de germinación de la raíz en la concentración $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de AE, lo que indica que a esta concentración el aceite esencial de tomillo y cardamomo es tóxico para esta especie.

Se evaluó la concentración de AE en la cual se presenta el 50% de inhibición en el crecimiento de la raíz de *Allium cepa* con respecto a los valores obtenidos en el control positivo (DMSO), para lo cual, se realizó una curva de dosis – respuesta (figura 33).

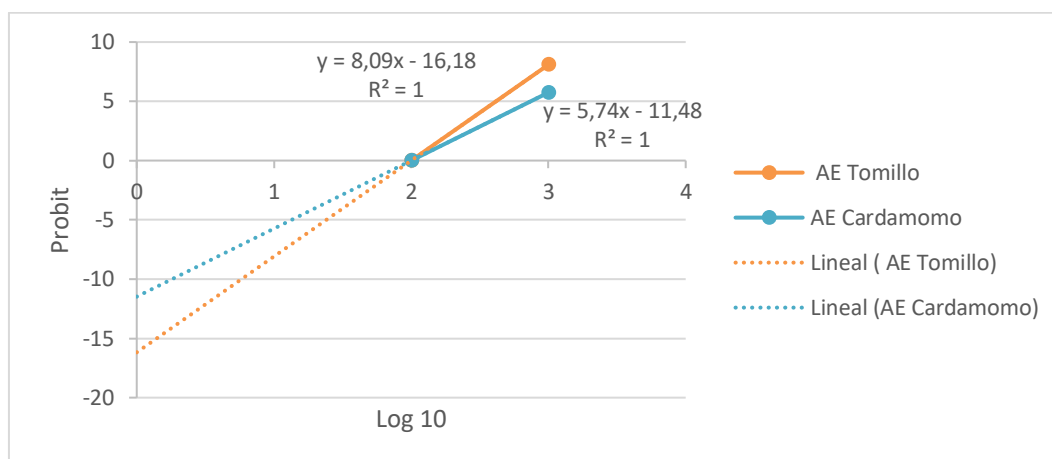


Figura 33. Curva de Dosis-Respuesta de aceites esenciales de tomillo y cardamomo frente al bioindicador *Allium cepa*.

En la tabla 9, se presentan los valores de concentración de AE de tomillo y cardamomo donde se evidenció la inhibición en el proceso de elongación de la raíz, para los CE_{50} de $415,35 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y CE_{50} de $743,16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectivamente. De acuerdo con lo anterior, se pudo determinar que el crecimiento del sistema radicular de los bulbos de cebolla presenta una mayor sensibilidad al AE de tomillo, ya que necesita un nivel de concentración más bajo que el AE de cardamomo para inhibir en un 50% el crecimiento de las raíces de este bioindicador.

6.3.2 Evaluación de genotoxicidad de AE de tomillo y cardamomo. Una evaluación de respuesta adicional al utilizar los bulbos de cebolla como bioindicadores es la determinación de las fases mitóticas. En la tabla 10 y en las figuras 34 y 35, se muestran los resultados obtenidos de índice mitótico (%IM) y aberraciones cromosómicas (%AC) en las células meristemáticas de la raíz de *Allium cepa* a un rango de concentración establecido (1, 10, 100 y $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

De acuerdo con la figura 34, se determinó que los AE de tomillo y cardamomo causaron alteraciones inhibitorias en comparación con el control negativo, estas son derivadas de las sustancias químicas presentes en los AE. No obstante, la disminución del proceso de división celular puede estar asociada al efecto sinérgico que tiene el DMSO con cada uno de los aceites esenciales, debido a que se ha reportado que algunos compuestos químicos presentes en los AE muestran actividad genotóxica frente a células eucariotas como es el caso de 1,8-cienol. Además,

al comparar los resultados obtenidos, se observó que mientras la concentración del aceite evaluado se aumentaba, su % IM disminuía, indicando un bloqueo de la función mitótica, lo cual genera la inhibición de la división celular.

Ahora bien, para el aceite esencial de tomillo, se determinó una mayor acción inhibitoria, ya que como se observa en el gráfico los % IM obtenidos para este AE son menores en comparación con los valores conseguidos para el AE de cardamomo a las concentraciones evaluadas. De modo que, se puede concluir que los AE tienen acción inhibitoria de la función mitótica en las células de las cebollas, debido a que la concentración más baja evaluada para cada aceite esencial ($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) presentó un efecto inhibitorio de la división celular. Así mismo, los aceites esenciales evaluados a una concentración de $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ bloquearon totalmente el proceso mitótico (% IM=0), lo cual indica una acción tóxica en las células meristemáticas de la raíz de la cebolla. Este resultado se estableció teniendo en cuenta el crecimiento de las raíces, el cual no se observó a esta concentración.

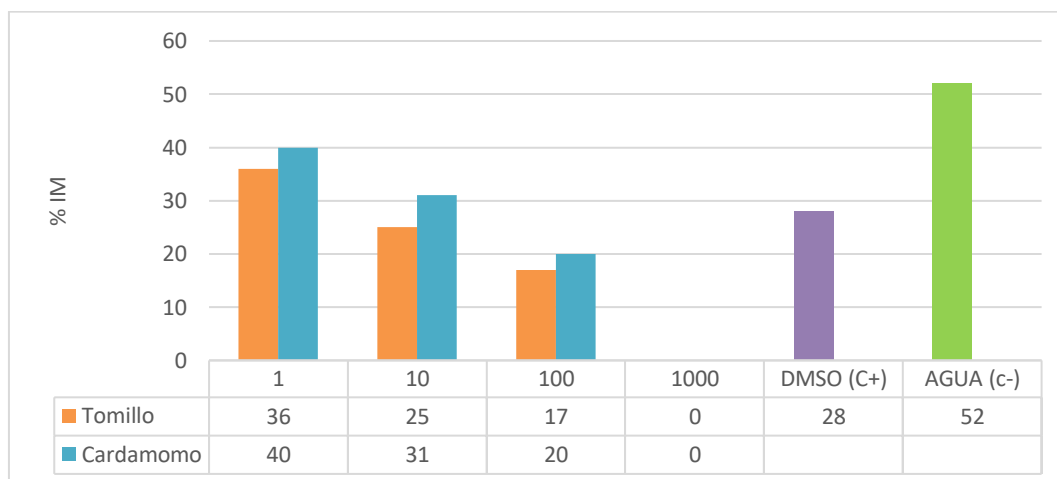


Figura 34. Índice mitótico de las diferentes soluciones de AE de tomillo y cardamomo frente al bioindicador *Allium cepa*

Nota: C+(DMSO al 0,38%) y C- (agua comercial marca cristal)

Por otra parte, se estableció que los AE de tomillo y cardamomo presentaron un efecto genotóxico como lo muestra la figura 35, en la cual se presenta una tendencia: mientras se aumentó

la concentración de los AE evaluados, así mismo, aumentó el número de aberraciones cromosómicas en las células, por lo que se determinó que el AE de tomillo presenta un efecto genotóxico mayor sobre las células de cebolla a comparación del AE de cardamomo. Esto se manifiesta a medida que aumenta la concentración del AE evaluado, se encuentran con mayor frecuencia aberraciones cromosómicas. Las células que estuvieron en contacto con el AE de tomillo mostraron más malformaciones cromosómicas que el aceite de cardamomo.

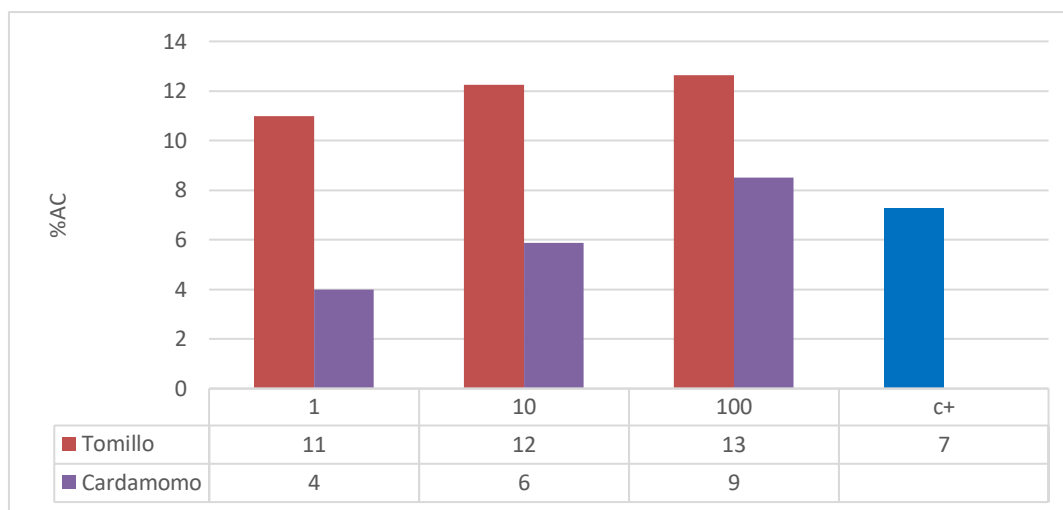


Figura 35. Porcentaje de aberraciones cromosómicas causadas por los aceites esenciales evaluados a las células de cebolla.

Este resultado corrobora la acción antimicrobiana que presenta el aceite esencial de tomillo frente a los microorganismos en estudio, debido a que este AE cuenta con compuestos fenólicos que son excelentes agentes antimicrobianos, capaces de causar daños y perturbaciones que conllevan a la muerte celular en el caso de las bacterias y una acción genotóxica en las células meristemáticas de la radícula en los bulbos de cebolla.

Por otra parte, al analizar las malformaciones genéticas se determinó que los aceites esenciales tienen acciones aneugénicas y clastogénicas. La acción aneugénica actúa a nivel de estructuras celulares y moleculares impidiendo así la fijación de las fibras del huso mitótico, lo cual ocasiona el desplazamiento de cromosomas en el anafase o pérdidas de cromosomas (puente), mientras que

la acción clastogénica modifica la estructura cromosómica de la célula (cromosomas vagabundos y cromosomas pegajosos) (Restrepo Manrique, Ortiz Villamizar, & Reyes Quesada, 2011). Las aberraciones cromosómicas presentes en las células de cebollas expuestas a los aceites evaluados se encuentran en la tabla 10.

Tabla 10. *Aberraciones cromosómicas presentes en las células de cebollas expuestas a los aceites esenciales de tomillo y carda momo, y al DMSO*

<i>Aceite esencial</i>	<i>Imagen observada</i>	<i>Aberración cromosómica</i>
Tomillo		Metafase pegajosa
		Cromosoma vagabundo en anafase
		Puente en anafase

Continuación tabla 10

Cardamomo		Metafase pegajosa
		Cromosoma vagabundo en anafase

		Puente en anafase
DMSO (C+)		Metafase pegajosa
		Cromosoma vagabundo en anafase
		Anormal o distorsionada
		Puente en anafase

7 Conclusiones

- Se obtuvo el aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo) mediante el método destilativo hidrodestilación asistida por microondas con un rendimiento de 0,256%. Los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales fueron timol (21,2%), *p*-cimeno (20,2%), γ -terpineno (10,5%) y linalol (5,4%) para este AE. En el caso del AE de cardamomo, los compuestos más abundantes identificados fueron acetato de α -terpinilo (40%), 1,8-cineol (10,5%), acetato de linalilo (10,3), linalol (8,0 %) y α -terpineol (7,6%).

- El aceite esencial de tomillo mostró actividad antimicrobiana frente a los microorganismos *P. gingivalis* y *S. mutans* para los cuales se establecieron CIM 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y 500-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente. Así mismo, el aceite esencial de cardamomo presentó actividad frente al patógeno oral *P. gingivalis* con una CIM 500-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sin embargo, no presentó actividad antimicrobiana para *S. mutans* a las concentraciones evaluadas de este aceite esencial. Esto

evidencia una mayor acción antimicrobiana por parte del AE de tomillo con respecto al AE de cardamomo.

- La prueba de toxicidad aguda que presentó mayor sensibilidad frente a la exposición de las concentraciones evaluadas de los AE fue *Allium cepa*, debido a que estableció una CE_{50} de 415,35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en el caso del AE de tomillo y una CE_{50} de 743,16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para el AE de cardamomo. Esto indica que el AE de tomillo muestra un potencial de inhibición mayor al generado por el AE de cardamomo, sin embargo, estos aceites no poseen un efecto fitotóxico en el desarrollo de la radícula y el hipocótilo de las semillas de tomate y repollo ya que su CE_{50} es superior a la mayor concentración evaluada (1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

- El ensayo de *Allium cepa* determinó que los aceites esenciales de tomillo y cardamomo presentaron actividad genotóxica frente a las células de las raíces de esta planta, sin embargo, estos resultados se vieron afectados por la acción sinérgica entre el DMSO y los AE evaluados. Así mismo, se estableció que el AE de tomillo presentó un mayor potencial genotóxico con respecto al AE de cardamomo, esto se concluyó teniendo en cuenta el índice mitótico determinado en cada aceite. Por otra parte, se dedujo que los bulbos de cebolla son adecuados para estudios genotóxicos debido a la alta sensibilidad en el crecimiento de la raíz frente a posibles sustancias genotóxicas, la división en las fases mitóticas es clara y presenta una diversidad en la morfología cromosómica.

- Los aceites esenciales de tomillo y cardamomo presentan actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*, debido a la presencia de ciertos compuestos tipos fenólicos, que han sido estudiados como una posible alternativa como agentes antimicrobianos, ya que presentan un modo de acción mejorado y una baja toxicidad.

8 Recomendaciones

- Se sugiere seguir realizando estudios sobre las diferentes propiedades biológicas que presentan los aceites esenciales, debido a que se ha señalado que estas sustancias de origen natural pueden llegar a ser una alternativa para disminuir la contaminación generada por la acumulación de sustancias sintéticas como los antimicrobianos y agentes biocidas.

- Se recomienda evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos mayoritarios de los AE de tomillo y cardamomo, con el fin de identificar los responsables de esta bioactividad.

- De acuerdo con los resultados obtenidos y reportados en la literatura, se recomienda seguir realizando estudios acerca de la actividad antimicrobiana y otras propiedades biológicas de los AE de tomillo y cardamomo frente a diferentes patógenos orales.
- Se recomienda utilizar otro solvente para los estudios de la actividad fitotóxica y genotóxica de los aceites esenciales.

Referencias bibliográficas

- Abdulrahman khazim , A.-A., Md Tanwir, A., Ahmed Abdullah, A.-F., & Mohammend Salim, A. (2017). Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 147-150.
- Acevedo Barrios, R., Severiche Sierra, C. A., & Jaimes Morales, J. (2015). Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Producción + Limpia*, 10(2), 160-172.
- Albarracín, G., & Gallo, S. (2003). *Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando piper aduncum (cordoncillo) procedente de la zona cafetera*. Manizales: Universidad Nacional de Colombia.
- Alborghetti Nai, G., Casanova de Oliveira, M., De Oliveira Tavares, G., Fonseca Pereira, L. F., Salvador Lemes Soares, N. D., & Gatti Silva, P. (2015). Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones. *Brasileira de Anestesiologia*, 65(1), 21-26.
- Aleksic Sabo, V., & Knezevic, P. (2019). Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. plant extracts and essential oils: A review. *Industrial Crops and Products*, 132, 413-429.
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(6), 5-16.
- Anwar, F., Abbas, A., Alkharfy, K. M., & Gilani, A.-u.-H. (2016). Chapter 33 - Cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 295-301.

- Arencibia, D., Rosario, L., & Curveco, D. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *retel*, 40-52.
- Arguedas Quesada, J. A. (2006). Actualizacion Medica Periodica. *Actualizacion en Farmacoterapia*(67), 1-4. Obtenido de http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a66-vancomicina._actualizacion_medica_periodica.pdf
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475.
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F., & Zúñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes. *Colombia Médica*, 38 (2), 150-158.
- Cardoso Ugarte, G. A., Juárez Becerra, G. P., Sosa Morales, M. E., & López Malo, A. (2016). Microwave-assisted Extraction of Essential Oils from Herbs. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 63-72.
- Cases, M., Valcárcel, H., & Gómez, A. (1988). Cromatografía de gases. Generalidades. En *Técnicas analíticas de separación* (págs. 615- 655). España: Reverté.
- Castro Diaz, S. L. (2006). Evaluación de la actividad citotóxica de extractos y fracciones de *Isertia laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Cavalieri, S. J., Harbeck, R. J., McCarter, Y., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Sautter, R. L., . . . Spiegel, C. A. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. Seattle: University of Washington.
- CLSI. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. CLSI Document M7-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- Contreras, V. H. (2010). *implementación a nivel laboratorio de una unidad de extracción de volátiles por radiación de microondas*. México: Instituto Tecnológico de durango.
- Díaz Zúñiga, J., Yáñez Figueroa, J., Melgar Rodríguez, S., Álvarez Rivas, C., Rojas Lagos, C., & Vernal Astudillo, R. (2012). Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Cinica periodoncia implantol*, 5(1), 40-45.
- Duke, J. (2019). *Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases*. USA: National Agricultural Library. Obtenido de Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases: <https://phytochem.nal.usda.gov/phytochem/search/list>
- El Malti, J., Mountassif, D., & Amarouch, H. (2007). Antimicrobial activity of *Elettaria cardamomum*: Toxicity, biochemical and histological studies. *Food Chemistry*, 104, 1560-1568.
- EPA. (1996). Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4200 Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. *Environmental Protection Agency*, 96-154.
- Fani, M., & Kohanteb, J. (2017). In Vitro Antimicrobial Activity of *Thymus vulgaris* Essential Oil Against Major Oral Pathogens. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 22(4), 660-666.
- Freire, I., Pérez, A., Cardoso, A., Mariz, B., Almeida, L., Cavalcanti, Y., & Paleta, W. (2014). Antibacterial activity of essential oils against strains of *Streptococcus* and *Staphylococcus*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 16(2), 372-377.
- Fronteras. (2017). *Nuevos temas de interés ambiental*. Nairobi: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA).

- Gamboa , F., García, D. A., Lamby, C. P., & Sarralde, A. L. (2016). Biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *S. Mutans* en niños con y sin caries dentales. *Colomb.Cienc.Quim.Farm*, 45(2), 288-304.
- Gamboa Jaimes, F. O. (2014). Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *Streptococcus mutans*: experiencias de investigación. *Univ Odontol.*, 33(71), 65-73.
- Gil Pavas, E., & Sáez Vega, A. (2008). Obtención de aceite esencial de cardamomo. *EAFIT*, 15-21.
- Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., & Gutiérrez, O. D. (2012). Contaminantes emergentes en aguas. *Producción + limpia*, 7, 53-73.
- Gimeno Gasca, J. M. (2001). Tomillo (*Thymus Vulgaris*). *Medicina Naturista*(3), 173-175.
- Guarnizo, A., & Martínez, P. (s.f.). Extracción del aceite esencial de clavos por arrastre con vapor de agua. En *Experimentos de química orgánica con enfoque en ciencias de la vida*. 89-91. Armenia: Elizcom.
- Gutiérrez Bouzán, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín Intexter (U.P.C)*(122), 35-40.
- Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín INTEXTTER*(122), 35-41.
- Hassan Sereshti, A. R. (2012). Bifunctional ultrasound assisted extraction and determination of *Elettaria cardamomum* Maton essential oil. *Journal of Chromatography A*, 1238, 46-53.

- Hister, C., Laughinghouse, H. D., Da Silva, C., Do Canto Dorow, T., & Tedesco, S. (2009). Evaluation of the Antiproliferative Effect of Infusions and Essential Oil of *Aloysia gratissima*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(24), 1581-1584.
- Homaidan Shmeit, Y., Fernandez, E., Novy, P., Kloucek, P., Orosz, M., & Kokoska, L. (2019). Autopolyploidy effect on morphological variation and essential oil content in *Thymus vulgaris* L. *Scientia Horticulturae*, 263, 2-6.
- Hudak, R. (2009). *Hierbas Aromáticas para el jardín y la cocina*. España: Hispano Europea.
- Huerta Lorenzo, B. (2011). Los Aceites Esenciales: una alternativa a los antibióticos. *Cunicultura*, 2-4.
- Hussain, S. Z., & Maqbool, K. (2014). GC-MS: Principle, Technique and its application in Food Science. *International Journal of Current Science*, 13, 116-126.
- Ingraham, J. L., & Ingraham, C. A. (1998). *Introducción a la Microbiología* (Vol. 2). Barcelona: Reverté.
- Jaramillo Echeverri, A., Betancourth Quiroz, M., Mayorga Fayad, I., Castillo Perdomo, D. M., Aya Castañeda, M. R., Lafaurie Villamil, G. I., . . . Contreras Rengifo, A. (2008). Antimicrobial Profiles of Subgingival Bacteria from Periodontitis Patients in Colombia. *Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 1(2), 61-65.
- Joseph O . Ricaldi Sarapura, A. M. (2014). Cromatografía de gases-espectrometría de masas de compuestos fitobioactivos del aceite esencial de *Satureja incana*. *Apunt.cienc.soc*, 4(2), 1-8.
- JoVE Science Education Database.Organic Chemistry. . (2019). *Purifying Compounds by Recrystallization*. Cambridge, MA: JoVE.

- Lagos, E. R. (2012). *determinacion de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial Thymus vulgaris "Tomillo" frente a Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 causante de gingivitis*. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna.
- Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., . . . Brady, L. J. (2019). The Biology of Streptococcus mutans. *Microbiology Spectrum*, 7(1).
- Lima Braga, A., Pereira Melo de Meneses, A.-A., de Oliveira Santos, J. V., Campinho dos Reis, A., Torres de Lima, R., Oliveira Ferreira da Mata, A., . . . Leane Brunelle dos Santos Alves. (2018). Toxicogenetic study of omeprazole and the modulatory effects of retinol palmitate and ascorbic acid on Allium cepa. *Chemosphere*, 204, 220-226.
- Limsuwan, et. al. (2017). Lupinifolin from Albizia myriophylla wood: A study on its antibacterial. *ELSEVIER*, 5,6.
- Liñares, J., & Martin Herrero, J. E. (2003). Bases farmacomicrobiológicas del tratamiento antibiótico de las enfermedades periodontales y periimplatarias. *Avances en periodoncia*, 15(3), 139-147.
- Loaiza, A. W. (2017). *Diseño de una fórmula farmacéutica líquida de metronidazol para administración oral con actividad antimicrobiana*. Machala: Universidad Técnica de Machala.
- López, I. E., Vallejo, B. M., Plazas, C. E., Gómez, L. M., & Barbosa, H. J. (2016). Estudio del impacto ambiental de medicamentos de control especial en Bogotá, Colombia. Caso de estudio: lorazepam. *Gestión y Ambiente*, 19 (1), 34-47.
- López Ambrocio, R. M., Delgadillo Martinez, J., & Ruiz Posadas, L. M. (2015). Yield and quality of Thymus vulgaris L. oil, under the effect of mycorrhizic fungi, rhizobacteria and phytohormones. *Agroproductividad*, 8(4), 3-10.

- López Ambrocio, R. M., Ruiz Posada, L., & Delgadillo Martinez, J. (2016). Anti-microbial activity of Thyme essential oil (*Thymus vulgaris* L.). *Agroproductividad*, 9(11), 78-82.
- López Carreras, N., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutrición clínica y Diestética Hospitalaria*, 32(3), 81-91.
- López, J. P. (2008). *Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos*. pereira: Universidad tecnológica de pereira.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J. C., Moro, M. A., & Portolés, A. (2008). Farmacología Básica y Clínica. En B. Sádaba , & J. R. Azanza, *Antibióticos macrólidos y otros antibióticos* (pág. 850). Madrid: Panamericana.
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Fazel Nabav, S., . . . Mohammad Nabav, S. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402-414.
- Marqués Camarena, M. (2015). *Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica*. valencia: Universidad Politecnica De Valencia.
- Martinez, A. (2001). *Aceites esenciales*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Martínez, P. (2006). *Actividad biocida de un propolis chileno frente a Porphyromonas gingivalis: estudio in vitro*. Santiago: Universidad de Chile.
- Medicamentos a un clic. (3 de octubre de 2016). *ANTIMICROBIANOS*. Obtenido de Mediacamentos a un clic: http://www.medicamentosaunclic.gov.co/contenidos/fichas/14-Uso_de_Antimicrobianos.pdf

- Miao, L. L. (November 8-12). A specification based approach to testing polymorphic attributes. *Formal Methods and Software Engineering: Proceedings of the 6th International Conference on Formal Engineering Methods, ICFEM 2004*. Seattle, WA, USA,.
- Ministerio de salud. Gobierno de Colombia. (2018). *Plan nacional de respuestas a la resistencia a los antimicrobianos*. Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/MET/plan-respuesta-resistencia-antimicrobianos.pdf>
- Montañés Pauls, B. (2009). *Farmacocinética de la Vancomicina en administración intraperitoneal en pacientes sometidos a diálisis peritoneal continua ambulatoria*. Valencia: Universidad de Valencia.
- Moreno Florez, Á., & Peñaranda, M. I. (11 de Febrero de 2019). *Fitotoxicidad: Más que un culpable, una mirada a los múltiples factores en interacción*. Obtenido de Metroflor: la actualidad técnica de la floricultura colombiana: <http://www.metroflorcolombia.com/fitotoxicidad-mas-que-un-culpable-una-mirada-a-los-multiples-factores-en-interaccion/>
- Moreno, S., & Contreras, A. (2013). *Factores de virulencia de Porphyromonas gingivalis*. Cali: Universidad del Valle.
- Morillo Castillo, J. A. (2017). Efecto inhibitorio del aceite esencial de cymbopogon citratus en diferentes concentraciones sobre la cepa de porphyromona gingivalis estudio in vitro. Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Muñoz Lasso, D. C. (2013). Evaluación de la actividad citotóxica y antiproliferativa de fracciones metanólicas y actividad citotóxica de compuestos puros de la esponja marina Ectyoplasia ferox. Medellín: Universidad Nacional de Colombia.

- Mutlu-Ingok, A. T.-G. (2019). Evaluation of the single and combined antibacterial efficiency of essential oils for controlling *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and mixed cultures. *Flavour and Fragrance Journal*.
- Mysak, J., Podzimek, S., Sommerova, P., Lyuya-Mi, Y., Bartova, J., Janatova, T., . . . Duskova, J. (2014). *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research*.
- Negroni, M. (2009). Microbiología Estomatológica: Fundamentos y guía práctica. En *Antimicrobianos, antimicóticos, antiparasitos y antivirales* (págs. 123-133). Buenos Aires: Panamericana.
- Noumi, E. S.-D.-S. (2018). Chemical and biological evaluation of essential oils from cardamom species. *Molecules*, 23(11).
- Ojeda, J. C., Oviedo, E., & Salas, L. A. (2013). *Streptococcus mutans* y caries dental. *CES odontologia*, 26(1), 44-56.
- OMS. (5 de febrero de 2018). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Resistencia a los antibióticos: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- Orrego Cardozo, M., Parra Gil, M. A., Salgado Morales, Y. P., Muñoz Guarín, E., & Fandiño Henao, V. (2015). *Porphyromonas gingivalis* and systemic diseases. *CES Odontología*, 28(1), 57-73.
- Ortuño, M. (2006). *Manual practico de aceites esenciales, aromas y perfumes*. España: Aiyana.
- Pedraza Arias, P. N., & Castellanos Rivera, H. J. (2009). *Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibioticos d administracion*

- intravenosa a traves de metodos in vitro. Parte x. .* Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Pedraza Arias, P., & Castellanos Rivera, H. (2009). *Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibioticos de administracion intravenosa a traves de metodos in vitro parte X cefoperazona-sulbatam.* Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Peña Sisto, M., Calzado da Silva, M., Gonzalez Peña, M., Cordero Garcia, S., & Azahares Arguello, H. (2012). Periodontal pathogens and their relationships with systemic diseases. *Medisan*, 16(7), 1-12. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192012000700014
- Peredo Luna, H. A., Palou García, E., & López Malo, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 1(3), 24-31.
- Pérez, M. E., Ruiz, D. M., Schnneider, M., Autino, J. C., & Romanelli, G. (2013). La química verde como fuente de nuevos compuestos para el control de plagas agrícolas. *Ciencia en Desarrollo*, 4(2), 83-91.
- Ping Ye, J. C.-M. (2017). An early report: a modified porphyrin-linked metronidazole targeting intracellular Porphyromonas gingivalis in cultured oral epithelial cells. *International Journal of Oral Science*, 9, 167-173. Obtenido de <https://www.nature.com/articles/ijos201731>
- Pérez, M., & Mota, M. (2008). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de Bacteriología y Virologia Medica*, 23-42.
- Quevedo, A. (2018). *Los quimiotipos del tomillo*. Obtenido de Essentia: <https://essentia.info/los-quimiotipos-del-tomillo-2/>

- Ramírez Romero, P., & Mendoza Cantú, A. (2008). Ensayos Toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. En M. C. Sobrero, & A. Ronco, *Ensayo de Toxicidad Aguda Con Semillas de Lechuga (Lactuca Sativa)* (pág. 56). México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).
- Ramírez, F. S. (2010). *Estudio comparativo de la técnica de cepillado dental convencional y la técnica de cepillado dental convencional más higiene lingual en el recuento salival de Streptococcus mutans*. Santiago: Universidad de Chile.
- Ramos, D., Moromi, H., & Martínez, E. (2011). Porphyromonas gingivalis: patógeno predominante en la periodontitis crónica. *Odontología Sanmarquina*, 14(1), 34-38.
- Restrepo Manrique, R., Ortiz Villamizar, M. C., & Reyes Quesada, D. (2011). Pruebas de ecotoxicidad para establecer el potencial genotóxico del hipoclorito de sodio, mediante bulbos de cebolla Allium cepa L y semillas de lechuga Lactuca sativa L como bioindicadores. *ITECKNE*, 8(1), 7-14.
- Restrepo, R., Reyes, D., Ortiz, M., Rojas, F., & Kouznetsov, V. (2012). Aberraciones cromosomales en bulbos de cebolla Allium cepa inducidas por moléculas híbridas 4-aminoquinolónicas. *Universitas Scientiarum*, 17(3), 253-261.
- Reyes Jurado, F., Palou, E., & López, A. (2014). *métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales*. México: Universidad de las Américas Puebla.
- Rezi, A., & Allam, M. (1995). Techniques in array processing by means of transformations. En *Control and Dynamic Systems Vol. 69* (págs. 133-180). San Diego: Academic Press.
- Risaliti, L., Kehagia, A., Daoultzi, E., Lazari, D., Bergonzi, M. C., Nikolakaki Vergkizi, S., . . . Rita Bilia, A. (2019). Liposomes loaded with Salvia triloba and Rosmarinus officinalis

- essential oils: In vitro assessment of antioxidant, antiinflammatory and antibacterial activities. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 493-498.
- Rodríguez Romero, A. J., Robles Salazar, C. A., Ruíz picos, R. A., López López, E., Sedeño Díaz, J., & Rodríguez Dorantes, A. (2014). Índices de germinación y elongación radical de *Lactuca sativa* en el biomonitorio de la calidad del agua del rio chalma. *Revista Internacional de contaminacion ambiental*, 30(3), 307-316.
- Rodriguez, R., Ruiz, C., Arias Moyano, G., Castro Salazar, H., Martínez, J., & Stashenko, E. (2012). Estudio comparativo de la composición de los aceites esenciales de cuatro especies del género *Cymbopogon* (Poaceae) cultivadas en Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(1), 77-85.
- Rojas, J., Rodríguez, C. E., Pérez, C., Chaves, C., & Arias, M. L. (2014). Presencia de los genes de toxigenicidad NHEA, NHEBY NHEC en cepas de *Bacillus cereus* aisladas de leches deshidratadas en Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 64(3), 192-196.
- Rosas Gallo, A., & López Malo, A. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 5(1), 41-50.
- Rovetto, G., Moreno, N., Bolívar, V., Calvo, S., Suárez, G., Justiniano, C., . . . Caballero, O. (2009). *Aplicaciones medicinales del tomillo*. Universidad Cristiana de Bolivia (UCEBOL).
- Sánchez, E., castillo, S., & García, P. (2016). *Actividad antimicrobiana*. México: Universidad Autónoma de nuevo león.
- Satthanakul, P., Taweechaisupapong, S., Paphangkorakit, J., Pesee, M., Timabut, P., & Khunkitti, W. (2014). Antimicrobial effect of lemongrass oil against oral malodour micro-organisms

- and the pilot study of safety and efficacy of lemongrass mouthrinse on oral malodour. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 11-17.
- Schött, G., Liesegang, S., Gaunitz, F., Gleb, A., Basche, S., Hannig, C., & Speer, K. (2017). The chemical composition of the pharmacologically active *Thymus* species, its antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and the antiadherent effects of *T. vulgaris* on the bacterial colonization of the in situ pellicle. *fitoterapia*, 121, 118-128.
- Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Principales grupos de antibióticos. *Temas de bacteriología y virología médica*, 631-647. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf>
- Silva lavagnoli, L., Kutz, K. M., Cerutti, C., Bassetti, B. R., & Kaiser, T. (2017). Factores asociados con la contracción de enterobacterias resistentes al carbapenem. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 25, 1-7.
- Siti Nuurul Huda Mohammad Azmin, Z. A. (2016). Herbal Processing and Extraction Technologies. *Separation & Purification Reviews*, 45, 305-320.
- Slonczewski, J. L., & Foster, J. W. (2017). *Microbiology: An Evolving Sciences*. Norton.
- Sobrero, M. c., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones.*, 55-67.
- Sonmezdag, A. K. (2018). Characterization of bioactive and volatile profiles of thyme (*Thymus vulgaris* L.) teas as affected by infusion times. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(4), 2570-2580.

- Stashenko, E. E. (2009). Aceites Esenciales. *Universidad Industrial de Santander Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales - CENIVAM*, 1(1), 1-180.
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2008). *Métodos de estudio de la sensibilidad antibiotica*. Temas de Bacteriología y Virología Médica. 663-670.
- Teneva, D. D. (2015). Antimicrobial activity of essential oils and extracts from black pepper, cumin, coriander and cardamom against some pathogenic and saprophytic microorganisms. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 18(4), 373-377.
- Torres, M. E. (2015). *Relación huesped parasito: Mecanismos de defensa del huesped*.
- Vargas flores, T., & Kuno Vargas, A. (2014). Morfología bacteriana. *Revista de Actualización Clinica*, 49(2), 2594-2598.
- Velandia, S. A., Flechas, M. C., Stashenko, E., & Ocazonez, R. (2016). Propuesta para seleccionar aceites esenciales de plantas de colombia para investigación con base en su citotoxicidad. *Revista de la facultad de ciencias farmacéuticas y alimentarias*, 19,20.
- Villada Ramírez, M. E., Millán Cardona, L., Peláez Jaramillo, C. A., Arroyave Quiceno, C., González Hurtado, M. I., & Gil Garzón, M. A. (2017). Characterization of microencapsulated cardamom (*Elettaria cardamomum*) oil extracted using supercritical fluids on a semi-industrial scale. *Brazilian Journal of Food Technology*, 20, 2-12.
- Weber, F. A., Bergmann, A., & Carius, A. (2014). *Fármacos en el medio ambiente –la perspectiva global*. alemania: Umwelt Bundesamt.
- Wigner, E. P. (2005). Theory of traveling wave optical laser . *Phys. Rev.*, 134, A635-A646.

- Yáñez, X., & Cuadro, O. F. (2012). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). *Bistua*, 10(1), 52-61.
- Yeager, A. (24 de Enero de 2019). *The Scientist: Exploring life, inspiring innovation*. Obtenido de An enzyme of the bacteria *Porphyromonas gingivalis* has been found in the brains of patients with the disorder, and causes neurodegeneration in mice.: <https://www.the-scientist.com/news-opinion/gum-disease-could-drive-alzheimers--study-65379>

