



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**



Determinación *in vitro* de la efectividad de *Thymus vulgaris* como
coccidicida

TESIS

Presentada para obtener el grado de
**MAESTRA EN CIENCIAS
EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL**

presenta

ANA KAREN GONZÁLEZ MENDOZA F121028

Directora

DRA. MARÍA DE LOURDES ZARAGOZA MARTÍNEZ

Codirectora

DRA. MARÍA CELINA LUJÁN HIDALGO

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México

Febrero, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS, CAMPUS V.
DIRECCIÓN



VILLAFLORES, CHIAPAS
26 DE ENERO DE 2021
OFICIO N° D/0022/2021

C. ANA KAREN GONZÁLEZ MENDOZA
MAESTRANTE EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS CAMPUS V
P R E S E N T E.

En atención a que usted ha presentado los votos aprobatorios del Honorable Jurado, designado para su evaluación de posgrado, de la tesis titulada: **“Determinación *in vitro* de la efectividad de *Thymus vulgaris* como coccidicida”**, por este conducto le comunico que se le autoriza la impresión del documento, de acuerdo a los lineamientos vigentes de la Universidad.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR”

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONÓMICAS



AUTÓNOMA
DIRECCIÓN

M. C. CARLOS ALBERTO VELÁZQUEZ SANABRIA
ENCARGADO DE LA DIRECCIÓN

C. c. p. Archivo

CAVS+MARH.



Código: FO-113-09-05

Revisión: 0

CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DE LA TESIS DE TÍTULO Y/O GRADO.

El (la) suscrito (a) Ana Karen Gonzalez Mendoza,
Autor (a) de la tesis bajo el título de "Determinación in vitro de la efectividad de Thymus vulgaris como coccidicida

_____"
presentada y aprobada en el año 20 21 como requisito para obtener el título o grado de Maestra en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical, autorizo a la Dirección del Sistema de Bibliotecas Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH), a que realice la difusión de la creación intelectual mencionada, con fines académicos para que contribuya a la divulgación del conocimiento científico, tecnológico y de innovación que se produce en la Universidad, mediante la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Consulta del trabajo de título o de grado a través de la Biblioteca Digital de Tesis (BIDITE) del Sistema de Bibliotecas de la Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH) que incluye tesis de pregrado de todos los programas educativos de la Universidad, así como de los posgrados no registrados ni reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT.
- En el caso de tratarse de tesis de maestría y/o doctorado de programas educativos que sí se encuentren registrados y reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional del Ciencia y Tecnología (CONACYT), podrán consultarse en el Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma de Chiapas (RIUNACH).

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; a los 3 días del mes de febrero del año 20 21.

Ana Karen Gonzalez Mendoza

Nombre y firma del Tesista o Tesistas

DEDICATORIA

A Dios...

Tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son resultado de tu ayuda.

Este trabajo de tesis ha sido una gran bendición en todo sentido y te lo agradezco padre, y no cesan mis ganas de decir que es gracias a ti que esta meta está cumplida.

Gracias por estar presente no solo en esta etapa tan importante de mi vida, sino en todo momento ofreciéndome lo mejor y buscando lo mejor para mi persona.

A mis padres Guillermo y Elizabeth...

Por su amor incondicional, sus esfuerzos y sacrificios, por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí, gracias a mi madre por siempre motivarme en mis noches de estudio, a mi padre por siempre desear y anhelar siempre lo mejor para mi vida, gracias por cada consejo y por cada palabra de aliento que me guía durante esta hermosa vida.

A mi familia...

A mis hermanas Lizbeth y Dulce María, por escucharme cuando las necesito, por las muestras de amor incondicional y momentos felices que siempre me brindan, a mi sobrino Liam por ser parte de mi motivación y razón de felicidad.

A mi esposo Jesús Armando...

Por estar en aquellos momentos en que el estudio y el trabajo ocuparon mi tiempo y esfuerzo. Gracias por toda tu ayuda. Por tu paciencia y tu amor incondicional, por haber sido mi fuente de inspiración en mí deseo de proseguir mis estudios.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología-CONACYT, por el apoyo financiero otorgado a través de la beca de posgrado.

Al comité de selección de la Universidad Autónoma de Chiapas por creer y confiar en mis capacidades al permitirme ingresar y ser parte de la 12^a generación de la MCPAT. A sus docentes por compartir sus conocimientos, experiencias y consejos a fin de formarme como Maestra.

A la Doctora María de Lourdes Zaragoza Martínez, directora de tesis, por su apoyo, confianza, orientación y entrega incondicional. Por su amistad y ejemplo de vida.

A la Doctora María Celina Luján Hidalgo, codirectora de tesis, por aceptar la invitación a emprender este proceso de aprendizaje, por la confianza que aún sin conocerme quiso depositar en mí, por su apoyo y sus consejos.

A la Doctora María Eréndira Reyes García, asesora, por su confianza, apoyo y colaboración para el desarrollo de esta investigación, por su amistad.

A la Doctora María Guadalupe Rodríguez Galván, asesora, por su confianza, comprensión y apoyo brindado a lo largo de este proceso.

Al Doctor Pedro Cadena Iñíguez, asesor, por su confianza, apoyo y orientación para el procesos de publicación de un artículo.

A mis amigos Jesús Alberto, Enrique y Eliza, por brindarme esa amistad y compañía, por sus consejos, sus palabras de aliento y por estar ahí cuando más lo necesite, gracias por todos los recuerdos que dejan en mi mente y en mi corazón.

A todos, gracias...



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



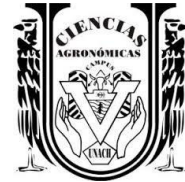
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL

Esta tesis titulada DETERMINACIÓN *in vitro* DE LA EFECTIVIDAD DE *Thymus vulgaris* COMO COCCIDICIDA forma parte del proyecto de investigación “La producción agropecuaria de traspatio en municipios de alta marginación en Chiapas” registrado en la Dirección de Investigación y Posgrado de la UNACH, bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Zaragoza Martínez.

Se incluye en la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: TECNOLOGÍA E INNOVACIÓN EN LOS SISTEMAS TRADICIONALES Y ALTERNATIVOS DE PRODUCCIÓN SUSTENTABLE, del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agropecuaria Tropical y como parte de las líneas de investigación del Grupo Colegiado Agricultura Familiar.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL

Esta tesis titulada DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA EFECTIVIDAD DE *Thymus vulgaris* COMO COCCIDICIDA fue realizado por la MVZ. Ana Karen González Mendoza, bajo la dirección y asesoría del Comité Tutorial indicado, como requisito para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA

DRA. MARÍA DE LOURDES ZARAGOZA MARTÍNEZ

CODIRECTORA

DRA. MARÍA CELINA LUJÁN HIDALGO
TecNM, Campus Tuxtla

ASESORES

DRA. MARÍA GUADALUPE RODRÍGUEZ
GALVÁN

MPA. MARÍA ERÉNDIRA REYES GARCÍA

DR. PEDRO CADENA IÑIGUEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL

Esta tesis titulada **DETERMINACIÓN *in vitro* DE LA EFECTIVIDAD DE *Thymus vulgaris* COMO COCCIDICIDA**, realizada por la MVZ. ANA KAREN GONZÁLEZ MENDOZA, ha sido aprobada por la Comisión Revisora indicada, como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROPECUARIA TROPICAL.

COMISIÓN REVISORA

DRA. MARÍA DE LOURDES ZARAGOZA MARTÍNEZ

DRA. MARÍA CELINA LUJÁN HIDALGO

MPA. MARÍA ERÉNDIRA REYES GARCÍA

Contenido

RESUMEN	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	2
OBJETIVO GENERAL.....	4
<i>Objetivos específicos</i>	4
HIPÓTESIS	4
2. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 FAMILIA <i>EIMERIIDAE</i>	5
2.1.1 CICLO BIOLÓGICO, SIGNOS CLÍNICOS E IMPACTO ECONÓMICO	5
2.1.2. <i>Control</i>	7
2.1.3. <i>Signos clínicos</i>	8
2.2 ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS EN LA AVICULTURA CON EL USO DE ACEITES ESENCIALES	9
2.3 BASES, CALIDAD, Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES EN AVES	11
2.4 TOMILLO (<i>THYMUS VULGARIS</i>).....	13
2.4.1 <i>Principales componentes químicos del tomillo</i>	14
2.4.2 <i>Usos descritos en farmacias y en sistemas tradicionales de medicina</i>	14
2.4.3 <i>Posología</i>	15
2.4.4 <i>Toxicología</i>	15
2.5 MICROENCAPSULACIÓN	16
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
3.1 ÁREA DE ESTUDIO	17
3.2 MATERIALES	17
<i>Material vegetal</i>	17
3.3. MÉTODOS	17
<i>Fase I. Extracción de aceite esencial de Thymus vulgaris</i>	17
<i>Secado por aspersión</i>	18
<i>Caracterización de los compuestos volátiles en el aceite esencial de Thymus vulgaris</i>	20
<i>Preparación del estándar de Timol</i>	20
3.4 COLECTA E IDENTIFICACIÓN DE <i>EIMERIA SPP.</i>	21
<i>Técnica de McMaster</i>	21
<i>Técnica de flotación</i>	22
<i>Micrometría</i>	23
<i>Cultivo de oocistos de coccidias en dicromato de potasio</i>	24
<i>Fase II. Prueba in vitro</i>	26
3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
4.1 FASE 1. EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE <i>THYMUS VULGARIS</i>	27
4.1.1 <i>Composición química</i>	27
4.1.2 <i>Microencapsulado</i>	29
4.1.3 <i>Curva de calibración de Timol</i>	31
4.1.4 <i>Identificación de timol</i>	31

4.5 PRUEBA <i>IN VITRO</i>	33
5. CONCLUSIONES	40
6. LITERATURA CITADA	41
7. ANEXOS	48
<i>Cuadro A1. Muestra de polvo goma MD-GA</i>	48
<i>Cuadro A2. Muestra de aceite esencial de T. vulgaris</i>	49
<i>Cuadro A3. Curva de timol</i>	50
<i>Figura A1. Gráfica de curva de timol</i>	50
<i>Cuadro A4. Oocistos dañados y no dañados</i>	51
<i>Cuadro A5. Prueba de CH2</i>	51
<i>Figura A2. Oocistos dañados con aceite esencial de T. vulgaris microencapsulado</i>	52
<i>Figura A4. Lisis de oocistos de Eimeria spp.</i>	54
<i>Figura A5. Oocistos esporulado (fase infectante)</i>	55
<i>Figura A6. Lisis de esporozoitos</i>	56

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Especies de <i>Eimeria</i> que parasitan a aves de corral. Se indican algunas de sus diferencias de su ciclo biológico (Ferre, 2019).....	6
Cuadro 2. Lista de productos alternativos (al uso de anticoccidiales) su modo de acción y el efecto resultante en la coccidiosis. (Kadykalo <i>et al.</i> , 2018).....	11
Cuadro 3. Componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> detectados por cromatografía de gases (Escobar, 2014).....	14
Cuadro 4. Componentes del aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> detectados por cromatografía de gases-espectrometría de masa (González y Luján,2019).....	27
Cuadro 5. Componentes de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> microencapsulados detectados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (González y Luján,2019).	30
Cuadro 6. Especies de <i>Eimeria</i> spp., encontradas en aves de corral (González y Reyes, 2019).....	35

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida <i>Eimeria</i> (Kadykalo, 2018).....	7
Figura 2. Secado del material vegetal (<i>Thymus vulgaris</i>).....	17
Figura 3. Destilación por arrastre de vapor a) pesaje de la planta, b)Destilación, c)Recolección.....	18
Figura 4. Secador por aspersión (Mini Spray Dryer B-290, BUCHI)Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.....	19
Figura 5. Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas (Agilent Technologies).....	20
Figura 6. Estándar de timol (Sigma Aldrich®).....	21
Figura 7. Conteo de oocistos.....	22
Figura 8. Solución con oocistos para realizar la identificación.....	23
Figura 9. Escala micrométrica para la medición de oocistos.....	24
Figura 10. Cultivo de <i>Eimerias .spp.</i>	25
Figura 11. Oocistos esporulados observados al microscopio (10x).....	25
Figura 12. Curva de calibración de timol.....	31
Figura 13. Cromatograma de estándar de timol.....	31
Figura 14. Cromatograma de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i>	32
Figura 15. Cromatograma de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> microencapsulado.....	32
Figura 16. Prueba <i>in vitro</i> aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> a) Oocisto esporulado intacto, b)Oocistos esporulados con pared deformada a las 40 min.,c) Oocistos esporulados con pared rota a las 24 horas.....	34
Figura 17. Curso del tiempo de oocistos dañados con aceite esencial de <i>T. vulgaris</i>	37
Figura 18. Curso del tiempo de oocistos dañados con aceite esencial de <i>T. vulgaris</i> microencapsulado con maltodextrina.....	37
Figura 19. Análisis de contingencias de oocistos dañados.....	38
Figura 20. Análisis factorial de correspondencias simples basado en Chi2.....	39

RESUMEN

Existe un factor que afecta seriamente la salud y la productividad del sistema de producción avícola que es causada por el protozoario del género *Eimeria spp.* que causa la coccidiosis, una de las enfermedades más comunes de las aves, que provoca efectos económicos muy importantes.

En este trabajo se plantea como objetivo determinar la efectividad del aceite esencial de *Thymus vulgaris* como coccidicida *in vitro*. Se presentan como objetivos específicos: a) Caracterizar la composición química del aceite esencial obtenido a partir de hojas secas y tallos de *Thymus vulgaris* por Cromatografía de Gases-espectrometría de masas (CG-EM), b) Establecer la dosis coccidicida efectiva *in vitro* del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

Se realizó la extracción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* mediante destilación por arrastre de vapor. Posteriormente se realizó el encapsulamiento del aceite esencial mediante la técnica de secado por aspersión empleando una mezcla de Maltodextrina 10DE-Goma arábica (60-40 v/v como agente encapsulante. Finalmente se caracterizaron los compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de *Thymus vulgaris* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Para establecer la dosis coccidicida efectiva *in vitro* del aceite esencial de *T. vulgaris* se realizó un filtrado de 30 μ L de cultivo homogenizándolo con vortex para cuantificar el número de ooquistes esporulados presentes. Una vez estandarizada la cantidad se procedió a evaluar el efecto del aceite esencial obtenido por destilación por arrastre de vapor, se añadieron 30 μ L de aceite esencial de *T. vulgaris* equivalente a 3.77mg de timol al preparado de oocistos esporulados evaluando por observación microscópica (Primo Star, Zeiss) a las 2, 4, 8 y 24 horas, para determinar si hubo daño o no en los oocistos. Del mismo modo para realizar la prueba *in vitro* del aceite esencial de *T. vulgaris* microencapsulado se pesó la cantidad de polvo necesario para obtener 3.84mg de timol y se mezcló con 1mL de agua destilada para romper las cápsulas y liberar el aceite esencial, después se añadió 1mL de cultivo de eimerias esporuladas homogenizando en vortex para recolectar 60 μ L equivalente a 30 μ L de oocistos y 30 μ L de aceite esencial de *T. vulgaris* microencapsulado, en un periodo de tiempo de 2, 4, 8 y 24 horas; se evaluó mediante la observación enfocando con el objetivo 40x los daños que se generaban a partir de colocar el aceite esencial de *T. vulgaris* y microencapsulado, en los oocistos. Se obtuvieron los siguientes resultados, el rendimiento de extracción del aceite esencial de *Thymus vulgaris* fue de 4.47 mL/Kg de materia seca. Los componentes mayoritarios del aceite esencial obtenido son timol (31%) o-cimol (24.8%) y α -terpineno (19.5%).El contenido de timol en el aceite esencial es de 125.84 \pm 8.29 mg de timol/mL de aceite. Posterior al proceso de encapsulamiento se cuantificaron 382.83 \pm 32.12 mg timol/100 g de polvo. La abundancia relativa de timol en las muestras microencapsuladas incrementó al 44%. Lo anterior puede atribuirse a la pérdida por volatilidad de algunos compuestos constituyentes del aceite esencial durante el encapsulamiento generando una mayor abundancia relativa de timol.

Para establecer la dosis coccidicida efectiva *in vitro*; se recolectaron 30 μ L de la solución del cultivo en la cual se cuantificaron 54 oocistos posteriormente se realizó la identificación de *eimerias spp.* por micrometría. Durante la fase *in vitro* se observó deformación, lisis de la pared quística y esporozoitos provocando disminución del número de oocistos durante los primeros 40 min. de observación. Se realizó un análisis factorial de correspondencia simple basado en Chi Cuadrado en donde no se encontró una diferencia significativa con el T1 (aceite esencial de *T. vulgaris*) y T2 (aceite esencial de *T. vulgaris* encapsulado) en los oocistos dañados; y una relación de los oocistos no dañados con el T3 testigo (dicromato de potasio) con un nivel de significancia de $P < 0.05$; el efecto encontrado se debe al mecanismo de acción del aceite esencial el cual según García-García & Palou-García (2008); señalan que el timol por su hidrofobicidad permite la separación de los lípidos de la membrana celular y de la mitocondria; desordenando la estructura y haciéndola más permeable, provocando la salida del material intracelular y por consiguiente provocando la muerte de los microorganismos. Como conclusión se observó que el componente mayoritario del aceite esencial de *Thymus vulgaris* fue el timol con 31% de abundancia relativa en la muestra, mientras que en la muestra encapsulada el contenido de timol fue de 44%. El método de secado por aspersion empleando maltodextrina 10DE y goma arábica es adecuado para el encapsulamiento del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, ya que sus compuestos mayoritarios, principalmente timol se retiene en la matriz sólida de la microcápsula, obteniéndose un producto en polvo que permite una mejor manipulación e incorporación a diferentes matrices alimentarias. La dosis coccidicida efectiva *in vitro* del aceite esencial de *T. vulgaris* establecida en el presente trabajo fue de 3.7mg de aceite esencial y 3.84mg timol de aceite esencial de *T. vulgaris* microencapsulado por cada 30 μ L de cultivo, basado en la reducción de oocistos infectantes en 40 min. y una acción oocisticida en 24 hrs.

PALABRAS CLAVE: Coccidiosis, microencapsulado, timol.

ABSTRACT

There is a factor that seriously affects the health and productivity of the poultry production system that is caused by the protozoan of the genus *Eimeria* spp. which causes coccidiosis, one of the most common diseases of birds, which causes very important economic effects.

The objective of this work is to determine the effectiveness of *Thymus vulgaris* essential oil as a coccidicide in vitro. The following are presented as specific objectives: a) To characterize the chemical composition of the essential oil obtained from dried leaves and stems of *Thymus vulgaris* by Gas Chromatography-mass spectrometry (GC-MS), b) To establish the effective in vitro coccidicidal dose of the *Thymus vulgaris* essential oil.

The extraction of the essential oil of *Thymus vulgaris* was carried out by steam distillation. Subsequently, the encapsulation of the essential oil was carried out through the spray drying technique using a mixture of Maltodextrin 10DE-Gum arabic (60-40 v / v as encapsulating agent. Finally, the volatile compounds present in the essential oil of *Thymus vulgaris* were characterized by Gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) To establish the effective in vitro coccidicidal dose of the essential oil of *T. vulgaris*, a filtrate of 30 μ L of culture was performed, homogenizing it with vortex to quantify the number of sporulated oocysts present. Once the amount had been standardized, the effect of the essential oil obtained by steam distillation was evaluated, 30 μ L of essential oil of *T. vulgaris* equivalent to 3.77mg of thymol was added to the sporulated oocyst preparation, evaluating by microscopic observation (Primo Star, Zeiss) at 2, 4, 8 and 24 hours, to determine whether or not there was damage to the oocysts. In the same way, to carry out the in vitro test of the microencapsulated essential oil of *T. vulgaris*, the amount of powder necessary to obtain 3.84mg of thymol was weighed and mixed with 1mL of distilled water to break the capsules and release the essential oil, then it was added 1mL of sporulated eimerias culture, homogenizing in vortex to collect 60 μ L equivalent to 30 μ L of oocysts and 30 μ L of microencapsulated essential oil of *T. vulgaris*, in a period of time of 2, 4, 8 and 24 hours; It was evaluated through observation, focusing with the 40x objective the damages that were generated from placing the essential oil of *T. vulgaris* and microencapsulated, in the oocysts. The following results were obtained, the extraction yield of the essential oil of *Thymus vulgaris* was 4.47 mL / Kg of dry matter. The main components of the essential oil obtained are thymol (31%) or-cymole (24.8%) and α -terpinene (19.5%). The content of thymol in the essential oil is 125.84 ± 8.29 mg of thymol / mL of oil. After the encapsulation process, 382.83 ± 32.12 mg thymol / 100 g of powder were quantified. The relative abundance of thymol in the microencapsulated samples increased to 44%. This can be attributed to the loss due to volatility of some constituent compounds of the essential oil during encapsulation, generating a greater relative abundance of thymol.

To establish the effective coccidicidal dose in vitro; 30 μ L of the culture solution were collected in which 54 oocysts were quantified, subsequently the identification of eimerias spp. by micrometry. During the in vitro phase, deformation, lysis of the cystic wall and sporozoites were observed, causing a decrease in the number of oocysts during the first 40 min. observational. A simple correspondence factorial analysis based on Chi Square was carried out where no significant difference was found with T1 (essential oil of *T. vulgaris*) and T2 (essential oil of *T. vulgaris* encapsulated) in the

damaged oocysts; and a ratio of the undamaged oocysts with the control T3 (potassium dichromate) with a significance level of $P < 0.05$; the effect found is due to the mechanism of action of the essential oil, which according to García-García & Palou-García (2008); point out that thymol due to its hydrophobicity allows the separation of lipids from the cell membrane and from the mitochondria; disorganizing the structure and making it more permeable, causing the exit of intracellular material and consequently causing the death of microorganisms. As a conclusion, it was observed that the major component of the essential oil of *Thymus vulgaris* was thymol with 31% relative abundance in the sample, while in the encapsulated sample the thymol content was 44%. The spray drying method using 10DE maltodextrin and gum arabic is suitable for encapsulating the essential oil of *Thymus vulgaris*, since its main compounds, mainly thymol, are retained in the solid matrix of the microcapsule, obtaining a powder product that allows a better handling and incorporation into different food matrices. The effective *in vitro* coccidicidal dose of the essential oil of *T. vulgaris* established in the present work was 3.7mg of essential oil and 3.84mg thymol of microencapsulated essential oil of *T. vulgaris* per 30 μL of culture, based on oocyst reduction infectives in 40 min. and an oocysticidal action in 24 hrs.

KEYWORDS Coccidiosis, microencapsulated, thymol.

1. INTRODUCCIÓN

La cantidad de aves de corral ha crecido de modo exponencial en todo el mundo, aproximadamente el 80% de los hogares rurales de los países en desarrollo crían aves de corral (FAO-OMS, 2005). En México, más de 75% de las familias rurales practica la avicultura familiar, ya que es una de las principales fuentes de proteína animal para las familias (Zaragoza *et al.*, 2014).

Los principales países productores de aves a nivel comercial son Estados Unidos, Brasil, China, India, Rusia y México; nuestro país ocupando el sexto lugar con una participación pecuaria a nivel nacional de 62.9.% de producción de carne y huevo (UNA, 2019). Sin embargo, existe un factor que afecta seriamente a la salud y a la productividad del sistema de producción causada por el protozoo del género *Eimeria* que causa la coccidiosis, una de las enfermedades más comunes de las aves. Los efectos económicos son dramáticos, se estima que causa pérdidas económicas globales de hasta 6,000 millones de pesos mexicanos anuales (Kadykalo *et al.*, 2018).

El estado de Chiapas ocupa el séptimo lugar a nivel nacional en producción avícola (SIAP, 2019), debido a que esta especie tiene un corto intervalo de generación y que bajo las condiciones geográficas y ambientales de la región manifiestan una alta tasa de productividad.

Ruíz *et al.* (2014), mencionan que el manejo sanitario en las explotaciones de tipo rural en Chiapas es descuidado, por lo que los animales padecen de enfermedades y está correlacionado con que el 63% de los productores no utilizan desparasitantes y 68% presenta problemas de mortalidad en la parvada. En consecuencia, las aves no expresan su potencial genético, con lo cual su producción y salud disminuyen e incrementan los índices de morbilidad, mortalidad y conversión alimenticia, lo cual trae como resultado pérdidas económicas a los productores.

Tradicionalmente se han utilizado para su control diversos fármacos, posteriormente se han desarrollado vacunas y recientemente se está potenciando la utilización de sustancias naturales como alternativa al tratamiento convencional mediante fármacos

ionóforos y químicos, debido a la aparición de resistencia a los fármacos tradicionales y una mayor exigencia en seguridad alimentaria por parte de la industria alimentaria la cual tiene como objetivo la eliminación de residuos en carne y huevos de los fármacos utilizados para el control de coccidiosis. Con la finalidad de regular la utilización de los compuestos medicinales usados en la industria aviar la Comisión Europea ha propuesto una reducción progresiva de productos con efecto coccidiostático a partir del 31 de diciembre de 2012, esta próxima prohibición depende de medidas de control alternativas para la cría de aves, sin comprometer el rendimiento de la producción comercial, el bienestar animal y la salud (Haug, 2008).

En el estado de Chiapas, el valor de la herbolaria médica radica en que es una forma de atención a la salud en la que confían y a la que recurren de manera cotidiana amplios sectores de la población; además de ser accesible, es una práctica legitimada culturalmente.

Un considerable número de investigaciones, ha demostrado que los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* tienen diferentes mecanismos de acción dentro de las células y dependiendo de las concentraciones utilizadas pueden causar la inhibición o inactivación de los microorganismos (García *et al.*, 2008). Con base a lo anterior, en el presente trabajo se plantean las siguientes preguntas de investigación:

¿Es eficaz el aceite esencial de *Thymus vulgaris* como alternativa natural al control de la coccidiosis en aves infestadas con *eimeria spp.*?

¿Cuál es la dosis efectiva del aceite esencial de *Thymus vulgaris* como coccidicida en aves?

Objetivo general

Determinar la efectividad *in vitro* del aceite esencial de *Thymus vulgaris* como coccidicida

Objetivos específicos

- a) Caracterizar la composición química del aceite esencial obtenido a partir de hojas secas y tallos de *Thymus vulgaris* por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM).
- b) Establecer la dosis coccidiocida efectiva *in vitro* del aceite esencial de *Thymus vulgaris*.

Hipótesis

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* es efectivo para el control de *Eimeria spp.*, *in vitro*

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Familia *Eimeriidae*

La forman 16 géneros y cerca de 1,340 especies, los más importantes en Medicina Veterinaria son *Eimeria* e *Isospora* y las infecciones con estos géneros se refieren a menudo como coccidiosis (Taylor, 2007).

La coccidiosis aviar es una enfermedad parasitaria causada por protozoos del *Phylum Apicomplexa*, familia *Eimeriidae*. Aunque afecta a diversas especies de aves, es en el pollo de carne y gallina ponedora o reproductora, donde alcanza la mayor repercusión económica. En el pollo (*Gallus gallus*), se han citado 15 especies diferentes. La mayoría de estas especies fueron descritas a partir de características morfológicas de ooquistes y la mayor parte de ellas no han vuelto a ser citadas (Del Cacho, 2013). Actualmente se consideran siete especies de *Eimeria* que parasitan a *Gallus domesticus* comúnmente (Cuadro 1).

La unidad funcional del coccidio es el zoito, el cual es una célula móvil que tiene forma de coma, banana o boomerang. El zoito es el comienzo y el final del ciclo vital de los coccidios. Los esporozoitos son las formas infectantes que se encuentran en los ooquistes esporulados y son el resultado de la segmentación del protoplasma (Bowman, 2014). El protoplasma (esporonte) está envuelto por una pared resistente y es eliminado en las heces.

2.1.1 Ciclo biológico, signos clínicos e impacto económico

Es un género de parásito perteneciente a la familia *Eimeriidae* presente en la mayoría de aves. Causando coccidiosis enfermedad aguda del tracto gastrointestinal. Fase infectante o asexual (esporogonia). Cuando cae al suelo, el oquiste, esporula y permanece viable por más tiempo, si existen condiciones óptimas de humedad y temperatura. Se consideran como condiciones óptimas si en la cama hay humedad relativa del 80% y una temperatura de 28-31°C, ya esporulado se encuentran en su

fase infectante y pueden continuar el ciclo biológico cuando un pollo lo ingiere (Sántiz, 2017).

Cuadro 1. Especies de *Eimeria* que parasitan a aves de corral. Se indican algunas de sus diferencias de su ciclo biológico (Ferre, 2019).

<i>Eimeria</i> spp.	No. de Ezquizogonias	Localización en la mucosa	Localización intestinal	Eliminación máxima de ooquistes/ave (millones)	Tiempo de esporulación para el 50% de los ooquistes (horas)
<i>E. acervuilina</i>	4	Espitelial-criptas	Intestino delgado interior	432	11.4
<i>E. brunetti</i>	2-3	Epitelial - vellosidad-, 2ª generación de esquizontes subepitelial	Porción terminal del íleon, recto y cloaca	53	38.3
<i>E. máxima</i>	2-3	Epitelial -criptas-, macrogamontes subepiteliales	Intestino delgado medio	36	38.1
<i>E. mitis</i>	4	Epitelial – vellosidades	Porción distal del intestino delgado	110	19.0
<i>E. necatrix</i>	3	Epitelial -criptas-, 2ª generación de esquizontes subepitelial	Intestino delgado medio, 3ª esquizogonia y gametos en ciegos	12	19.7
<i>E. preacox</i>	3-4	Epitelial-vellosidad	Intestino delgado anterior	160	24.8
<i>E. tenella</i>	3	1ª y 3ª esquizogonias epiteliales (criptas), 2ª esquizogonia subepitelial	Ciegos	65	21.2

El ooquiste al ser ingerido por el ave, sufre la acción de los jugos gástricos y bilis, lo cual provoca el desenquistamiento de los esporozoitos (Figura 1). Se inicia la esquizogonia, los esporozoitos penetran en la célula e inician su desarrollo, pasan por un estado de trofozoito o de crecimiento y llegan a ocupar la mayor parte de la célula; el núcleo se divide iniciándose el estado de esquizontes (seres iguales), cada porción nuclear se rodea de citoplasma formándose un nuevo individuo denominado merozoito (Boch, 1985)

Se formará una segunda y una tercera generación para después transformarse en microgametos o células masculinas y en macrogametos o células femeninas en la fase de la gametogonia (Quiroz, 1984).

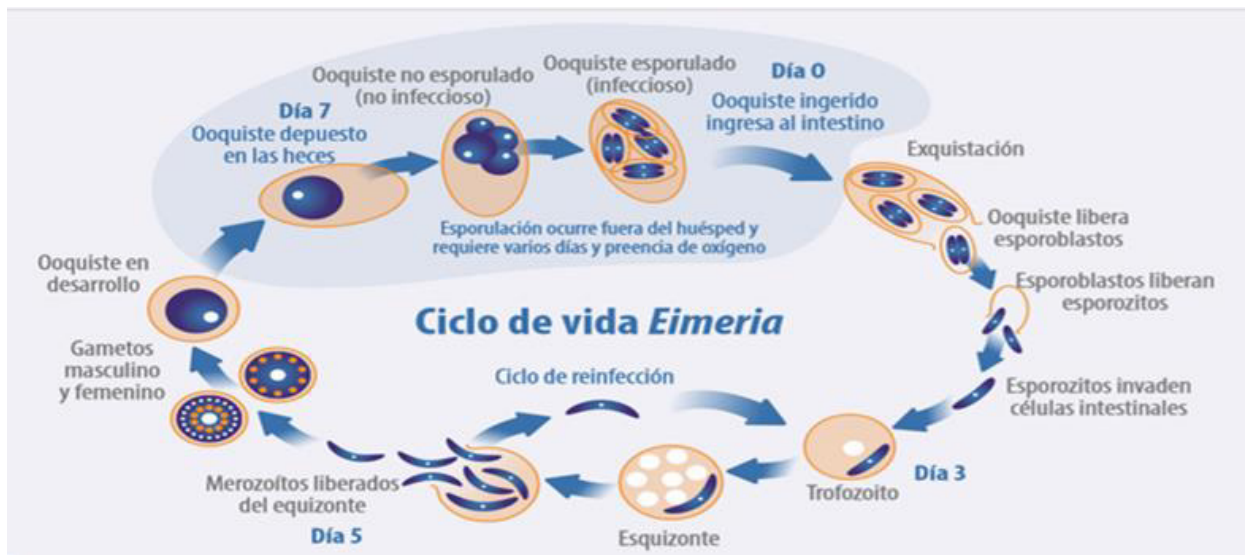


Figura 1. Ciclo de vida *Eimeria* (Kadykalo, 2018)

El microgameto sufre repetidas divisiones nucleares y se convierte en multinucleado. Al final, cada núcleo se incorporará a un microgameto biflagelado o célula sexual masculina. De los muchos microgametos formados por el microgametocito, solo una pequeña proporción encuentra y fecunda los microgametos para formar cigotos. Alrededor del cigoto se crea una pared por la fusión de gránulos hialinos en su periferia para formar un ooquiste. El ooquiste se libera por la rotura de la célula hospedadora y se elimina con las heces para su posterior esporulación. Al cabo de 1 o 2 días, y si las condiciones de humedad, temperatura y oxigenación son adecuadas, la única célula (esporonte) que hay en el ooquiste se divide en cuatro esporoblastos. Cada esporoblasto se transforma en un esporoquiste que contiene dos esporozoitos haploides, convirtiéndose así en un ooquiste esporulado infectante y completando el ciclo (Bowman, 2014).

2.1.2. Control

La forma de control de la coccidiosis aviar se basa esencialmente en el uso de medicamentos sintéticos sin embargo el uso persistente da como resultados el desarrollo de parásitos resistentes, lo que limita su eficacia los ionóforos tienen un mecanismo de acción más complejo pero debido a que la acción que ejercen está dirigida contra los esporozoitos no se observa erradicación completa de los parásitos; la vacunación presenta la siguiente desventaja, los organismos de control sanitario en algunos países no autorizan la introducción de vacunas que contengan especies

de *Eimeria* spp que no existan en el país, ya que al ser vacunas vivas, su uso puede significar un riesgo de introducir la especie(Kadykalo, 2018).

Con la finalidad de regular la utilización de los compuestos medicinales usados en la industria aviar la Unión Europea prohibió una larga lista de productos con efecto coccidiostático. El Reglamento UE N° 2205/2001 limita la lista de coccidiostáticos autorizados como aditivos a las siguientes: robenidina, halofuginona, diclazuril, decoquinato, narasina/nicarbacina, lasalocid, salinomicina sódica, maduramicina de amonio monensina de sodio y narasina, posteriormente se ha permitido la utilización de la nicarbacina como aditivo (Reglamento UE N° 875/2010) y la utilización de Clinacox, Maxiban y Monteban sin periodo de retirada (Reglamento UE N° 885/2010, N° 884/2010, N° 1118/2010) (Del Cacho ,2013).La coccidiosis en las aves es un problema serio; las pérdidas económicas debidas a ésta, son más grandes que las producidas por enfermedades respiratorias. La mortalidad se ha reducido debido al uso de coccidiostatos, por lo que hoy en día las mayores pérdidas resultan por la alteración de la conversión, reducción del crecimiento, un periodo de desarrollo más prolongado y la reducción y retraso en la producción de huevos. En Chiapas la mayoría de casos no se controlan, causando un severo impacto económico incluso bajos niveles de infección causan perturbación en el crecimiento, y pérdida de producción con mayor mortalidad (Santiz, 2017).

Aunque actualmente no hay datos sobre la prevalencia global de coccidiosis se estima que son omnipresentes en el entorno de las operaciones avícolas, a nivel mundial con aproximadamente el 5% de prevalencia de coccidiosis clínica y el 20% de la prevalencia de coccidiosis subclínica (Kadykalo, *et al.* 2018).

2.1.3. Signos clínicos

Las especies de coccidios prefieren diferentes áreas del intestino, algunos producen hemorragias a partir del 4 y 5 día posinfección, enteritis mucoide frecuentemente hemorrágica ocasionando mortalidad, enteritis no hemorrágica, diarreas acuosas que originan detrimento en la ganancia de peso y disminución en la absorción intestinal además de anorexia, plumas erizadas, depresión marcada, palidez de cresta, barbillas y patas (Ferre,2019).

La infección se puede presentar a partir de 3 días de edad hasta 6 semanas; la edad del hospedador en el momento de la infección parece influir en el desenquistamiento de los ooquistes siendo la tasa de desenquistamiento menor en pollitos de 3 días de edad, posiblemente esto estaría ocasionado por la menor capacidad de la molleja para romper los ooquistes y la cantidad de enzima pancreática segregada. La transmisión es directa entre las aves mediante la ingestión de los ooquistes esporulados que se encuentran en el ambiente contaminando, agua y alimento (Ferre, 2019).

2.2 Alternativas terapéuticas en la avicultura con el uso de aceites esenciales

Actualmente se ha iniciado la búsqueda de alternativas terapéuticas con el uso de aceites esenciales para el tratamiento de enfermedades en las aves con el fin de utilizar la medicina tradicional, disminuir gastos y evitar resistencias a antibióticos además de producirlas de manera orgánica.

Se ha utilizado el cempasúchil (*Tagetes erecta*) como pigmentante de productos avícolas debido al alto contenido de xantofilas, zeaxantinas y luteínas presentes en las corolas; este pigmento no contribuye en el valor nutritivo del producto y tampoco en el comportamiento productivo de las aves (Peña, 2003).

El ajo (*Allium sativus*) perteneciente a la familia *Liliaceae*, se ha utilizado también como alternativa a los promotores de crecimiento en pollos de engorda reportando que la inclusión de extracto de ajo al 1 % en el agua de bebida en pollos de engorda, ejerce un efecto sobre la salud de la mucosa intestinal (Botía y Hortúa, 2013).

Se han evaluado los efectos nematocidas y bactericidas de plantas medicinales como el orégano español (*Plectranthus amboinicus*) administrado a aves de traspatio en infusión elaborada con 10 g de hojas frescas en 90 mL de agua potable, agregando 1 mL por cada litro de agua de bebida en las aves observando que induce una reducción en la cantidad de enterobacterias (Chiriboga, 2016) y el orégano de monte (*Lippia origanoides Kunth*) en el cual la suplementación de 100 ppm de aceite esencial en pollos de engorda redujo el impacto negativo en ooquistes de *Eimeria*

spp.(Betancourt et al., 2012) .Se han reportado efectos nematocidas de plantas como el epazote (*Chenopodium ambrosioides*) en gallos de pelea (Álvarez, et al., 2011).

En Ecuador se probó el aceite esencial de *Thymus vulgaris* como promotor del crecimiento en aves de traspatio, agregando 600 ppm (34.73 g/ave/día) en la alimentación de las aves, obteniendo como resultados incremento en la ganancia de peso (Toalombo, 2017). También se han desarrollado productos eubióticos con mezclas de aceites esenciales como timol, eugenol y piperina las cuales generan un equilibrio saludable de la microbiota en el tracto intestinal de las aves, que les permite; expresar su potencial genético y como tal DSM Nutritional Product ® ha patentado un nuevo producto eubiótico a base de aceites esenciales y ácido benzoico obteniendo como resultados incremento de la ganancia de peso hasta el 3% y mejora del índice de conversión del 1.5% (Alesón, 2011).

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios sintetizados por plantas, producidos al momento de activarse como mecanismo de defensa en respuesta a los factores ambientales y ecológicos, estos presentan atracción de polinizadores, entre otros. Son inflamables, no son tóxicos, aunque pueden provocar alergias en personas sensibles a determinados terpenoides. Son inocuos mientras la dosis suministrada no supere los límites de toxicidad (Rodríguez, 2012).

La mejora genética en los sistemas de producción avícola actual, ha intensificado la búsqueda de alternativas de uso de antibióticos (Torres, 2002). Los cuales se utilizan dentro del régimen alimenticio de las aves, generando un gran impacto a la salud pública por esta razón la OMS sugirió su prohibición y retiro del mercado a nivel mundial (FAO-OMS, 2005).

El uso de coccidiostatos botánicos y otros productos naturales pueden proporcionar un enfoque novedoso para el control de coccidiosis, En el cuadro 2 se muestran aditivos alternativos como anticoccidiales, algunos compuestos de plantas y productos naturales parecen tener actividad anticoccidiósica frente a especies de *Eimeria* spp. (Sumano, 2010).

Cuadro 2. Lista de productos alternativos (al uso de anticoccidiales) su modo de acción y el efecto resultante en la coccidiosis. (Kadykalo *et al.*, 2018).

Aditivo alimentario alternativo	Modo de acción	Efecto resultante	Referencia
Artemisa (aceite esencial)	Inducción del estrés oxidativo	Reducción <i>in vitro</i> del número de ooquistes	Remmal <i>et al.</i>
Clavo (aceite esencial)	Desconocido	Reducción <i>in vitro</i> del número de ooquistes	Remmal <i>et al.</i>
Curcumina (cúrcuma) en combinación con saponinas e inulina	Estimulación inmune por inactivación de radicales reactivos de nitrógeno	Sin efecto significativo en la puntuación de lesión	Sheurer <i>et al.</i>
Orégano (aceite esencial)	Estimula la inmunidad de la mucosa	Sin efecto significativo en la puntuación de lesión	Sheurer <i>et al.</i>
Quillaja (extracto de planta)	Actividad antiprotozoaria (se une a proteínas de membrana de células protozoarias)	Sin efecto significativo en la puntuación de lesión	Sheurer <i>et al.</i>
S-nitroso-glutatión (GSNO)	Inhibe el proceso de esporulación de <i>Eimeria tenella</i>	Interrupción del proceso de esporulación durante 10 h después de la esporulación inicial; sin efecto más allá de las 12 h	Li <i>et al.</i>
Sericea Lespedeza (extracto de la planta)	Los taninos tienen actividad anticoccidial contra el parásito	No hay diferencia significativa en el número de ooquistes	Rathinam <i>et al.</i>
Árbol de té (aceite esencial)	Desconocido	Reducción <i>in vitro</i> del número de ooquistes	Remmal <i>et al.</i>
Tomillo (aceite esencial)	Desconocido	Reducción <i>in vitro</i> del número de ooquistes	Remmal <i>et al.</i>

2.3 Bases, calidad, y mecanismo de acción de los aceites esenciales en aves

Cada planta aromática almacena los aceites en distintas partes, en el caso del tomillo (*T. vulgaris*) Se utilizan las hojas, flores y tallos para extraer el aceite esencial.

La calidad de los aceites esenciales depende del sistema de cultivo, madurez de la planta en el momento de la recolección, origen geográfico de la planta y las condiciones de almacenamiento ya que, para garantizar la calidad de los aceites se deben de conservar en frascos de vidrio oscuros y cerrados herméticamente para evitar reacción de oxidación (Bazán, 2006).

Estos compuestos se utilizan desde hace algunos años para la alimentación de los animales ya que son productos naturales que tienen efectos importantes en la

producción, sanidad y bienestar de los animales que los consumen. Dentro de sus efectos principales se pueden destacar:

- Mejoran la digestibilidad de nutrientes.
- Aumentan la producción de enzimas digestivas (lipasas, amilasas, tripsina, etc)
- Aumentan la retención de nitrógeno.
- Tienen una acción antioxidante y anti-inflamatoria
- Estimulan el sistema inmune inespecífico, aumentando la producción de macrófagos y linfocitos.
- Tienen un efecto antimicrobiano, antifúngico, antiparasitario y antiprotozoario

Las propiedades y efectos de los aceites esenciales son variables, dependiendo de cada uno de los compuestos, y de su "quimiotipo". El quimiotipo es el perfil bioquímico del aceite esencial e indica su componente bioquímico y su acción o efecto más significativo (Meteur, 2009).

Las moléculas de los aceites esenciales están agrupadas en varios quimiotipos, según la similitud de sus propiedades, y pueden ser cetonas, ésteres, cumarinas, fenoles, monoterpenoles, etc. Numerosos aceites contienen más de un quimiotipo, por lo que muchos de ellos tienen una amplia variedad de efectos benéficos. La identificación precisa de los quimiotipos determina las propiedades del aceite esencial.

El quimiotipo permite identificar los aceites esenciales presentes en una misma variedad botánica, pero con composición química distinta. Su composición química es fundamental porque de ella dependen las propiedades y efectos del aceite y también su grado de toxicidad (Meteur, 2009).

El mecanismo de acción de los aceites esenciales en bacterias está basado en inducir un claro daño estructural y funcional a las membranas celulares, para alterar la permeabilidad selectiva, con pérdida de iones, ATP, ácidos nucleicos, aminoácidos, cambio de pH, etc.; no obstante, aún resta mucho que estudiar para entender el mecanismo de acción de estas sustancias (Sumano, 2010).

Actualmente se han desarrollado productos eubióticos con mezclas de aceites esenciales como timol, eugenol y piperina presentes en la naturaleza en plantas como tomillo, clavo, bayas, y arándanos pero su aplicación es nueva en la alimentación de las aves los cuales generan un equilibrio saludable de la microbiota en el tracto intestinal, que permite al animal expresar su potencial genético (Alesón, 2011)

2.4 Tomillo (*Thymus vulgaris*)

El género *Thymus* pertenece a la familia de las *Lamiaceae* o *labiatae* es una hierba aromática perenne, 20-50 cm de alto, tallo recto, muy ramificado, ligeramente leñoso, con hojas abundantes, 4-10 mm de largo, opuestas, obtusas, agudas, pecíolos cortos, lanceoladas. Flores terminales numerosas, púrpura pálido o blancas, 7-8 mm de largo, tubulares, bilabiadas, grupos de 2-3 flores; flores bisexuales de mayor tamaño, estambres protubulares, femeninas más pequeñas. Semilla lisa, ovalada, 0.7-1.0 mm de largo (OMS 2010).

Hábitat

El hábitat natural del tomillo se encuentra en países de la cuenca mediterránea occidental, especialmente sobre suelos soleados y secos. Predomina en el este, centro y sur de la Península Ibérica, así como en Baleares. Sobre suelos calizos, arcillosos y menos frecuentemente en los silíceos (Cano, 2001). Puede encontrarse en una altitud entre 0 y 2.000 msnm. Sus especies crecen bajo temperaturas muy variadas e incluso extremas. Crece en climas templados, templado-cálidos y de montaña. Resiste bien las heladas y sequías, pero no el encharcamiento ni el exceso de humedad ambiente. Aunque se adapta bien a los suelos ricos en aluvión y calcáreos, se adapta a los arcillosos, ligeros y silíceos. Prefiere la exposición a mediodía. Normalmente, se disponen en forma de matorral bajo en zonas de sol directo e intenso, que soportan gracias a la impregnación oleosa de sus hojas (SIAP, 2019).

En México se cultiva en diferentes estados pero la mayor producción se encuentra en Baja California Sur con 53.5 toneladas anuales y San Luis Potosí con 0.50 toneladas

(SIAP, 2019). Durante el año 2018, se registró a nivel nacional, una producción de tomillo cultivado de manera orgánica de 50.97 toneladas con un rendimiento de 3,186 kg/ha. (SEMARNAT, 2018).

2.4.1 Principales componentes químicos del tomillo

Contiene aproximadamente un 2.5% pero no menos de un 1.0% de aceite volátil. La composición de los aceites volátiles fluctúa dependiendo del quimiotipo. Bajo consideración. Los componentes principales de la hierba son timol y carvacrol (hasta un 64% de aceite), junto con linalool, p-cymol, cimeno, timeno, α -pineno, apigenina, luteolina y 6-hidroxluteolinaglucósidos, así como flavones di, tri y tetrametoxilados, todos sustituidos en la posición 6 (por ejemplo, 5,4'-dihidroxi-6,7-dimetoxiflona avona, 5,4'-dihidroxi-6,7, 3'-trimethoxyflavone y su 8-metoxiladoderivado 5,6,4'-trihidroxi-7,8,3'-trimetoxiplifona (Xiaorui, 1999). En el siguiente cuadro 3 se mencionan los componentes mayoritarios del aceite esencial de *T. vulgaris*.

Cuadro 3. Componentes mayoritarios del aceite esencial de *Thymus vulgaris* detectados por cromatografía de gases (Escobar, 2014).

Componente	%	Índice de Retención	Tiempo de Retención
P cimeno	24.81	1020	13.91
Alfa terpineno	6.62	1054	16.50
Linalol	1.19	1095	20.44
Timol	32.62	1289	42.22
Carvacrol	0.78	1298	43.07
Trans cariofileno	4.37	1417	51.32
Óxido de cariofileno	2.51	1582	57.50
1,2-ácido dicarboxibenzenico(2-etil hexil) mono éster	9.21	No reportado	76.08

2.4.2 Usos descritos en farmacias y en sistemas tradicionales de medicina

El extracto de tomillo se ha utilizado por vía oral para tratar la dispepsia y otros trastornos gastrointestinales; tos por resfriados, bronquitis, tos ferina; laringitis y amigdalitis (como gárgaras). Las aplicaciones tópicas de extracto de tomillo se han utilizado en el tratamiento de heridas leves, el resfriado común, trastornos de la

cavidad bucal, y como agente antibacteriano en la higiene bucal. Tanto el aceite esencial como el timol son ingredientes de una serie de medicamentos patentados que incluyen pomadas antisépticas y curativas, jarabes para el tratamiento de trastornos respiratorios y preparaciones para inhalación (OMS,2010).

Estudios demuestran que el extracto de hojas tiene efectos antimicrobianos y el aceite esencial tiene efecto fungistático y fungicida (Cano, 2001). En medicina popular se le atribuyen además otros efectos como emenagogo, sedante, antiséptico, antipirético, y como alternativa en el tratamiento de la dermatitis (OMS, 2010).

2.4.3 Posología

Como promotor de crecimiento en aves se ha utilizado 600ppm (34.73g/ave/día) (Toalombo, 2017). El aceite esencial de *Thymus vulgaris* se ha administrado como probiótico con dosis de 1g/kg de alimento, mejorando la ganancia diaria de peso en pollos de engorda (Pournazari *et al*, 2016). Como tratamiento para enfermedades respiratorias se utiliza la tintura (1:10, 70% de etanol): 40 gotas a 3 veces al día por 15 días; para gárgaras o enjuague bucal una infusión al 5% (OMS,2010). Como alternativa oocisticida para coccidiosis aviar se han utilizado concentraciones *in vitro* de estándar de timol de 0.3 a 20 mg/mL (Remmal *et al.*,2013).

2.4.4 Toxicología

Es importante señalar que el aceite esencial de tomillo es considerado GRAS (Generalmente considerado como seguro) por la FDA (Administración de alimentos) por lo que el timol no es considerado nocivo para la salud (Falcone *et al.*, 2005). Además, la acción antimicrobiana y la sensibilidad al timol es dependiente de ciertos factores como el tipo de microorganismo, pH del medio, y temperatura de incubación (Falcone *et al.*, 2005).

Los productos naturales entre ellos el tomillo (*T. vulgaris*) son considerados de primer orden como un antimicrobiano (Xiaorui,1999) y fitobiótico de origen natural para sustituir los productos químicos, debido a que actualmente han sido positivos sin ningún efecto tóxico en la producción de aves con diferentes fines zootécnicos (Alesón, 2011). La DL50 del timol por vía oral en ratas es 980mg/kg (Cano, 2001). En

aves se han encontrado diversas alteraciones a nivel de vellosidades intestinales y de hepatocitos, sin diferencias significativas con dosis en alimento de 1kg/ t (Shiva *et al.*, 2012).

2.5 Microencapsulación

Con frecuencia las propiedades de los aceites esenciales no se aprovechan plenamente debido a su gran volatilidad y tendencia a oxidarse (Turek *et al.*, 2012), por lo cual es necesario fijarlos a un transportador para proporcionarles una adecuada estabilidad y vida útil. Una de las mejores alternativas para llevar a cabo esto es la microencapsulación, para lo cual pueden emplearse biopolímeros de origen natural (Acosta, 2009; Barros *et al.*, 2014; (Dima *et al.*, 2014); Soliman *et al.*, 2013). Generalmente, los materiales de pared usados para microencapsulación son goma arábica, maltodextrina, carbometilcelulosas y almidón (Camacho, *et al.*, 2010)). La microencapsulación se realiza empleando numerosos procesos uno de ellos es el secado por aspersión o Spray Drying. (Camacho *et al.*, 2010; Yeo *et al.*, 2001; Lopretti *et al.*, 2007), Según las condiciones de elaboración y el tipo de material encapsulante, es posible obtener materiales capaces de retener aceites esenciales y liberarlos en el momento de su uso. Estos productos pueden ser empleados como transportadores de aceites esenciales capaces de brindar protección a los mismos frente a la oxidación, la evaporación y el mantenimiento de su perfil cromatográfico, así como el control de su liberación (Rendón *et al.*, 2010). El secado por aspersión es un método de microencapsulación ampliamente utilizado en la industria que consiste en la dispersión de la sustancia a encapsular en el agente encapsulante seguido de una atomización de la muestra en una cámara a alta temperatura el solvente se evapora instantáneamente y el material activo queda atrapado dentro de una película de material encapsulante (Dziedzic JD., 1988). En varios estudios se ha concluido que el secado por aspersión es adecuado para compuestos sensibles a altas temperaturas proporciona buena estabilidad del producto final requiere bajos costos de procesamiento y es fácil de implementar (Favaro *et al.*, 2010; Krishnan *et al.*, 2005; Jiménez, 2005).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Área de estudio

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de Pequeños Rumiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Campus II de la Universidad Autónoma de Chiapas y en los laboratorios del Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

3.2 Materiales

Material vegetal

El material vegetal hojas y tallos fue adquirido con productores del municipio de San Cristóbal de las Casas, en la región de los Altos de Chiapas 16°44'N 92°38'O. Las muestras fueron transportadas en bolsas de papel estraza al Laboratorio de Biotecnología del Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez para su posterior extracción (Figura 2).



Figura 2. Secado del material vegetal (*Thymus vulgaris*)

3.3. Métodos

Con el fin de dar cumplimiento a los objetivos propuestos, la investigación se desarrolló en dos fases, las cuales se mencionan y se describen a continuación.

Fase I. Extracción de aceite esencial de *Thymus vulgaris*

La extracción del aceite esencial se realizó en el laboratorio de Ingeniería Química del Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Se empleó el método de destilación por arrastre de vapor (Figura 3) de acuerdo a lo reportado por Rodríguez, (2012). Se pesó el material vegetal seco y se mantuvo en

destilación continua durante 90 minutos. El aceite esencial obtenido se separó por diferencia de densidades empleando un embudo de separación. Posteriormente se almacena en un frasco de vidrio color ámbar a 4°C hasta su posterior encapsulamiento.



Figura 3. Destilación por arrastre de vapor. a) Pesaje de la planta, b) Destilación, c) Recolección del aceite esencial.

Secado por aspersión (Microencapsulado).

Se prepararon 100mL de una solución de Maltodextrina 10DE (MD) y goma arábica (GA) al 30% (p/v) cada una, las cuales se dejaron en reposo durante 24h a 4° C para su completa hidratación. Posteriormente, se realizó una mezcla de GA-MD en una relación 60:40 en un volumen final de 100 mL y se adicionaron 3mL de aceite esencial de tomillo (*T. vulgaris*). La emulsión fue homogenizada en un homogenizador Ultra Turrax IKA a 10,000 rpm durante 10 minutos, posteriormente fue alimentada a un secador por aspersión Mini Spray Dryer B-290, BUCHI (Figura 4) con un flujo de 3 mL/min. La temperatura del aire de entrada fue de 120° C y la potencia del aspirador al 100%. El polvo obtenido se recuperó, se pesó y se almacenaron en bolsas selladas al vacío a 4° C.

Determinación de sólidos totales

$$ST = \left[\frac{R}{V} \right] * 100$$

Dónde:

ST= Sólidos totales

R= Gramos residuales

V= Volumen de la muestra

El rendimiento de encapsulamiento se calcula

$$RE (\%) = \frac{\text{g polvo seco}}{\text{g de mezcla}} * 100$$



Figura 4. Secador por aspersión (Mini Spray Dryer B-290, BUCHI). Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

Caracterización de los compuestos volátiles en el aceite esencial de *Thymus vulgaris*

El análisis de la composición química del aceite esencial de *T. vulgaris*, se realizó en un Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas (Agilent Technologies) (Figura 5) empleando una columna DB-Waxter (60cm x 0.25mm x 0.25 μ m) y Helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min. La temperatura del puerto de inyección fue 250° C y la del detector 150° C. El horno se mantuvo inicialmente a 50° C y la temperatura se incrementó 10° C/min hasta 250° C y se mantuvo 2 min a esas condiciones. El volumen de inyección fue 1 μ L en modo Split (100:1). La identificación de los compuestos se realizó empleando la librería Chemstatios-NIST MS Versión 2.0 por comparación de los espectros de masas (70eV) (Luján-Hidalgo *et al.*, 2010).



Figura 5. Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas (Agilent Technologies).

Preparación del estándar de Timol

La cuantificación se realizó empleando estándar externo de timol Sigma Aldrich® (Figura 6) ,se preparó una solución patrón de 1000 ppm en hexano (10mg/mL) y se realizaron diluciones a concentraciones de 50ppm(50 μ L timol+950 μ L hexano)

100ppm(100 μ L timol+900 μ L hexano), 200ppm(200 μ L timol+800 μ L hexano) y 300ppm(300 μ L timol+700 μ L hexano). El volumen de inyección fue 1 μ L en modo Split (100:1).



Figura 6. Estándar de timol(Sigma Aldrich®)

3.4 Colecta e identificación de *Eimeria spp.*

Técnica de *McMaster*

Para la colecta de ooquistes se realizó la técnica de McMaster se recolectaron como mínimo 20 muestras de cada gallinero en un recorrido en zigzag, de manera que al final se obtuvieron heces de la mayor parte del gallinero, incluyendo descargas cecales. Se identificaron y trasladaron en refrigeración al laboratorio de Biotecnología de Pequeños Rumiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNACH, posteriormente, se analizaron mediante la técnica de McMaster para determinar el grado de parasitosis por medio del conteo de ooquistes eliminados de acuerdo a la técnica descrita por (Sánchez *et al.*, 2014).

Descripción de la técnica: En un vaso de McMaster graduado con dos líneas se colocaron 15 mL de solución sobresaturada de azúcar o sal (hasta la primera línea) y

se agregó excremento hasta desplazar la solución a la segunda línea. Se procedió a homogenizar la muestra con una varilla de vidrio, se tapó el vaso de McMaster y se agitó para completar la homogenización. Posteriormente se colocó un trozo de gasa de 5cm aproximadamente (que se utilizó como tamizador) y con un gotero se recolectó la cantidad suficiente para llenar las(s) cámara de McMaster (Figura 7) cuidando de no incluir burbujas a la misma. Se dejó reposar por unos minutos para permitir que flotarán oocistes presentes en la muestra. Se observó en el microscopio empleando el objetivo (10x) seco débil. Se realizó el conteo de todos los oocistes que quedaron incluidos dentro de la cuadrícula (s) cámara (s). Se contaron ambas cuadrículas, multiplicando el número total de oocistos por 50 (Rodríguez *et al.*, 1994).



Figura 7. Conteo de oocistos (González, 2020).

Técnica de flotación

Las especies de *Eimeria spp.* fueron identificadas por morfología y micrometría, para medir longitud y anchura de los oocistos (Rodríguez *et al.*, 1994) una vez que se obtuvieron los oocistos esporulados se procedió hacer la prueba *in vitro* de la dosis efectiva coccidiostática del aceite esencial de *T. vulgaris*.

Descripción de la técnica: en un vaso de precipitado se colocó 15mL de solución sobresaturada de sal, se agregaron 5 g de material fecal y se homogeneizó la muestra hasta que se obtuvo una pasta, se pasó esta suspensión por un tamizador colocándola en un embudo a dos tubos de centrifuga durante 2-3 minutos a 2500 r p m después de ese tiempo con el asa se recolectaron tres gotas (Figura 8) de la

superficie de la suspensión y se colocaron en un portaobjeto (Rodríguez *et al.*, 1994). Se realizó el conteo de los oocistos encontrados en las tres gotas y el resultado se dividió en tres para saber el promedio de oocistos, expresándose el resultado de la forma siguiente:

2 a 6 oocistos, una cruz (+) infección leve.

8 a 18 oocistos, dos cruces (++) infección leve.

20 a 30 oocistos, tres cruces (+++) infección moderada.

32 a 50 oocistos, cuatro cruces (++++) infección grave.

Más de 50 oocistos, cinco cruces (+++++) infección grave.

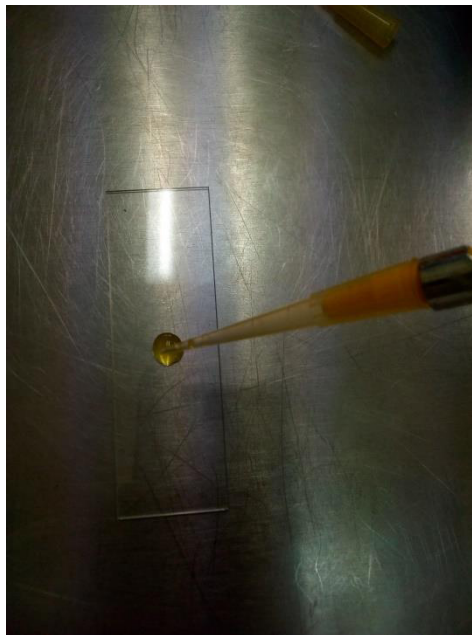


Figura 8. Solución con oocistos para realizar la identificación.

Micrometría

Para realizar la identificación de las especies de *Eimeria* se mide la longitud del oocisto con un microscopio dotado con un ocular calibrado que lleva grabada una escala lineal de 1-2mm de longitud subdividida en unidades de 10 μ m (0.01mm) (Figura 9). Un micrómetro ocular es un disco de cristal grabado con una escala de unidades arbitrarias. El disco se inserta en el ocular del microscopio y se utiliza la escala para comparar las dimensiones lineales de los objetos del campo de observación.

Descripción de la técnica: se enfoca el objetivo sobre la escala del objetivo micrométrico, se gira el ocular hasta que la escala se encuentre paralela a la del objetivo, se hace coincidir ambos ceros mediante el desplazamiento mecánico (Urquhart, 2001).



Figura 9. Escala micrométrica para la medición de oocistos

Cultivo de oocistos de coccidias en dicromato de potasio

Se recolectó materia fecal y posteriormente se transportó en refrigeración para realizar la incubación de ooquistes de *Eimeria spp.* Se realizó una mezcla de 100mL de agua destilada y 2g de dicromato de potasio, posteriormente se colocó en el agitador hasta que se obtuvo una mezcla totalmente disuelta, para realizar el cultivo de oocistos de *Eimeria spp.* en un frasco se colocaron 5 g de heces y 15 mL (Figura 10) de solución de dicromato de potasio al 2% y se mezclaron hasta obtener una solución lo más homogénea posible, el cultivo se almacenó a temperatura ambiente y

con buena oxigenación durante ocho días, posteriormente con una varilla de vidrio se recolectó una gota de esta suspensión, se colocó en un portaobjetos y encima un cubreobjetos para observar al microscopio con el objetivo 4x. Se valoró la esporulación y se procedió a la identificación con un microscopio micrométrico (Urquhart, 2001).



Figura 10. Cultivo de *Eimerias .spp.*

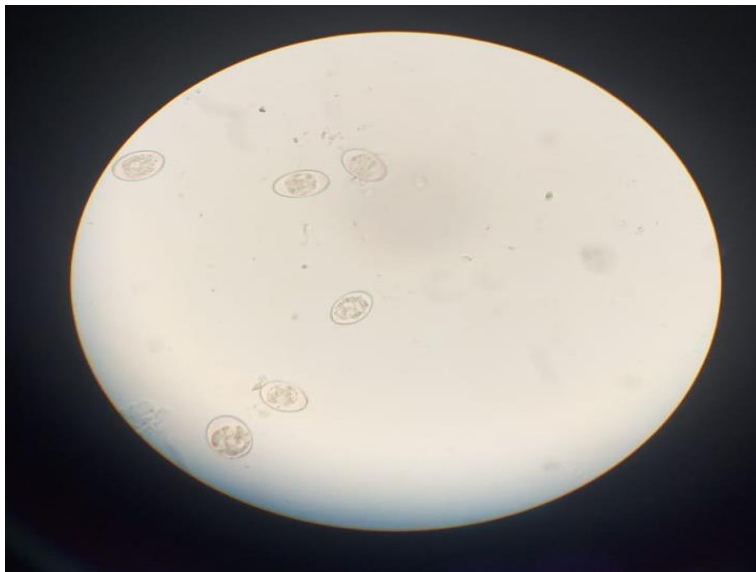


Figura 11. Oocistos esporulados observados al microscopio (10X)

Fase II. Prueba *in vitro*

Para establecer la dosis coccidicida efectiva *in vitro* del aceite esencial de *T. vulgaris* se realizó un filtrado de 30 μ L de cultivo homogenizándolo con vortex para cuantificar el número de ooquistes esporulados presentes (Figura 11). Una vez estandarizada la cantidad se procedió a evaluar el efecto del aceite esencial obtenido por destilación por arrastre de vapor, se añadieron 30 μ L de aceite esencial de *T. vulgaris*. Del mismo modo para realizar la prueba *in vitro* del aceite esencial de *T. vulgaris* microencapsulado se pesó la cantidad de 1 g de polvo, después se añadió 1mL de cultivo de eimerias esporuladas homogenizando en vortex para recolectar 60 μ L equivalente a 30 μ L de oocistos y 30 μ L de aceite esencial de *T. vulgaris* microencapsulado, dejando un periodo de 2,4,8 y 24 horas antes de observar los efectos; se evaluó mediante la observación enfocando con el objetivo 40x los daños que se generaban a partir de colocar el aceite esencial de *T. vulgaris* y microencapsulado, en los oocistos.

3.5 Análisis estadístico

Se realizó un análisis factorial de correspondencias simples basado en χ^2 y un análisis de contingencias para determinar diferencias significativas en cuanto a la efectividad de los tratamientos *in vitro*. Los datos fueron analizados mediante el programa Statistica versión 10.0.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Fase 1. Extracción de aceite esencial de *Thymus vulgaris*

4.1.1 Composición química

El rendimiento de extracción de aceite *T. vulgaris* fue de 4.47 mL/kg de materia seca con una concentración de 125.84±8.29 mg de timol/mL de aceite. En el Cuadro 4 se muestra la composición química del aceite esencial de *T. vulgaris* determinada en este trabajo.

Cuadro 4. Componentes del aceite esencial de *T. vulgaris* detectados por cromatografía de gases-espectrometría de masa (González y Lujan, 2019).

Componente	Abundancia relativa (%)	Tiempo de retención (min)	Área
Canfeno	0.91	7.02	159742
β-pineno	0.34	7.55	59898
α-pineno	0.03	8.06	5074
β-mirceno	1.70	8.12	297843
α-Terpineno	2.23	8.49	389955
Eucaliptol	1.43	8.91	250100
α-Terpineno	19.5	9.39	3415441
o-cimol	24.8	9.76	4341093
β-Linalool	4.40	13.2	768863
(-) Alcanfor	0.31	13.4	54924
P-cimeno	2.29	14.2	400321
Timol	31.1	20.3	5437142
Carvacrol	1.02	20.6	179415
α-Felandreno	0.18	8.28	32150
Limoneno	0.41	8.75	70962
Cis-β-terpineol	0.82	12.3	142925
Aceto de isoborneol	0.28	14.0	49226
Cariofileno	2.96	14.3	516816
α-terpineol	0.30	15.3	52476
Cedreno	0.01	15.4	1119
(-) Borneol	1.16	16.0	203364
1- Naftalenol	0.37	16.1	65199
1,2 corona-4 éter	0.27	16.6	47152
1,5- corona-5 éter	0.31	17.0	54100
Octaetilenglicol monododecil éter	0.25	18.8	42880
α-Thujene	2.53	6.45	442929

Los componentes mayoritarios del aceite son: timol (31.1%) seguido de o-cimol (24.8%) y α -terpineno (19.5%). Los resultados coinciden con lo reportado por Escobar *et al.* (2014) y Paredes (2015) quienes reportaron una abundancia de timol de 32,6% y de o-cimol 24.81%, sin embargo la OMS (2010) menciona que los componentes principales de la hierba son timol y carvacrol hasta un 64% de aceite, al respecto Lambert *et al.* (2001) señalan que en efecto el aceite esencial de tomillo está compuesto por timol, carvacrol y eugenol, los cuales son compuestos fenólicos que poseen fuertes propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos de interés en alimentos.

Los blancos o puntos de ataque de estos agentes antimicrobianos dentro de las células incluyen la pared y membrana celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y sistema genético (García, 2008) Por lo que es extendido el uso del aceite esencial de *T. vulgaris* como antimicrobiano y antioxidante natural. Así como es reconocida su eficacia inhibitoria contra *Clostridium botulinum* y *Clostridium perfringens*. Su efecto contra gramnegativos es más débil que en contra de grampositivos. Los principales principios activos del extracto alcohólico, timol y carvacrol; aislados tienen actividad inhibitoria marcada contra *Bacillus subtilis*, *S. sonnei*, *E. coli*. Más aún, el extracto acuoso de *T. vulgaris* inhibe a *Helicobacter pylori* (Sumano, 2010)

Una característica importante que cabe señalar es que el aceite esencial de tomillo es considerado GRAS (Generally Recognized as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration) por lo que el timol no es considerado nocivo para la salud. Además, la acción antimicrobiana y la sensibilidad al timol es dependiente de ciertos factores como el tipo de microorganismo, pH del medio, y temperatura de incubación (Falcone *et al.*, 2005). En trabajos realizados en diferentes países por Remmal *et al.* (2013) han utilizado el aceite esencial de *T. vulgaris* para aves de traspatio y pollos de engorda encontraron que concentraciones *in vitro* de 0.3 a 20 mg/L sirven como tratamiento y control de *Eimeria* spp. y también como próbiotico con dosis de 1g/kg de alimento, mejorando la ganancia diaria de peso en pollos de engorda (Pournazari, 2016).

El contenido de aceites esenciales en una planta es variable y depende en lo principal de su metabolismo secundario, llega en algunas especies a encontrarse un contenido de hasta el 8 % en condiciones óptimas de extracción (Ospina *et al.*, 2015).

Los aceites esenciales pueden variar en calidad, cantidad y composición de acuerdo con el método de extracción (hidrodestilación, arrastre con vapor, fluidos supercríticos, hidrodestilación asistida con microondas, entre otros), al clima, a la composición del suelo, al órgano de la planta, a la edad y la etapa del ciclo vegetativo (Stashenko *et al.*, 2004). Se ha encontrado que algunas de las enzimas responsables de formación de los componentes de los aceites esenciales como la γ -Terpineno sintetasa requieren Mg^{2+} como cofactor para su actividad catalítica (Ramírez *et al.*, 2009).

Debido a esto, es necesario conocer y conservar cada una de las características que agregan valor a los aceites esenciales, no sólo los derivados del método de extracción, también es importante que cada especie conserve los niveles adecuados de fertilización y manejo agronómico que permitan que la composición y concentración de cada uno de los componentes de los aceites no se pierdan (Ospina *et al.*, 2015).

Además de que la calidad del aceite se ve afectada también por las condiciones de almacenamiento ya que, para garantizar la calidad de los aceites se deben de conservar en frascos de vidrio oscuros y cerrados herméticamente para evitar reacción de oxidación (Bazán, 2006).

4.1.2 Microencapsulado

Durante el secado por aspersion se obtuvo un polvo fino de color blanco, con olor característico al aceite esencial de *T. vulgaris* y un rendimiento de 382.83 ± 32.12 mg timol/100 g de polvo. El cuadro 5 muestra los compuestos químicos que contiene las microcápsulas de aceite esencial de *T. vulgaris*.

Cuadro 5. Componentes de aceite esencial de *Thymus vulgaris* microencapsulados detectados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (González y Luján, 2019).

Componente	Abundancia (%)	Tiempo retención (min)	Área
α -pineno	1.67	6.45	48291
Canfeno	0.70	7.01	20278
β -Pineno	0.87	8.15	24933
Terpineno-4-acetato	1.31	8.5	37935
Eucaliptol	1.40	8.92	40511
α -Terpineno	12.5	9.40	363471
o-cimol	19.8	9.79	574340
β -Linalool	4.60	13.2	133163
Alcanfor	0,81	13.4	23693
Oxaciclobutano-2-ona	4.14	17.2	120044
Timol	44.0	20.3	1274492
1,2 corona-4 éter	0.27	16.5	47152
1,5- corona-5 éter	0.31	17.0	54100
Dimetilamina	0.34	8.78	9892
2,3,4, trimetoxibutil benzeno	0.52	20.6	15097
Cariofileno	2.40	14.3	69582
Metiltimol éter	2.63	14.1	76117
Ciclobutanol	0.25	8.30	7365
1,2 Propanodiamina	0.18	8.66	5130

La abundancia relativa del timol en las muestras microencapsuladas incrementó al 44% lo anterior puede atribuirse a la pérdida por volatilidad de algunos compuestos constituyentes del aceite esencial durante el encapsulamiento generando una mayor abundancia relativa de timol.

El secado por aspersión es una técnica que ha sido empleada para el encapsulamiento de microorganismos y compuestos sensibles a las altas temperaturas. Los resultados muestran que el método de encapsulamiento permite retener los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *T. vulgaris*, por lo que se espera que tenga la misma actividad biológica y persistan las propiedades antimicrobianas ya reportadas por otros autores, pero con la ventaja de que se vehiculicen y protejan los aceites esenciales, además de incrementar los niveles de inclusión y disminuir los efectos nocivos (Betancourt, 2012) facilitando su incorporación a diversas matrices sólidas o acuosas.

4.1.3 Curva de calibración de Timol

Como se observa en la Figura 12, la curva de calibración presenta un valor de r^2 de 0.9999 para concentraciones de 50ppm hasta 300 ppm (Gonzalez y Luján, 2019).

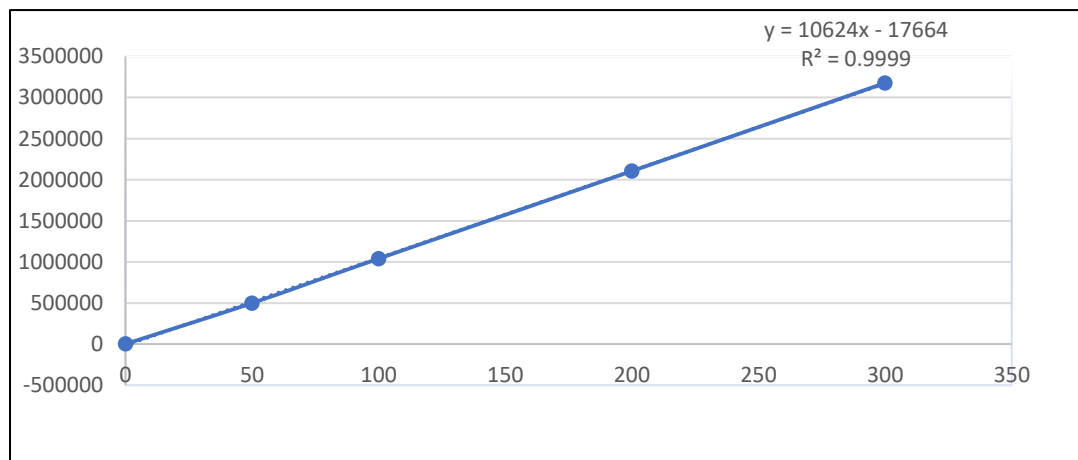


Figura 12. Curva de calibración de timol

4.1.4 Identificación de timol

Se determinó que el estándar de timol se encuentra bien definido con el tiempo de retención de 20.28 minutos, como se observa en la figura 13.

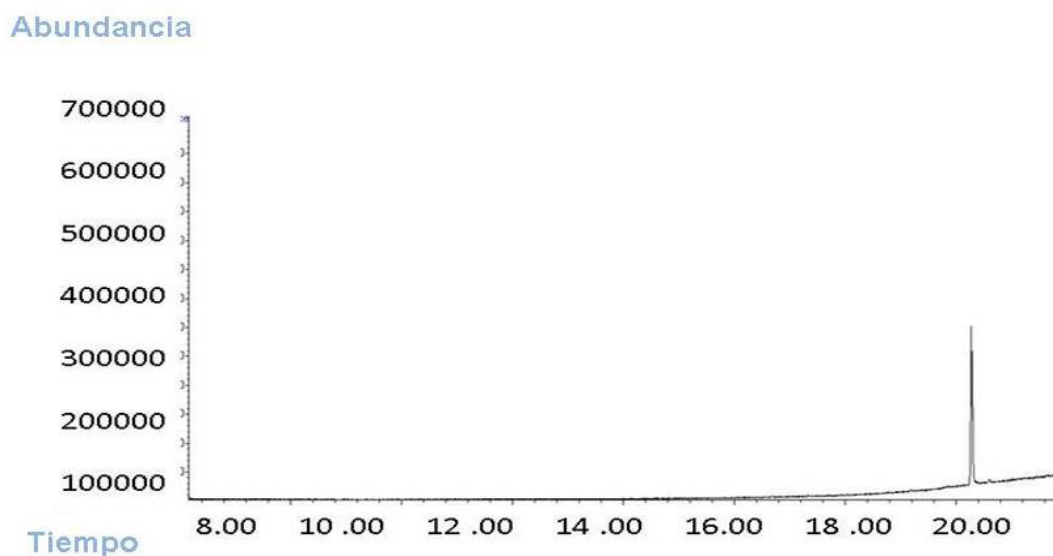


Figura 13. Cromatograma de estándar de timol (González y Luján, 2019).

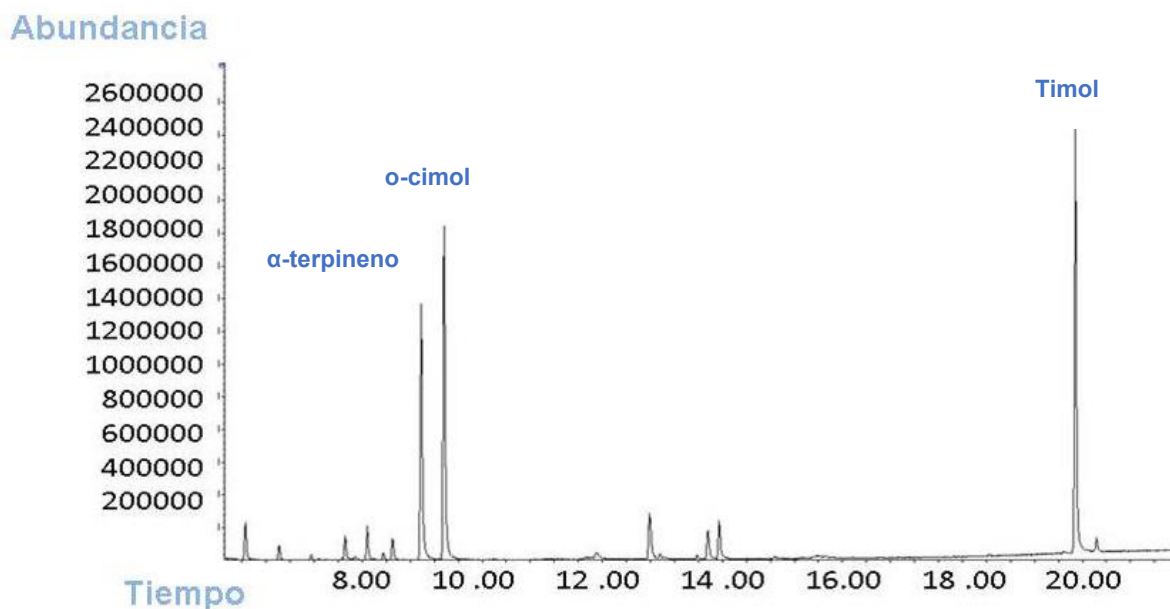


Figura 14. Cromatograma de aceite esencial de *Thymus vulgaris*

En la figura 14 se muestra la separación de tres componentes orgánicos timol, seguido de O-cimiol y α -terpineno en menos de 20 minutos donde el timol por ser el compuesto de mayor peso molecular presenta un mayor tiempo de retención 20.283 minutos, comparado con el α -terpineno 9.382 minutos y o-cimiol 9.761 minutos.

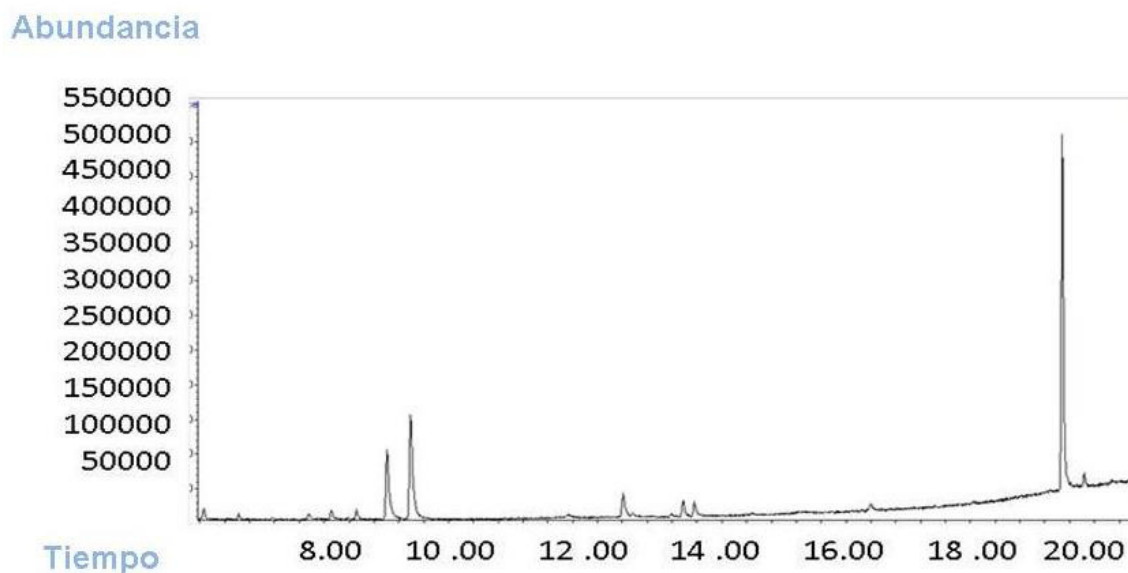


Figura 15. Cromatograma de aceite esencial de *Thymus vulgaris* microencapsulado.

El cromatograma del aceite esencial microencapsulado presentó tres componentes diferentes de los cuales uno corresponde a timol dado su similitud con el estándar respectivo. La figura 15 muestra que el timol por ser el compuesto con mayor peso molecular presenta un mayor tiempo de retención 20.287 minutos.

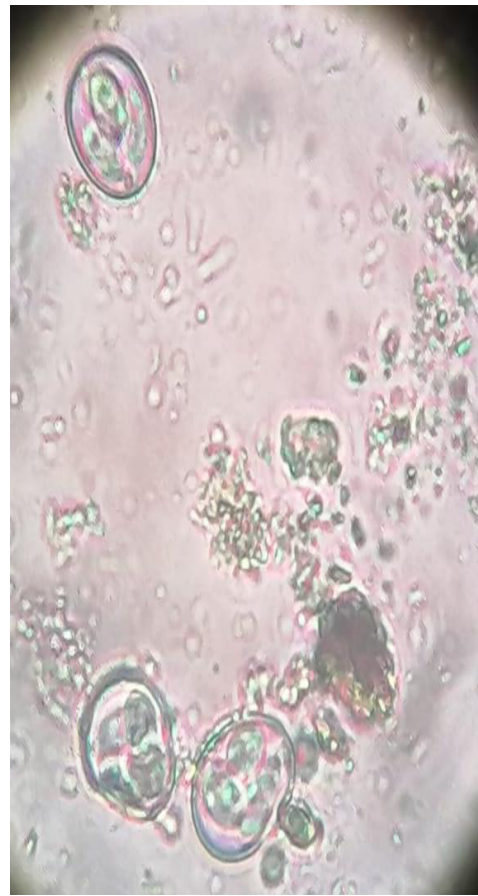
4.5 Prueba *In vitro* para determinación del efecto de timol en oocistos

Para establecer la dosis coccidicida efectiva *in vitro* del aceite esencial de *T. vulgaris* se realizó un filtrado de 30 µL de cultivo homogenizándolo con vortex para cuantificar el número de ooquistes esporulados presentes. Una vez estandarizada la cantidad se procedió a evaluar el efecto del aceite esencial obtenido por destilación por arrastre de vapor, se añadieron 30 µL de aceite esencial de *T. vulgaris* equivalente a 3.77mg de timol al preparado de oocistos esporulados evaluando por observación microscópica (Primo Star, Zeiss) a las 2, 4, 8 y 24 horas, para determinar si hubo daño o no en los oocistos. Del mismo modo para realizar la prueba *in vitro* del aceite esencial de *T. vulgaris* microencapsulado se pesó la cantidad de polvo necesario para obtener 3.84mg de timol y se mezcló con 1mL de agua destilada para romper las cápsulas y liberar el aceite esencial , después se añadió 1mL de cultivo de eimerias esporuladas homogenizando en vortex para recolectar 60 µL equivalente a 30 µL de oocistos y 30 µL de aceite esencial de *T. vulgaris* microencapsulado, en un periodo de tiempo de 2, 4, 8 y 24 horas; se evaluó mediante la observación enfocando con el objetivo 40x los daños que se generaban a partir de colocar el aceite esencial de *T. vulgaris* y microencapsulado, en los oocistos.

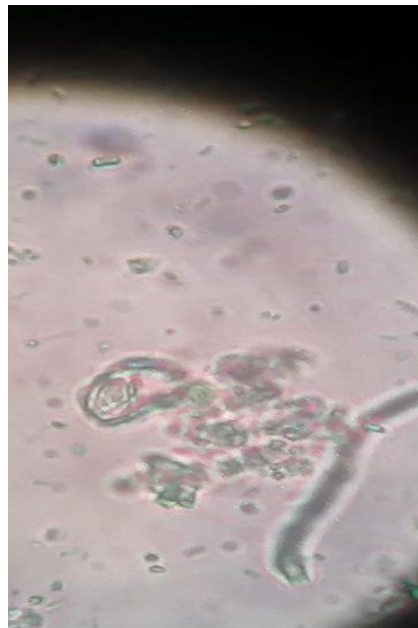
En la Figura 16 se observan los daños ocasionados *in vitro* por el aceite esencial de *T. vulgaris*.



a)



b)



c)

Figura 16. Prueba *in vitro* aceite esencial de *T. vulgaris*. a) Oocisto esporulado intacto, b) Oocistos esporulados con pared deformada a los 40 minutos, c) Oocistos esporulados con pared rota a las 24 horas.

Se identificaron tres especies de *eimeria spp.* por micrometría. En el cuadro 6, se presentan las especies identificadas, el tamaño de ooquistes, localización y lesiones que provocan en el intestino de las aves.

Cuadro 6. Especies de *Eimeria spp.*, encontradas en aves de corral (González y Reyes, 2019).

<i>Eimeria spp.</i>	Tamaño de ooquiste µm	Localización	Lesiones
<i>E. máxima</i>	27.5x27.5	Intestino delgado medio	Enteritis mucoide, mucosa engrosada con petequias
<i>E. tenella</i>	23x19	Ciegos	Tiflitis hemorrágica, engrosamiento y hemorragias
<i>E. brunetti</i>	25x22	Intestino delgado inferior	Enteritis mucoide necrótica, inflamación, petequias, áreas necróticas

Las especies de *eimerias spp.* Identificadas en el presente trabajo causan lesiones en diferentes partes del intestino, *E. máxima* causa lesiones en duodeno y yeyuno, es la más común en el campo afectando de manera severa al índice de conversión y a la ganancia media diaria, *E. tenella* causa lesiones en ciegos, además de anemia y elevada mortalidad y por último *E. brunetti* afecta la parte inferior del intestino delgado, recto y parte proximal del ciego.

El estudio *in vitro* demostró la actividad oocisticida de timol, durante el recuento microscópico de los oocistos tratados con timol, se observó la presencia de oocistos dañados deformación, lisis de la pared quística y lisis de esporozoitos provocando disminución del número de oocistos en el transcurso de 40 min mediante observación, hasta transcurridas 48 h, en las cuales se mantuvo el efecto oocisticida

pero no hubo incremento de oocistos dañados. Este efecto de lisis también fue observado por Guineas y Remmal *et al.*, (2013). Quienes encontraron daños causados por timol; de manera similar Arafa *et al.*, (2020) mencionan la eficacia del timol contra la coccidiosis en palomas (*Columba livia domestica*) encontrando en el estudio *in vitro* actividad oocistocida utilizando timol; durante el conteo microscópico de los oocistos tratados por timol, se observó la presencia de oocistos dañados y deformados con pared agrietada. En particular, el recuento de oocistos tratados disminuyó significativamente en el grupo de control, especialmente a 10% (0.625 mg/100mL) de concentración de timol. Este último puede deberse a la lisis de oocistos tratados por las concentraciones más altas de timol.

Se obtuvieron mejores resultados con el aceite encapsulado, la dosis que se utilizó fue de 3.84mg timol por cada 30 μ L microlitros de cultivo esto se atribuye a que el método de encapsulamiento permite retener los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *T. vulgaris*, por lo que se incrementan los niveles de inclusión del producto activo en los oocistos. El efecto oocistocida se debe a que los productos botánicos interfieren directamente con el metabolismo de los parásitos o indirectamente mejorando la respuesta inmune del huésped y los sistemas de defensa antioxidantes para el control efectivo y la erradicación de la invasión parasitaria (Idris *et al.*, 2017).

Los fitocompuestos de las plantas pueden inhibir la multiplicación de *Eimeria spp.*, crecimiento de bacterias beneficiosas y aumentar la inmunidad, lo que lleva controlar la infección por *Eimeria spp.* en el intestino de las aves (Muthamilselvan,2016) .Esto se debe a que timol elimina los radicales libres hidroxilo formando las principales especies transitorias denominadas radicales fenóxilo provocando deshidratación. Entonces, aumenta las actividades de los niveles de antioxidantes endógenos junto con antioxidantes no enzimáticos (Nagoor Meeran & Stanely Mainzen Prince, 2012).

En bacterias el timol por su hidrofobicidad permite la separación de los lípidos de la membrana celular y de la mitocondria; desordenando la estructura y haciéndola más permeable, provocando la salida del material intracelular y por consiguiente provocando la muerte de los microorganismos según García (2008).

Otra característica del uso de timol es el efecto protector sobre el hígado (Palabiyik *et al.*, 2016) y un efecto protector renal (Arafa *et al.*, 2020). Por lo que se puede considerar como un coccidiostato botánico seguro (Sumano, 2010) para administración en aves como alternativa occisticida.

La dosis de aceite esencial de *T. vulgaris* tiene un efecto occisticida a partir de los 40 min basado en la reducción de oocistos infectantes y una acción occisticida en 24 hrs. En la figura 17, se puede observar el curso del tiempo de los oocistos dañados con aceite esencial de *T. vulgaris* y en la figura 18 el curso del tiempo de oocistos dañados con aceite esencial de *T. vulgaris* microencapsulado con maltodextrina,



Figura 17. Curso del tiempo de oocistos dañados con aceite esencial de *T. vulgaris*

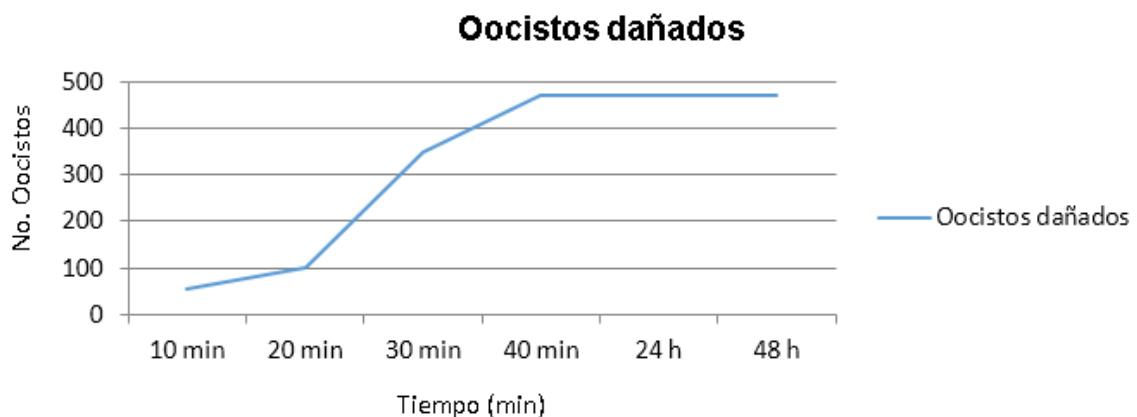


Figura 18. Curso del tiempo de oocistos dañados con aceite esencial de *T. vulgaris* microencapsulado con maltodextrina.

Remmal (2013) utilizó el estándar de timol para probar el efecto oocisticida concluyendo que cuatro horas de contacto fueron suficientes para destruir la mayoría de los oocistos utilizando una concentración de 4mg/mL *in vitro*.

Se realizó un análisis factorial de correspondencia simples basado en Chi Cuadrado en donde no se encontró una relación significativa con el T1 (aceite esencial de *T. vulgaris*) y T2 (aceite esencial de *T. vulgaris* encapsulado) en los oocistos dañados; y una relación de los oocistos no dañados con el T3 testigo (dicromato de potasio).

En el análisis de contingencias se observaron 435 oocistos dañados con aceite esencial de *T. vulgaris* y un total de 470 oocistos dañados con aceite encapsulado con maltodextrina sin embargo no existe una diferencia significativa entre el aceite esencial de *T. vulgaris* y microencapsulado, por lo que el uso de aceite esencial de *T. vulgaris* microencapsulado aparte de generar un efecto oocisticida puede generar beneficios positivos en la microbiota de los animales debido a que la maltodextrina podría actuar como prebiótico, además de obtener un producto en polvo que permite una mejor manipulación e incorporación a diferentes matrices alimentarias.

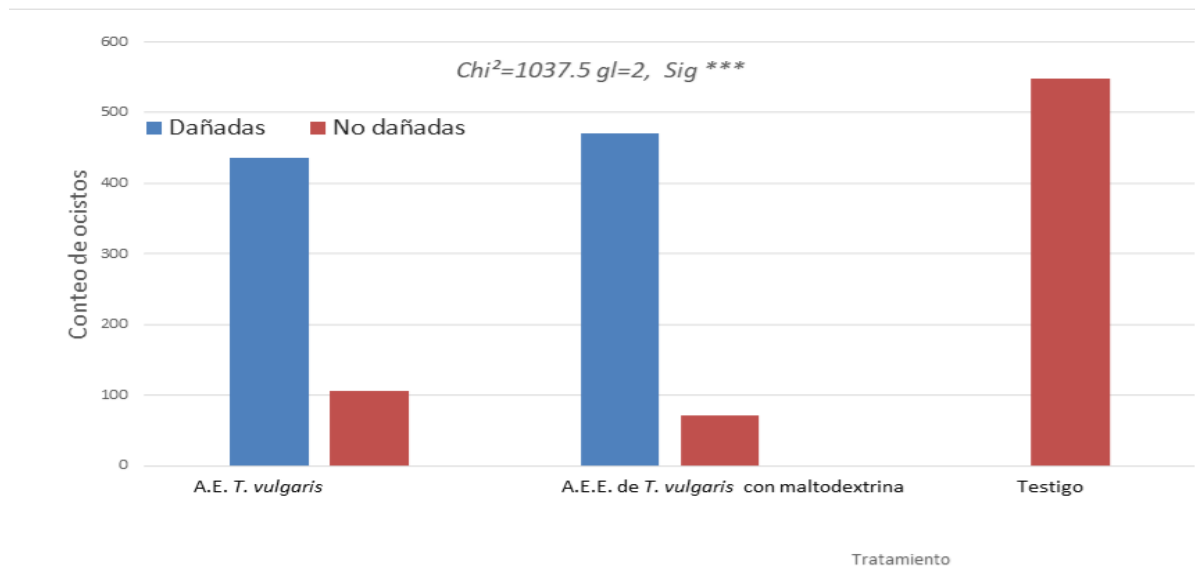


Figura 19. Análisis de contingencias de oocistos dañados

*A.E.T: Aceite esencial de *Thumys*.

* A.E.E: Aceite esencial encapsulado.

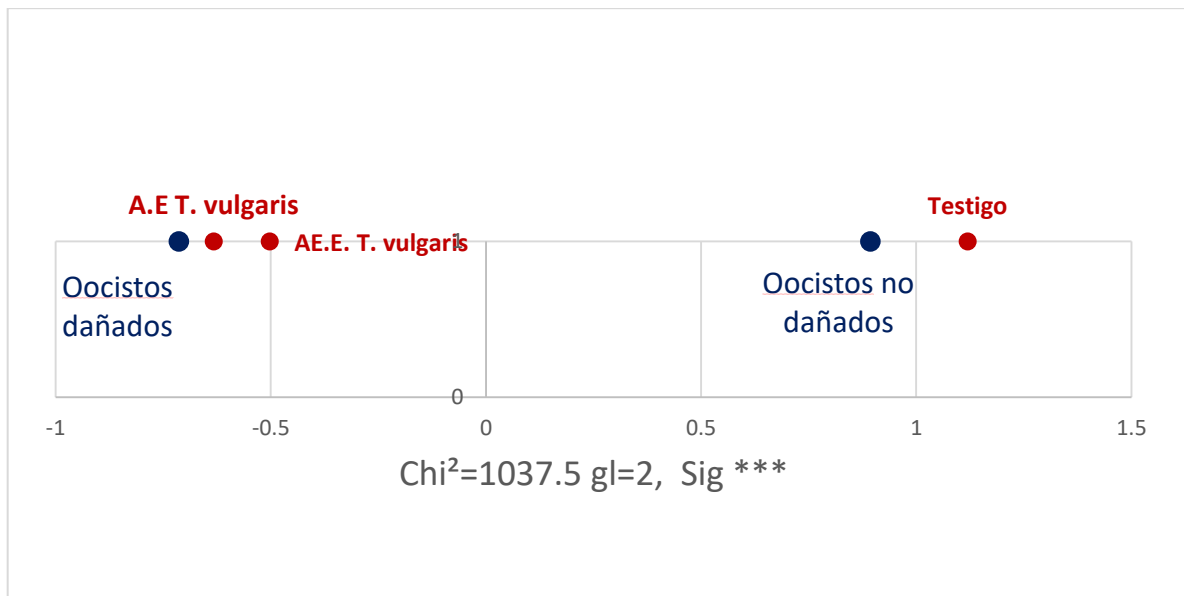


Figura 20. Análisis factorial de correspondencias simples basado en Chi².

Con base a los experimentos realizados con aceites esenciales, se recomienda que en la medida que se vehiculicen los aceites esenciales, para una mayor solubilidad y se protejan micro encapsulados, los niveles de inclusión efectivos serán inferiores y menos nocivos.

5. CONCLUSIONES

Se observó que el componente mayoritario del aceite esencial de *Thymus vulgaris* fue el timol con 31% de abundancia relativa en la muestra, mientras que en la muestra encapsulada el contenido de timol fue de 44%. El método de secado por aspersión empleando maltodextrina 10DE y goma arábica es adecuado para el encapsulamiento del aceite esencial de *Thymus vulgaris*, ya que sus compuestos mayoritarios, principalmente timol se retiene en la matriz sólida de la microcápsula, obteniéndose un producto en polvo que permite una mejor manipulación e incorporación a diferentes matrices alimentarias.

La dosis coccidicida efectiva *in vitro* del aceite esencial de *T. vulgaris* establecida en el presente trabajo fue de 3.7mg de aceite esencial de *T. vulgaris* equivalente a 30 μ L de aceite esencial y 3.84mg de aceite esencial de *T. vulgaris* microencapsulado equivalente a 1g de polvo, por cada 30 μ L de cultivo, el aceite de timol, genera datos importantes en los oocistos a partir de los 40 minutos.

6. LITERATURA CITADA

- Acosta R., 2009. El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba, Cultivos tropicales. Cuba. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas 3(2) 113-120.
- Alesón, A., Meuter A., Paulus C. 2011. Eubióticos su influencia en la sanidad intestinal de las aves. DSM Nutritional Products: Selecciones avícolas 5(1):36-38.
- Meteur A., Alesón, R. 2009. Aceites esenciales y ácidos orgánicos: Beneficios productivos y sanitario de las aves. DSM Nutricional Products: Selecciones avícolas 2(6):38-42.
- Álvarez, C., Rodríguez, S., Carvajal, E. (2011). *Efecto del extracto de paico (Chenopodium ambrosioides), en parásitos gastrointestinales de gallos de pelea (Gallus domesticus)*. Tunja-Boyacá, Colombia. Fundación Universitaria de Juan de Castellanos. Pp. 76-80.
- Arafa, W. M., Abolhadid, S. M., Moawad, A., Abdelaty, A. S., Moawad, U. K., Shokier, K. A. M., Shehata, O., Gadelhaq, S. 2020. Thymol efficacy against coccidiosis in pigeon (*Columba livia domestica*). Egipto. Preventive Veterinary (104914):176
- Bazan Rodriguez P., Gutiérrez Pérez M.M. 2006. *El tomillo una alternativa terapéutica dental en la halitosis*. UNAM. México. D.F. Pp 68-87.
- Barros Fernandes R.V., Borges S.V, Botrel, D.A.2014. Materials on the microencapsulation of rosemary essential oil, Carbohydrate polymers. Brasil. Pp.524-532.
- Betancourt L, L., Ariza N, C., Díaz G, G., & Afanador T, G. 2012. Efecto de diferentes niveles de aceites esenciales de *Lippia origanoides kunth* en pollos de engorde. Colombia. Pp.3033-3040.
- Boch J. 1985. Parasitología en medicina veterinaria 2^a ed. Editorial hemisferio sur. Buenos Aires Argentina. Pp. 467.
- Botía Carreño W.H., Hortúa Lopez L.C.2013. Extracto de ajo como alternativa a los promotores de crecimiento en pollos de engorde. Conexión Agropecuaria JDC. Paipa, Boyacá, Colombia..Pp.36-43.
- Bowman, D. D., & Georgi, J. R. 2014. *Georgis' parasitology for veterinarians* (10. ed). Saunders/Elsevier. Cornell University, NY. Pp.496.
- Camacho Kurmen, J. E., Gómez, M. I., & Villamizar, L. F. 2010. Selección de un sistema de atomización para la formación de micropartículas de Eudragit® S100 en lecho fluido. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Nova. España. Pp. 87.

- Cano Morales.2001. Obtención y caracterización del aceite esencial de tomillo (*thymus vulgaris*) cultivado en Guatemala, utilizado en diversidad de productos fitofarmacéutico. Universidad de San Carlos.Guatemala. Pp.49
- Chiriboga Chuchuca, C., Sánchez Quinche, A. R., Vargas González, O. N., Hurtado Flores, L. S., & Quevedo Guerrero, J. N. 2016. Uso de Infusión de oreganón *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng y del vinagre en la crianza de pollos "Acriollados" (*Gallus gallus domesticus*) mejorados. Acta Agronómica. Universidad técnica de Machala. Ecuador.Pp.298-303.
- Del Cacho, E., 2013. Coccidiosis: La enfermedad, consecuencias y tratamiento. Facultad de Veterinaria, Departamento de Patología Animal. Zaragoza, España. Pp. 7.
- Dima, C., Cotârlet, M., Alexe, P., & Dima, S. 2014. Microencapsulation of essential oil of pimento [*Pimenta dioica* (L) Merr.] by chitosan/k-carrageenan complex coacervation method. Innovative Food Science & Emerging Technologies. Universitatea "Dunărea de Jos" din Galați Rumania.Pp.22, 203-211.
- Dziezak JD. 1988. Microencapsulation and encapsulation ingredients.J. Food Technology.Pp. 136-151.
- Escobar A. ;Molina C.;Zapata G. Yañez M. P 2014. Comparcion de la actividad acaricida de los aceites esenciales de *Ocinum basilicum*, *Coriandrum sativum* y *Thymus vulgaris* contra *Tetrannychnus urticae*. Universidad Internacional del Ecuador.Quito, Ecuador. Pp. 21-33.
- Falcone, P., Speranza B., Del Nobile, M. A., Corbo, M. R. y Sinigaglia M. 2005. A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. Journal of food protection.Universidad de Foggia. Italia.Pp.1664-1670.
- FAO-OMS. 2005. La necesidad de fortalecer los programas nacionales de monitoreo del uso de antimicrobianos en medicina veterinaria en la Región. Inocuidad de los Alimentos para las America y el Caribe. San Jose, Costa Rica. Pp. 9.
- Favaro, C.; Santana, A.; Monterrey, E; Trinidad: M.; Netto, F.2010. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. Food Hydrocolloids. Universidad de São Paulo. Brasil. Pp. 336-340.
- Ferre Ignacio, Gómez. B. 2019. Etiologia y patogenia de la coccidiosis aviar. SALUVET.Brasil.Pp. 22-35.
- García-García, R. M., & Palou-García, E. 2008. Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. Universidad de las Américas. San Andrés Cholula, Puebla. Pp.41-51.
- Giannenas I. Florou P., Papapzahariadou M., Christaki E., B. N. 2003. Efecto de suplementos dietéticos con aceite de orégano esenciales de función de los

pollos después de la infección experimental con *E. tenella*. Universidad Aritoteles de Tesalónica. Grecia. Pp.99–107.

Haug Anita, Gerde. A.Thebo P.Mattson J.2008. Infecciones coccidiales en pollos de engorde comerciales: aspectos epidemiológicos y comparación de la identificación de especies de *Eimeria* mediante técnicas morfométricas y de reacción en cadena de la polimerasa. Universidad de Upssala. Estocolmo, Suecia. Pp. 161-170.

Idris, M., Abbas, R. Z., Masood, S., Rehman, T., Farooq, U., Babar, W., Hussain, R., Raza, A., & Riaz, U. 2017. The potential of antioxidant rich essential oils against avian coccidiosis. *World's Poultry Science Journal*. Universidad de Cambrige. Cambrige. Pp.89-104.

Kadykalo, S., Roberts, T., Thompson, M., Wilson J., Lange M., Espeisse O. 2018. El valor de los anticoccidiales para la producción avícola la sostenible mundial. *Avinews* 17 (1) 108-114.

Krishnan, S.; Kshirsagar, A.C, Singhal, R. S. 2005. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent *Carbohydr Polym*. Universidad de Mumbai. India. Pp. 309-315.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J. y Nychas, G.J.E. 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*. Universidad Agrícola de Skandamis de Atenas. Atenas, Grecia. Pp.453-462.

Lopretti M., Barriero F., Fernandes I., Damboriarena A., Ottati C., Olivera A.2007. Microencapsulación de compuestos de actividad biológica, INNOTEC. Laboratorio Tecnológico de Uruguay. Uruguay. Pp.19-23.

Luján-Hidalgo, M. C. Gutierrez Micelli F.A., Ventura Canseco L.M.C., Dendooven L., Mendoz Lopez M.R., Cruz Sanchez S., Garcia Barradas O., Archila AbuD M. 2010. Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de hojas de *Bursera graveolens* y *Taxodium mucronatum* de Chiapas, México. Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Pp.1-8.

Muthamilselvan, T., Kuo, T.-F., Wu, Y.-C., & Yang, W.-C. (2016). Herbal Remedies for Coccidiosis Control: A Review of Plants, Compounds, and Anticoccidial Actions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Universidad Nacional de Taiwán. Taiwán. Pp.1-19.

Nagoor Meeran, M. F., & Stanely Mainzen Prince, P. 2012. Protective effects of thymol on altered plasma lipid peroxidation and nonenzymic antioxidants in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. Universidad Annamalai. India. Pp.368-373.

- Organization, W. H. 2010. Who monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States. En W. H. Organization. Francia.Pp. 8-452
- Ospina Delgado. J., M. F. 2015. Influencia de la fertilización en la producción y composición del aceite esencial de *Lippia origanoides* HBK (Oregano Criollo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Pp. 335-347.
- Paredes Acosta, Olga Maribel (2015). Evaluación del efecto de un desparasitante natural a base de tomillo *Thymus vulgaris* en aves de traspatio en el cantón Salcedo parroquia Antonio José Holguín. Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UTC. Latacunga.P.71.
- Palabiyik, S., Karakus, E., Halici, Z., Cadirci, E., Bayir, Y., Ayaz, G., & Cinar, I. 2016. The protective effects of carvacrol and thymol against paracetamol induced toxicity on human hepatocellular carcinoma cell lines (HepG2). Departamento de toxicología farmacéutica .Universidad Atatürk. Erzurum, Turquía.Pp.1252-1263.
- Peña, M. M. 2003. Evaluacion de tres niveles de pigmento de flor de Cempasuchil (*Tagetes erecta*) sobre la pigmentacion de la piel en pollos de engorde. (I. y. Centro de Enseñanza, Ed.) Mexico, D.F.Pp.2-8.
- Pournazari M., MSc; Ali AA Qotbi , PhD; Alireza Seidavi , PhD; Mirco Corazzin , PhD. 2016. Prebióticos, probióticos y tomillo (*Thymus vulgaris*) para pollos de engorde:rendimiento, características de la canal y variables sanguíneas. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*.Pp.3-10.
- Quiroz R. H. 1984. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Nematelmintos. México DF. Editorial LIMUSA
- Ramírez LS, I. J. (2009). Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia origanoides* de diferentes orígenes de Colombia. . *Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences, at the Universidad del Zulia.Colombia*.P.313.
- Rendón Galindo: Báez González, J. G.; Alanís Guzmán, M. G.; Regalado Méndez, A.; Vernon Carter, E. J.2010. Estabilidad oxidativa de aceite de linaza microencapsulado con multicapas de biopolímeros. Universidad Autónoma de Nuevo León. México Pp. 2207-2212.
- Remmal A., Sanaa Achahbar, Latifa Bouddine, Fouzia Chami and Najat Chami.2013., "Oocysticidal Effect of Essential Oil Components against Chicken *Eimeria* Oocysts. Facultad de Ciencias Dhar El Meherz. Marruecos.Pp.2-8.
- Rodriguez Alvarez M., Alcaraz Meléndez M., Real Corsio S.M.2012. Procedimientos para la extracción de aceites esenciales de plantas aromáticas.Instituto Politecnico Nacional .La Paz, B.C.S. México.Pp.7-47.

- Rodríguez V.R., Domínguez, A.J., Cob G.L. (1994). Técnicas Diagnósticas de Parasitología Veterinaria. Editorial: Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. ISBN: 968-6843-60-4.
- Ruiz H., Ruiz B., Mendoza N.P. 2014. Caracterización del sistema de producción de aves de traspatio del municipio de Pantepec, Chiapas. Rev. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal. Vol 4. Pp. 41-43.
- Sánchez Pineda, H., Reyes, M. y Peralta, M. 2014. Manual de Parasitología en Pequeños Rumiantes Centro Comercializador de Impresos del Sur. P. 70.
- Sántiz Gómez, José Adrián. 2017. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en aves, en el municipio de Altamirano, Chiapas. Universidad Autónoma de Chiapas. P.45.
- Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2018. *Producción y rendimiento de cultivos orgánicos*. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Pp.2-5.
- Shiva Carlos, S. B. 2012. Evaluación del aceite esencial de orgenao (*origanum vulgare*) y extracto deshidratado de jengibre (*Zingiber officinale*) como potenciales promotores de crecimiento en pollos de engorde. Perú. Pp.160-170.
- Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta 2019.(SIACON), 1980-2018, <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430>. Consultado el 8 de diciembre de 2020.
- SEDESOL. (2010). *Tuxtla Gutiérrez datos generales*. Secretaría de Desarrollo Social. <http://www.microrregiones.gob.mx/zap/datGenerales.aspx?entra=nacion&ent=07&mun=101>. Consultado el 8 de diciembre del 2020.
- Soliman E.A., El-Moghazy A.Y., El-Din M.M., Massoud M.A. 2013. Microencapsulation of essential oils within alginate: Formulation and in vitro evaluation of antifungal activity, *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*. Pp.48-55 .
- Stashenko EE, J. B. (2004). Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* .Universidad Industrial de Santander. Colombia. Pp. 93-103.
- Sumano Ocampo, Héctor, & Gutiérrez Olver, Lilia. 2010. *Farmacología Clínica en Aves Comerciales* 4 ed. Mc Graw Gill. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp.10-712.
- Taylor, M. 2007. *Veterinary Parasitology*. Oxford, UK.: Blackwell Publishing. Recuperado de:

https://www.academia.edu/11434537/veterinary_parasitology_by_M.A.Taylor_R.L._Cooop_R.L._Wall.

Toalombo P.2017. Polifenoles del Tomillo (*Thymus vulgaris*) y jengibre (*Zingiber officinales*) en la alimentacion de gallinas de campo. Facultad de Ciencias Pecuarias. Chimborazo, Ecuador. Pp.88-93.

Torres C, Z. M. (2002). Antibioticos como promotores del crecimiento en animales . Grac Sani.t,Pp. 109-112.

Turek C. y Stintzing F.C.2012. Impact of different storage conditions on the quality of selected essential oils, Food Research International, Pp. 341-353.

Unión Nacional de Avicultores. 2016. Indicadores Económicos. <https://una.org.mx/indicadores-economicos/>. Consultada el 14 de diciembre del 2020.

Urquhart, G. M. (2001). *Parasitología veterinaria*. Ed. Acribia.

Yeo Y., Baek N., Park K.,2001. Microencapsulation methods for delivery of protein drugs, Biotechnology and Bioprocess Engineering.Pp.213-230.

Xiaorui Zhang. 1999. Centro Colaborador de Medicina Tradicional de la OMS, Vol. 2. Conferencia Internacional sobre Autoridades Reguladoras de Medicamentos (ICDRA).

Zaragoza L., B. Martínez, A. Méndez, V. Rodríguez, J. S. Hernández, G. Rodríguez y R. Perezgrovas. 2011. Avicultura familiar en comunidades indígenas de Chiapas, México. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal, vol.1 (2011):411-415.

7. ANEXOS

Cuadro A1. Contenido de timol en muestras de polvo microencapsulado con malto dextrina y goma arábica

MUESTRAS DE POLVO		100 MG + 2 ML AGUA + 3 ML HEXANO				
MD-GA						
	ÁREA	PPM	mg timol/mg polvo	mg timol / gr polvo	mg timol /100 gr polvo	
POLVO 1	1451664	138.3027108	0.004149081	4.149	414.91	32.128854
POLVO 2	1224107	116.8835655	0.003506507	3.507	350.65	
POLVO 3	1338459	127.6471197	0.003829414	3.829	382.94	
				3.828		

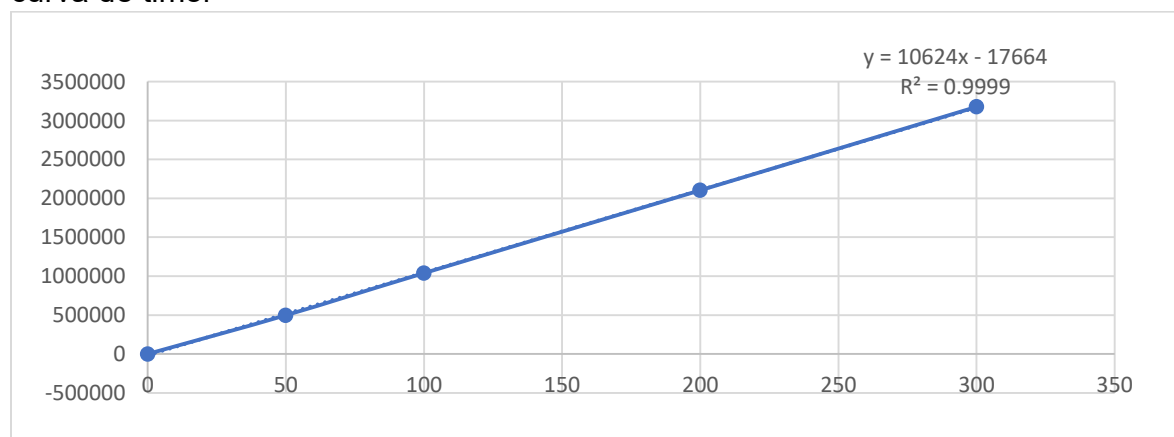
Cuadro A2. Contenido de timol en muestras de aceite esencial de *T. vulgaris*

MUESTRAS DE ACEITE 50/1000					
AREA	PPM	Dil 50/1000	mg timol / mL aceite		
68645849	6463.05657	129261.1314	129.2611314	125.8480321	8.29037658
70040723	6594.351186	131887.0237	131.8870237		
61811860	5819.797063	116395.9413	116.3959413		

Cuadro A3. Curva de timol

Ppm	AREA
0	0
50	497987
100	1039178
200	2103892
300	3175923

Figura A1. Gráfica de curva de timol



Cuadro A4. Oocistos dañados y no dañados

	A.E. THYMUS VULGARIS	A.E. E. CON MALTODEXTRINA	TESTIGO
Dañadas	435	470	0
No dañadas	105	70	547

Cuadro A5. Prueba de CH2

Row Coordinates and Contributions to Inertia (BASE DE DATOS) Input Table (Rows x Columns): 2 x 3 Standardization: Row and column profil								
		Row - Numb	Coordin. - Di	Mass	Quality	Relative - Inertia	Inertia - Dim.1	Cosine ² - Dim.1
efecto	Dañadas	1	-0.713256	0.556238	1	0.443762	0.443762	1
	No dañadas	2	0.89404	0.443762	1	0.556238	0.556238	1
Tratmiento	A.E. THYMUS VULGARIS	1	-0.501819	0.331899	1	0.131068	0.131068	1
	A.E. E. CON MALTODEX	2	-0.632276	0.331899	1	0.208074	0.208074	1
	TESTIGO	3	1.119581	0.336202	1	0.660858	0.660858	1
Eigenvalues and Inertia for all Dimensions (BASE DE DATOS) Input Table (Rows x Columns): 2 x 3 Total Inertia=.63768 Chi ² =1037.5 df=2 p=0.0								
		Singular - Va	Eigen - - Valu	Perc. of - Ine	Cumulatv - P	Chi - Squares		
	1	0.798549	0.63768	100	100	1037.505		Chi ² =1037.5 gl=2, Sig ***



Figura A2. Oocistos dañados con aceite esencial de *T. vulgaris* microencapsulado



Figura A3. Prueba in vitro de oocistos



Figura A4. Lisis de oocistos de Eimeria spp.



Figura A5. Oocistos esporulado (fase infectante)

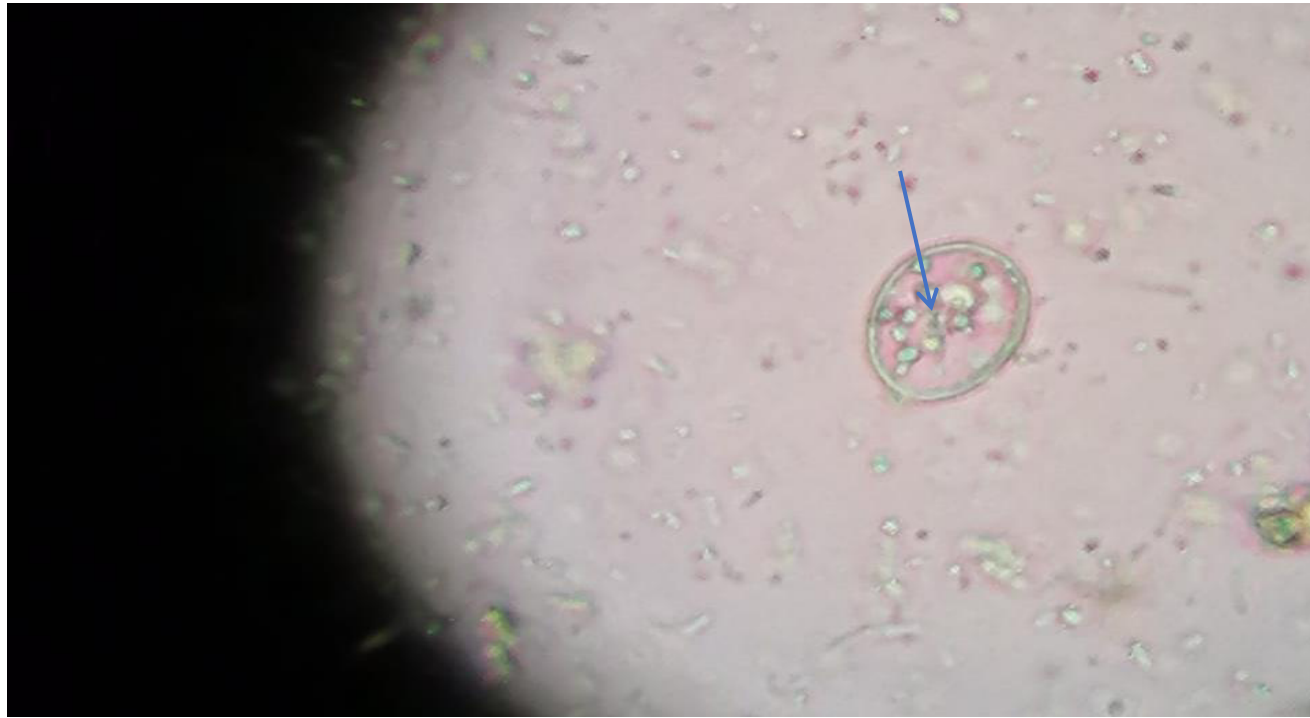


Figura A6. Lisis de esporozoitos