

COMPOSICION QUIMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Thymus vulgaris* L. “Tomillo”, POR CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRO DE MASA GC/MS Y ANALISIS DE SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Olinda Acosta L, Américo Castro¹, Mirtha Roque,² Luis Félix¹

¹ Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales. Sección Química Orgánica Aplicada a la Farmacia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

² Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología Sección Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM.

RESUMEN

Se ha realizado el estudio del aceite esencial extraído de las hojas y flores de *Thymus vulgaris* L. “Tomillo” por arrastre con vapor de agua. El cual se sometió al análisis físico – químico y determinación de la composición química mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas GC/MS, determinándose compuestos hidrocarbonados como: Tujona; 1,3,6-octatrieno, 3,7-dimetil; Canfeno; Beta-mirceno; Delta-4-careno; Benceno, 1-metil-4-(1-metil etil); Gama terpineno; Beta selineno; Germacreno D; Delta cadineno; Tras-cariofileno; Beta-bisaboleno y compuestos oxigenados como: 7-octen-4-ol (CAS); 1,6-octadieno-3-ol, 3,7-dimetil acetato; Linalol; Isoborneol; carvacrol; Timol; Acetato de farnesil 2. Asimismo, se determinó la actividad antimicrobiana frente a cepas patógenas procedentes de muestras clínicas y de la ATCC (American Type Culture Collection), observándose actividad inhibitoria frente a las cepas: *Escherichia coli*, *Escherichia coli*, ATCC 25922 *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus β hemolítico*, *Staphylococcus epidermidis* N° 36, *Shigella flexnery*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras claves: *Thymus vulgaris* L., “Tomillo”, aceite esencial, compuestos hidrocarbonados, actividad antimicrobiana, cepas patógenas.

ABSTRACT

A study of the essential oil extracted from the leaves and flowers of the *Thymus vulgris* L. “Tomillo” by steam distillation method was carried out. Samples were determined by physico-chemical analyses and chemical composition was obtained by GC/MS mass spectrophotometer coupled to gaschromatographer, determining the following hydrocarbonated compounds like: Thujene; 1,3,6 Octatriene,3,7-Dimethyl; Camphene; Beta Myrcene; Delta 4 Carena; Beta Selinene; Delta Cadinene; Benzene 1 methyl, 4 (1-methyl ethyl); Gama Terpinene; Trans Caryophyllene; Germacrene D.; Trans Caryophyllene; Beta Bisabolene y compuesto oxigenados como: 7 octen, 4 ol (CAS); 1.6 octadien, 3 ol, 3,7 Dimethyl Acetate; Linalool; Isoborneol; carvacrol; Thymol; Farnesyl acetate 2.

At the same time, antimicrobial activity was determined against pathogenic strains from clinical samples and from ATCC (American Typical Cultivate Collection) strains, observing inhibitory activity against the following strains: *Escherichia coli*, *Escherichia coli*, ATCC 25922 *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus β hemolítico*, *Staphylococcus epidermidis* N° 36, *Shigella flexnery*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: Garden-Thime L., essential oil, hydrocarbonated compounds, antimicrobial activity, pathogenic strains.

INTRODUCCION

Las plantas son recursos renovables de múltiple uso para el hombre. Le proporcionan alimentos para su subsistencia, fibras textiles para vestirse y material para sus casas. Además lo curan o intoxican según sus propiedades.

En nuestro país, cientos de plantas son utilizadas en medicina folklórica o popular, cuya práctica se ha incrementado en los últimos años. Las principales razones son su bajo costo comparado con los medicamentos de marca.

Experiencias científicas permitieron conocer que el valor medicinal de las plantas se debe a la presencia en sus tejidos de una sustancia química – el principio activo – que es el que produce el efecto farmacológico. Muchos de ellos son complejos y aún desconocidos, otros han sido aislados, purificados e incluso sintetizados. Entre estos constituyentes activos se hallan los aceites esenciales.

Los aceites esenciales o esencias son mezclas de sustancias orgánicas olorosas, químicamente formadas por terpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos. Pueden localizarse en un determinado órgano vegetal, como flores, hojas, frutas y hasta raíces o en toda la planta. Los aceites esenciales suelen obtenerse por destilación de las partes de la planta que contienen la esencia y el método depende de la condición del material vegetal.

La importancia de la Fitoterapia en la actualidad pone de manifiesto la necesidad de investigar sobre las propiedades de numerosas plantas que aún no han sido determinadas perfectamente en nuestro medio, tal es el caso de *Thymus vulgaris L.* muy usado en la

medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades respiratorias, posiblemente como consecuencia de una infección bacteriana y como antiséptico principalmente. Por ese motivo es importante el estudio botánico, químico y microbiológico de las diferentes especies vegetales tratando de encontrar los principios activos, tanto en forma aislada como en extractos, responsables de la acción terapéutica.

Todo ello ha motivado al estudio de la acción inhibitoria de crecimiento bacteriano del aceite esencial extraído de hojas y flores del *Thymus vulgaris L.* “Tomillo”, frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras procedentes de casos clínicos y de la ATCC asimismo, la determinación de los componentes del aceite esencial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

- Muestra de *Thymus vulgaris L.* “Tomillo” fresca y estabilizada recolectada en el departamento de Ancash.
- Cepas de muestras clínicas y de la ATCC (American Type Culture Collection).

Procedimientos

- Extracción del aceite esencial mediante sistema de arrastre con vapor de agua y determinación de sus propiedades fisico-químicas. (Diagrama 1 y 2).
- Clasificación y procedencia de las cepas utilizadas en el análisis microbiológico para la determinación antimicrobiana (ver cuadro 1).

Extracción del aceite esencial

Para la extracción de la fracción volátil se trabajó con 8,145 kg de plantas frescas y estabilizadas. Se utilizó el método de arrastre con vapor de agua. Se procedió a colocar una cantidad determinada de hojas frescas fraccionadas en un balón, de tal manera que el material no esté en contacto directo con el agua. Luego se calentó hasta desprendimiento de vapor, el cual arrastra la esencia de la

planta, la que al pasar a través del refrigerante se condensa y recolecta en un embudo de decantación donde se separó por su densidad. El producto obtenido fue deshidratado con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se guardó en refrigeración (4-6°C) en frasco oscuro y hermético para su uso posterior, obteniéndose un rendimiento de 0,35%. se realizaron 23 extracciones lográndose un volumen total de 28,5mL.

DIAGRAMA 1

PREPARACION DE LA MUESTRA PARA EL ESTUDIO FISICO-QUIMICO Y MICROBIOLOGICO

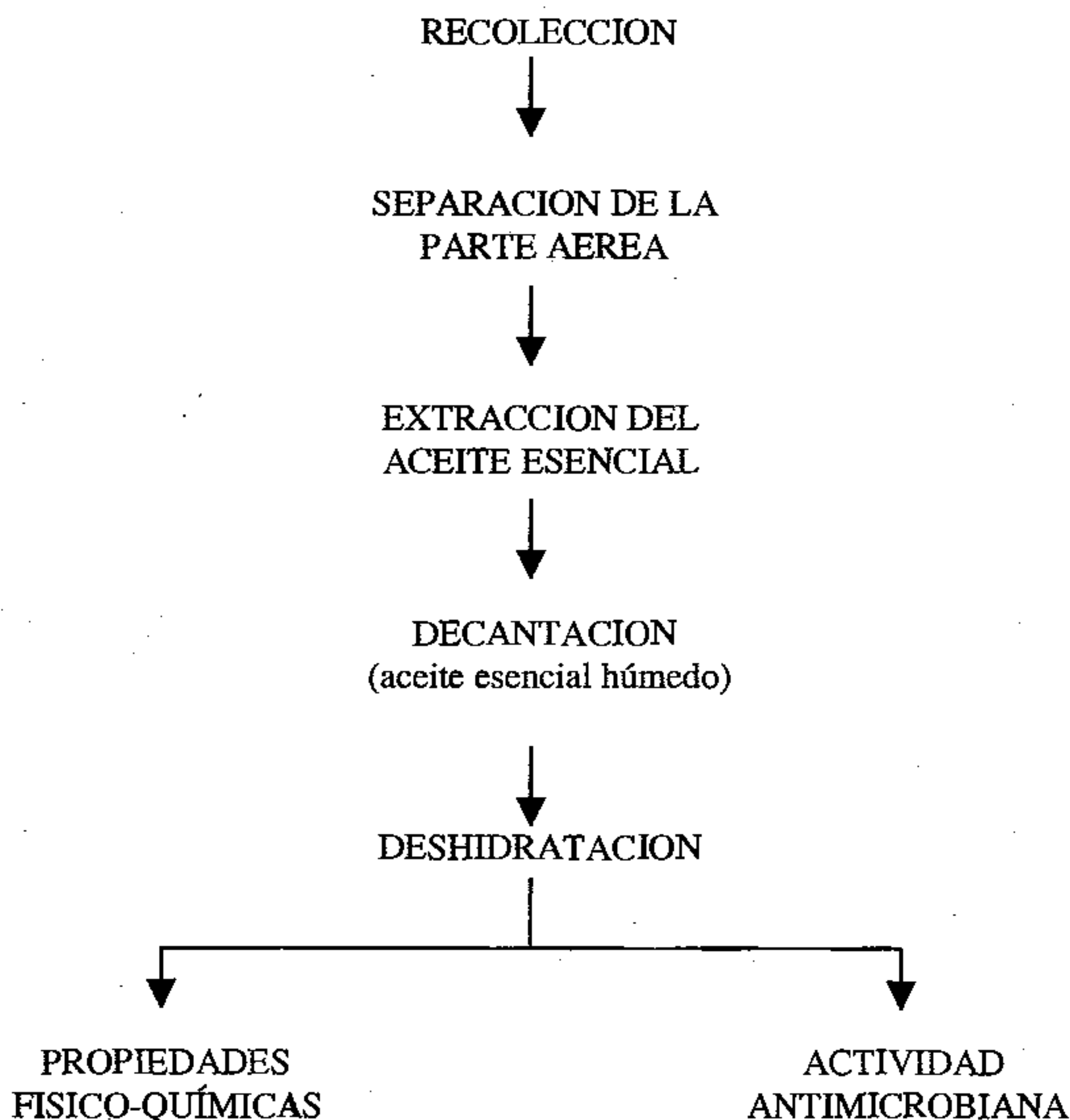


DIAGRAMA 2



Cuadro 1. Clasificación y procedencia de las cepas utilizadas en el análisis microbiológico

Microorganismos de Prueba	Origen
Gram positivos	
• Micrococcus luteus	> ATCC 9341
• Staphylococcus aureus	> ATCC 6538
Staphylococcus aureus	Secreción nasofaríngea
Streptococcus, β hemolitico	Secreción faríngea
• Staphylococcus, epidermis	Nº 36
Gram negativos	
• Escherichia coli	ATCC 25922
Escherichia coli	Urocultivo
• Pseudomonas aeruginosa	ATCC
Pseudomonas aeruginosa	Secreción faríngea
Shigella flexnery	Urocultivo
Salmonella typhi	Coprocultivo
Salmonella paratyphi	Coprocultivo
Levaduras	
Candida albicans	ATCC 10231
Candida albicans	Secreción vaginal

• Cepas puras proporcionadas por el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM

RESULTADOS

Se reporta en los cuadros del 2 al 4 los resultados obtenidos en las reacciones de coloración, los análisis físico y cuantitativo y la cromatografía en capa fina, respectivamente.

El cuadro 5, nos reporta la determinación de la

composición por el método de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masa GC/MS.

El cuadro 6 reporta el resultado de la actividad antimicrobiana del aceite esencial, frente a microorganismos, Gram positivos, Gram negativos y Levaduras.

Cuadro 2. Resultados de las reacciones de coloración del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.*

Funciones Químicas	Reacciones	Color de la Reacción	Resultados
Alcoholes	Reacción de Xantatos	Amarillo	Positivo
Aldehídos y Cetonas	Reacción con 2,4 dinitrofenilhidracina		Negativo
Alquenos	Reacción de Von Boeyer	Precipitado Marrón	Positivo
	Reacción con bromo en CCl ₄	Rojo	Positivo
Fenoles	Reacción coloreada de Cloruro Férrico	Azul	Positivo
Hidrocarburos Aromáticos	Reacción con H ₂ SO ₄ fumante	Derivados del Benceno Rojo	Positivo
		Derivados del Naftaleno	Negativo

Cuadro 3. Análisis físico y cuantitativo del aceite esencial de *Thymus vulgaris L.*

Ensayo Físico	Resultado			
Índice de Refracción	1,4951 a 20° C			
Densidad relativa D=M/V	0,9175 a 20° C			
Rotación Óptica	+ 0,55 a 20° C			
Solubilidad en Etanol 96°	Vol. Alcohol (mL)	1	2	3
	Vol. Aceite (gotas)	V	V	V
	Solubilidad	Ligeramente soluble	Soluble	Totalmente soluble
Ensayos cuantitativos				
Índice de acidez	0,41			
Índice de saponificación	21,57			
Índice de ésteres	13,7			

Cuadro 4. Cromatografía en capa fina del aceite esencial

Banda de Compuesto	Valor de Rf
Timol muestra	0,82
Timol estándar	0,82
Carvacrol muestra	0,81
Carvacrol estándar	0,81

Fase estacionaria: Cromatoplasas: Sílicagel 60F
 Fase Móvil: Tolueno, acetato de etilo
 Vainillina 1% ácido sulfúrico 10%

Cuadro 5. Determinación de la composición del aceite esencial por método de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (gc/ms)

Hidrocarbonados		
TR (Minutos)	Compuesto	%
2,85	Tuyona	0,53
3,01	1,3,6 octatrieno, 3,7 dimetil	0,42
3,43	Camfeno	0,45
4,12	Beta mirceno	1,59
4,96	Delta 4 careno	1,18
13,75	Beta selineno	0,17
14,72	Delta Cadineno	0,23
6,10	Benceno 1 metil 4 (1-metil etil)	1,7
6,80	Gama Terpineno	11,4
13,25	Trans Cariofileno	6,6
14,15	Germacreno – D	0,85
16,15	Trans Cariofileno	1
18,71	Beta bisa boleno	0,53
Oxigenados		
4,36	7 octen 4 ol (CAS)	0,62
4,68	1,6 octadieno 3 ol, 3,7 dimetil acetato	0,18
9,00	Linalol	2,18
10,51	Isoborneol	2,39
12,47	Carvacrol	31
12,59	Timol	32,6
19,12	Acetato de farnesil 2	4,4

Cuadro 6. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L.

Microorganismos de Prueba	Zona de Inhibición (mm)		
	Aceite esencial	Aceite esencial diluido	
		1:10	1:20
Gram positivos			
• <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	50	48	20
• <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	32	24	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	22	8
<i>Streptococcus</i> β hemolitico	65	42	23
• <i>Staphylococcus epidermidis</i> N° 36	38	28	12
Gram negativos			
• <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	20	12	5
<i>Escherichia coli</i>	18	10	3
• <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	12	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	15	10	-
<i>Shigella flexnery</i>	78	45	10
<i>Salmonella typhi</i>	17	12	7
<i>Salmonella paratyphi</i>	14	9	8
Levaduras			
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	90	45	35
<i>Candida albicans</i>	80	48	25

• Cepas ATCC

— La actividad antimicrobiana fue determinada según el método de excavación placa cultivo y las medidas de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano en mm

DISCUSIÓN

El aceite esencial obtenido de la parte aérea de la especie *Thymus vulgaris* L. tuvo un rendimiento de 0,35% siguiendo el método de arrastre con vapor de agua lo cual está dentro del parámetro general para el material fresco en intervalo 0,3% - 3% (1,2).

En los ensayos físico - químicos del aceite esencial, el análisis organoléptico determinó un aroma característico a timol de sabor astringente y aromático, aspecto oleoso y color amarillento pálido (1,3).

Con relación a la identificación de grupos funcionales característicos del aceite esencial

de *Thymus vulgaris* L., se realizaron las técnicas convencionales para estos trabajos.

El grupo funcional alcohol se identificó con el reactivo disulfuro de carbono, el cual en medio básico se une al oxígeno del grupo alcohólico formando la sal Xantato insoluble de color amarillo (4).

La presencia de moléculas insaturadas (Alquenos) en el aceite esencial se determinó mediante la prueba de Bromo en tetracloruro de carbono, reacción basada en la adición de bromo en los enlaces insaturados, lo que se notó por la decoloración de la solución de bromo. La prueba de permanganato corroboró la existencia de insaturaciones (5,6).



La presencia de fenoles se determinó mediante la prueba de cloruro férrico manifestando la típica coloración azul (7,8).

La presencia de hidrocarburos aromáticos en la esencia se comprobó por la adición de formaldehído en ácido sulfúrico, manifestando una coloración rojiza debida a la alquilación del anillo aromático (8,9).

En cuanto a la densidad e índice de refracción, se pueden hacer deducciones sobre sus componentes. Por lo tanto, densidades menores de 0,9 e índice de refracción menor de 1,47 sugiere un alto porcentaje de hidrocarburos terpénicos o compuestos alifáticos. Si la densidad es mayor de 0,9 y el índice de refracción menor del,47 es posible que haya compuestos oxigenados alifáticos. Los hidrocarburos aromáticos tienen densidades menores de 0,9 pero índice de refracción mayores de 1,47. Los compuestos oxigenados aromáticos o alicíclicos tienen densidad e índice de refracción superiores a los límites señalados. La densidad relativa obtenida es 0,9475 a 20°C. El valor obtenido está en el intervalo que presenta el Food Chemical Codex III, Cáceres (6) y Remington que es de 0,910-0,935.

El índice de refracción determinado es 1,4951 a 20° C valor que concuerda con lo expresado por los autores mencionados que es 1,451-1,505 a 20°C. La densidad y el índice de refracción tienen un valor superior a los límites señalados lo que significa que el aceite esencial de *Thymus vulgaris L.* contiene compuestos oxigenados aromáticos.

El índice de acidez, el de saponificación y el índice de ésteres nos señalan la presencia de ácidos libres en forma de ácidos carboxílicos y fenoles de ésteres respectivamente.

Con el objeto de determinar y caracterizar algunos de los metabolitos mayoritarios se realizó cromatografía en capa fina, observándose la presencia de timol y carvacrol al comparar con muestras estándares de dichos compuestos.

Por cromatografía de gases y espectrómetro de masas (GC/MS) se ha confirmado la presencia de compuestos, como: Tuyona; 1,3,6-octatrieno, 3,7-dimetil; Canfeno; Beta-mirceno; Delta-4-careno; Benceno, 1-metil-4-(1-metiletil); Gama terpineno; Trans cariofileno; Beta selineno; Germacreno D; Delta cadineno; Tras-cariofileno; Beta-bisaboleno que pertenecen a la fracción hidrocarbonada y en la fracción oxigenada como: 7-octen-4-ol (CAS); 1,6-octadieno-3-ol, 3,7-dimetil acetato; Linalol; Isoborneol; carvacrol; Timol; Acetato de farnesil 2. Similares a los reportados por Bhaskara (10) coincidiendo con lo realizado de que la presencia de fenoles en el aceite esencial rectifica la hipótesis de la acción antimicrobiana del *Thymus vulgaris L.*

Mediante este trabajo, también se logró comprobar la actividad antimicrobiana del aceite esencial extraído de las flores y hojas de *Thymus vulgaris L.* y diluciones del mismo (1:10 y 1:20), frente a microorganismos Gram positivos, Gram negativos y Levaduras, procedentes de casos clínicos y la ATCC. Las cepas utilizadas fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β hemolitico*, *Staphylococcus epidermidis* N° 36, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, *Shigella flexnery*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans*.

Se observó acción antimicrobiana frente a todos los microorganismos Gram positivos y Gram negativos, así como levaduras.

Datos anteriores sobre investigación de las propiedades del aceite esencial de *Thymus vulgaris* han demostrado inhibición de crecimiento en cepas de *E. Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi* y algunos hongos y levaduras; los resultados obtenidos en la presente investigación son similares a los reportados (3).

El ensayo antifúngico reveló que el aceite esencial extraído tiene máxima actividad inhibitoria frente a *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* procedentes de muestra clínica tal como se observa en el cuadro 2, 3, 4 y 6.

CONCLUSIONES

- De las hojas y flores de *Thymus vulgaris* L. "Tomillo" se obtuvo el aceite esencial con un rendimiento de 0,35% utilizando el método de arrastre con vapor de agua.
- En el aceite esencial obtenido se realizó la determinación fisico-química de alcoholes, alquenos, fenoles y derivados del benceno. En los ensayos físicos se determinó la densidad y el índice de refracción, cromatografía en capa fina y la cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro (GC/MS), por el cual se identifica en la composición química del aceite esencial, la presencia de timol y carvacrol como componentes de mayor porcentaje contenido en el aceite esencial.

- El aceite esencial y las diluciones del mismo aceite (1:10 y 1:20) muestran actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β hemolitico*, *Staphylococcus epidermidis* N° 36, *Shigella flexnery*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans*. La cepa de *pseudomonas aeruginosa* ATCC y Clínica sólo presenta halo de inhibición frente al aceite esencial y a la dilución 1:10.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fisher H.; Mart, L 1991. Análisis Moderno de los Alimentos. Editorial Acribia Zaragoza.
2. Baduio D.S. 1996 Química de los Alimentos. Editorial Alhambra Mejicana 3^{ers} Edición. México D.F. págs. 446 – 449
3. Lock de Ugaz, O. 1994. Investigación Fitoquímica Métodos de Estudio de Productos Naturales. 2^{da} Edición. Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Págs. 21 – 49
4. Font Quer 1962. Plantas Medicinales. El Dioscorides renovado. Editorial Labor. Barcelona. Págs. 273 – 275
5. A.O.A.C. 1980 Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists XIII Edition, Washington D.C.
6. Cáceres, A. 1995. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Editorial Universitaria, Guatemala. Págs. 358–360

7. **Dominguez Xorge 1985.** Métodos de Investigación Fitoquímica. 3^{ra} Edición. Editorial Limusa S.A. México. Págs. 229– 238.
8. **Fenarolis 1997.** Handbook of Flavor Ingredients, Food Chemical Codex 111. 3^{ra} Edición Manographo. Vol 1.
9. **Gibaja O. 1977.** Guía para Análisis de los Compuestos de Carbono. Editorial Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Págs. 16, 17, 43, 70
10. **Bhaskara M., Angers Paul 1998** Phytochemistry Vol. 47 N°8. Printed in Great Britain. London. Págs. 1515-1520.