

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

**ESCUELA DE POST GRADO**



**PROGRAMA DE MAESTRÍA**

**MENCIÓN: RECURSOS NATURALES**

**LÍNEA BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS**

Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare L.*  
“orégano” sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, in vitro. Cajamarca - 2015

Para obtener el Grado Académico de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presentado por:

Maestriza: Br. CC.BB. Héctor Emilio Garay Montañez

Asesor: Dr. Q.F Iván André Torres Marquina

Cajamarca-Perú

2015

COPYRIGHT © 2015 by  
HÉCTOR EMILIO GARAY MONTAÑEZ  
Todos los derechos reservados

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

## ESCUELA DE POST GRADO



### PROGRAMA DE MAESTRÍA

### MENCIÓN RECURSOS NATURALES

### LÍNEA DE BIOTECNOLOGÍA

### TESIS

Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare L.*  
“orégano” sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, in vitro. Cajamarca - 2015

Maestrísta: Br. CC.BB. Héctor Emilio Garay Montañez

### Comité Científico:

---

Dr. Q.F. Iván André Torres Marquina  
Asesor

---

M.Cs. Carmen Medina Rodríguez  
Miembro del Comité Científico

---

M.Cs. Guido de la Quintana Giraldo  
Miembro del Comité Científico

---

M.Cs. Tito Urquiaga Melquiades  
Miembro del Comité Científico

Cajamarca - Perú

2015

**A:**

**La Memoria de mis Padres: Julio y Cecilia.  
A mi esposa, Clara e hijos: Carlos, Katherine y Karina**

## **AGRADECIMIENTO:**

Un especial y fraternal agradecimiento, al Dr. Q.F. Iván André, Torres Marquina, que como Asesor de la presente Tesis, ha orientado mi labor científica, con un interés y una dedicación que ha sobrepasado todas mis expectativas

El investigador sufre las decepciones, los largos meses pasados en una dirección equivocada, los fracasos. Pero los fracasos son también útiles porque, bien analizados, pueden conducir al éxito. Y para el investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que sea.

- Alexander Fleming

## ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTO</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE GRÁFICAS</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE FOTOGRAFÍAS</b>	<b>XI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ANEXOS</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS</b>	<b>XIV</b>
<b>GLOSARIO</b>	<b>XV</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XVII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XVIII</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>4</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
2.1. Antecedentes de la investigación	4
2.2. Marco doctrinal de las teorías particulares en el campo de la ciencia en la que se ubica el objeto de estudio	8
2.2.1. <i>Origanum vulgare</i> L. "Orégano"	8
2.2.2. Agentes patógenos	17
2.2.3. Extracción del aceite esencial	44
2.3. Marco conceptual	47
2.4. Definición de términos básicos	48
<b>CAPÍTULO III: PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS</b>	<b>51</b>
3.1. Hipótesis	51
3.2. Variables	51
3.3. Definición operacional de variables	52

<b>CAPÍTULO IV: MARCO METODOLÓGICO</b>	<b>53</b>
4.1. Unidad de análisis, universo y muestra	53
4.2. Procedimiento	53
4.2.1 Obtención y preparación de la muestra vegetal	53
4.2.2. Determinación del efecto antibacteriano mediante el método de Kirby Bauer	54
4.3. Lectura de las placas e interpretación de los resultados	58
4.4. Técnicas de procesamiento y análisis de los datos	58
<b>CAPÍTULO V: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>59</b>
5.1. Resultados del método de Kirby Bauer	59
5.2. Discusión	65
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>73</b>
<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>74</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>82</b>



## LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1:** Comparación de las medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", con los controles, sobre la cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) 59
- Cuadro 2:** Comparación de las medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" con los controles, sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) 61
- Cuadro 3:** Comparación de las medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", con los discos control, sobre las cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) 63

## LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1:** Medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", con los controles, sobre la cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922) 59
- Gráfica 2:** Medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", con los controles, sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) 62
- Gráfica 3:** Comparación de las medidas de los halos de inhibición de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) 64

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS

**Fotografía 1:** Halos de inhibición obtenidos con el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" y de los discos control, sobre *Escherichia coli* (ATCC 25922), por el método de los discos de sensibilidad o de Kirby Bauer 60

**Fotografía 2:** Halos de inhibición del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), por el método de los discos de sensibilidad o de Kirby Bauer 62

**Fotografía 3:** Halos de inhibición del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "Orégano" y disco control, sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922), por el método de discos de sensibilidad 64

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Hojas de <i>Origanum vulgare</i> "Orégano"	10
<b>Figura 2:</b> Condiciones óptimas para el cultivo de orégano	11
<b>Figura 3:</b> Estructura química de los principales componentes en orégano	12
<b>Figura 4:</b> Estructura química de los principios flavonoides en orégano	13
<b>Figura 5:</b> Tinción Gram de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
<b>Figura 6:</b> Enfermedad estafilocócica	20
<b>Figura 7:</b> Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i>	22
<b>Figura 8:</b> Estructura antigénica de <i>Escherichia coli</i> .	27
<b>Figura 9:</b> Incidencia de enterobacterias que se asocian a bacteriemia	41
<b>Figura 10:</b> Estructura principal del destilador por arrastre con vapor.	47

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1:** Pesando los agares para su correspondiente preparación. 83
- Anexo 2:** Disolviendo los agares para poder servir y realizar las siembras correspondientes. 83
- Anexo 3:** Realizando el antibiograma para las cepas en estudio. 84
- Anexo 4:** Preparando las diluciones del aceite esencial del orégano. 84
- Anexo 5:** Colocando los discos embebidos con el aceite esencial de orégano, a las diferentes concentraciones. 85

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

- ✓ CFA : Colonization factor antigen
- ✓ CH : Colitis hemorrágica
- ✓ EHEC : *E. coli* enterohemorrágica
- ✓ EIEC : *E. coli* enteroinvasiva
- ✓ EPEC : *E. coli* enteropatógena
- ✓ EPEC : *E. coli* enteroagregativa
- ✓ ETEC : *E. coli* enterotoxigénica
- ✓ GI : Aparato digestivo
- ✓ IL : Interleucina
- ✓ ITU : Infección del tracto urinario
- ✓ IVU : Infección de vías urinarias
- ✓ TNF : Factor de necrosis tumoral
- ✓ VTEC : *E. coli* verotoxigénicas

## GLOSARIO

- **Bacteria**

Las bacterias poseen una estructura relativamente simple. Son microorganismos procariotas, es decir, unos microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico que se reproducen por división asexual (Murray et al., 2013).

- **Gram positivo**

En microbiología, se denominan bacterias Gram positivas a las bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, de aquí el nombre de "Gram-positivas". Esta característica química está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Es uno de los principales grupos de bacterias, que cuando se tratan como taxón adoptan el nombre de Posibacteria (Murray et al., 2013).

- **Gram negativo**

En microbiología, se denominan bacterias Gram negativas a las bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram, sino de un color rosado tenue, de ahí el nombre de "Gram-negativas". Esta característica está íntimamente ligada a la estructura didérmica dada por la envoltura celular, pues presenta doble membrana (una externa y la otra citoplasmática), lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana (Murray et al., 2013).

- **Planta medicinal**

Una planta medicinal es un recurso, cuya parte o extractos se emplean como droga medicinal en el tratamiento de alguna afección. La parte de la planta empleada medicinalmente se conoce con el nombre de droga vegetal, y puede suministrarse bajo diferentes formas galénicas: cápsulas, comprimidos, crema, decocción, elixir, infusión, jarabe, tintura, ungüento, etc. (Barreto et al., 2006).



## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo demostrar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Origanum vulgare* L "orégano", en cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). El material vegetal se consiguió en la provincia de Cajamarca, del que se obtuvo el aceite esencial mediante destilación por arrastre con vapor. Las cepas estandarizadas fueron obtenidas en el Instituto Nacional de Salud, Lima-Perú. Para la metodología experimental del efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* L "orégano", se utilizó el método de Kirby Bauer. En este método se empleó un grupo problema, constituido por discos embebidos de 20µL del aceite esencial diluido con etanol de 70° (diluciones de 10%, 50% y 100%), y un grupo control constituido por discos de Nitrofurantoina 300 µg, Azitromicina 15 µg, Cloxacilina 1 µg, Bacitracina 0.04 U y Cefotaxima 30 µg para la cepa *Escherichia coli* y Amoxicilina + Ac. Clavulánico 2 µg, Eritromicina 15 µg, Ciprofloxacino, Amoxicilina 25 µg y Cefradina 30 µg para la cepa de *Staphylococcus aureus*. Los resultados se analizaron empleando el programa estadístico SPSS, con el cual se determinó la media aritmética y desviación estándar de las variables cuantitativas y, a la vez, se realizó la comparación de los resultados obtenidos, siendo  $p < 0,05$  para el método de Kirby Bauer, lo que hace que el estudio sea estadísticamente significativo. Esto permitió concluir que el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", tiene efecto antibacteriano *in vitro* sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

**Palabras Clave:** Aceite esencial, *Origanum vulgare* L. "orégano", antibacteriano, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

This research aimed to demonstrate the antibacterial effect in vitro of the essential oil of *Origanum vulgare L.*, in strains of *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). The plant material was obtained in the province of Cajamarca, which the essential oil by steam stripping was obtained. Standardized strains were obtained from the National Institutes of Health, Lima-Peru. Kirby Bauer method was used for the experimental methodology, the antibacterial effect of the essential oil of *Origanum vulgare L.* A problem group consisting of embedded disks 20 $\mu$ L of essential oil diluted with ethanol 70 (dilutions of 10%, 50% and 100%), and a control group consisting of 300 mg Nitrofurantoin disks used in this method, Azithromycin 15 g, Cloxacilina 1 ug, 0.04 U Bacitracin and 30 mg cefotaxime for *Escherichia coli* strain and Amoxicillin + Ac. Clavulanic 2 ug, 15 ug erythromycin, ciprofloxacin, amoxicillin 25 mg and 30 mg for Cephadrine strain of *Staphylococcus aureus*. The results were analyzed using SPSS software, where the arithmetic mean and standard deviation was determined for quantitative variables and also the comparison of the results is performed, where  $p < 0.05$  for the Kirby Bauer method, which it makes the study statistically significant. This led to the conclusion that the essential oil from the leaves of *Origanum vulgare L.* has antibacterial effect in vitro on you know of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:** Essential oil, *Origanum vulgare L.*, antibacterial, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos omnipresentes que se encuentran entre los organismos más pequeños en la Tierra, y contribuyen a procesos biológicos, tales como la producción de alimentos y la descomposición de los residuos orgánicos. Todas las personas vivimos con ellas a diario, sin tener enfermedades, y de cierta forma nos protegen. Sin embargo, existe un número de bacterias patógenas que representan una amenaza para la salud, porque pueden causar infecciones bacterianas y tener efectos negativos e incluso fatales en el cuerpo humano. La infección bacteriana se produce cuando las bacterias entran en el cuerpo, encuentran un ambiente apropiado y luego se reproducen. Éstas ingresan a través de la boca, la nariz y las aberturas de la piel. Las bacterias también están presentes en el aire, el agua y los alimentos. *Escherichia coli* (*E. coli*), es un ejemplo común de una bacteria de origen alimentario (Barreto et al., 2006).

A pesar de los grandes avances de la investigación en medicamentos, que ayudan a combatir infecciones causadas por estos patógenos, aún no se ha logrado erradicar de manera definitiva al problema, pues, a cada paso que se da con nuevos fármacos, también las bacterias dan un paso creando resistencia a ellos (Algorta, 2008).

Desde tiempos remotos, la población del mundo ha recurrido a las plantas con el fin de tratar diversas enfermedades. Las plantas medicinales eran veneradas por las

virtudes que se les había reconocido; nadie buscaba saber por qué o cómo actuaban, pero era un hecho sin respuesta y aparentemente mágico (Liu et al., 2002).

Con el paso de los años se demostró que estas plantas, aromáticas en su mayoría, poseían principios activos compuestos por una gran variedad de sustancias químicas con diferentes acciones biológicas, que serían las que la causa de las propiedades curativas tan apreciadas que tienen, y se descubrió también que son los aceites esenciales una forma de concentrar estos principios activos en su forma más pura (Muñoz, 1987).

Nuestro país presenta una riqueza y mega diversidad de plantas nativas, lo que se constituye en uno de los pilares de la etnofarmacología y la medicina tradicional, desde la época del Incario hasta la actualidad. Son éstas utilizadas en forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado y restauración de la salud (Cano, 2007).

En el Perú, al igual que en otros países del mundo, se sigue utilizando ampliamente en las comunidades rurales una gran cantidad de plantas medicinales, sin que se haya hecho un estudio científico de sus propiedades; de ahí que se estén generando variados trabajos de investigación para determinar sus propiedades tanto farmacológicas como los principios activos, habiéndose llegado a obtener resultados satisfactorios en muchos de ellos (Vásquez, 1992).

Sin embargo, quedan aún muchas plantas que no han sido ampliamente investigadas, como es el caso del *Origanum vulgare* L. "Orégano", que es usado por la población rural, con la creencia de que posee grandes propiedades medicinales para aliviar diferentes afecciones, siendo utilizada como calmante, antiinflamatorio, contra el dolor de estómago y afecciones cutáneas en general. Cabe mencionar que dentro de la composición química de su aceite esencial, se encuentra el Citral (70-85%) como

principal componente y principio activo de esta planta, el cual posee actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*. Por este motivo, en nuestro estudio queremos demostrar el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "Orégano", sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Muñoz, 2002).

Por lo expuesto, se planteó la siguiente interrogante:

**¿Cuál es el efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" en relación al crecimiento de cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, in vitro?**

Se planteó la siguiente hipótesis:

El aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano", tiene efecto antibacteriano inhibiendo el crecimiento de las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, in vitro.

Objetivo general:

- Demostrar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "Orégano" contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, in vitro.

Objetivos específicos:

- Determinar la concentración más efectiva del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "Orégano", sobre *Escherichia coli*, in vitro.
- Determinar la concentración más efectiva del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "Orégano", sobre *Staphylococcus aureus*, in vitro.
- Comparar el efecto antibacteriano de diferentes concentraciones del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "Orégano", sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, in vitro.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de la investigación

- De la Cruz et al., (2011) evaluaron el efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlandieri Schauer*) y su aceite esencial, sobre *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae* no-01, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas (CMB) del orégano en polvo y de aceite esencial de orégano, con diferentes concentraciones de timol y carvacrol; y con dos de estos aceites se elaboraron curvas de muerte a 5 y 35 °C para *V. cholerae* no-01. Al término de la investigación se obtuvo un efecto antimicrobiano favorable sobre las cinco especies de *Vibrio*.
- Bülent et al., (2011) investigaron el efecto antimicrobiano in vitro de los aceites esenciales de orégano (*Origanum acutidens* y *Origanum rotundifolium*) y tomillo (*Sipyleus ymus*. var *sipyleus*), sobre un total de 43 microorganismos, y se llegó a la conclusión de que la susceptibilidad de los microorganismos varió por la composición del aceite. En general, los aceites esenciales mostraron valores más altos que los antibióticos probados.
- Albado et al., (2001) investigaron la actividad antimicrobiano en el aceite esencial (Carvacrol) del *Origanum vulgare*, en cepas patógenas referenciales tales como *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Bacillus*

*cereus*, *Vibrio cholerae* (ATCC 14033), *E.coli* (ATCC 25923), *Salmonella cholerae suis* (ATCC 14028) *Salmonella tiphymurium* (aislado INS) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), mostraron diferentes grados de sensibilidad, llegando a la conclusión que el aceite esencial posee actividad microbiana contra todas las bacterias evaluadas, excepto antes para *P. aeruginosa*.

- De Falco et al., (2013). Investigaron la producción de aceite esencial, la composición química y la actividad biológica de un cultivo de orégano (*Origanum vulgare* L . subsp. *vulgare* L .) bajo diferente distribución espacial de las plantas (individuales y filas binate). Este factor de planta ha demostrado afectar su crecimiento, revestimiento de suelos, biomasa fresca, la cantidad de aceite esencial y la composición. En particular, el porcentaje de aceite esencial fue mayor para el tratamiento fila binate en la plena floración. La composición química de los aceites obtenidos por hidrodestilación fue totalmente caracterizada por GC y GC-MS. El aceite de las plantas cultivadas en hileras sencillas era rica en sabineno, mientras que las plantas cultivadas en hileras dobles eran más ricas en ocimenes. Los aceites esenciales mostraron acción antimicrobiana, principalmente contra patógenos Gram-positivos y en particular *Bacillus cereus* y *B. subtilis*.
- De Martino et al., (2009) investigaron los aceites esenciales obtenidos de inflorescencias de tres *Origanum vulgare* L . *ssp.*, en diferentes localidades de la Campania (sur de Italia). Encontraron tres quimotipos: el primero, con una prevalencia de carvacrol / timol; el segundo, que se caracteriza por

el predominio de timol /  $\alpha$ -terpineol; el tercero, con una prevalencia de acetato de linalilo y linalol. Este estudio químico intenta proporcionar una contribución en el esclarecimiento de la relación entre la composición química y biotipos y / o quimiotipos en *Origanum vulgare* ssp. Los aceites esenciales también fueron evaluados por su actividad antibacteriana contra 10 microorganismos seleccionados. Los datos obtenidos contribuyen al uso de los aceites esenciales como conservantes naturales para productos alimenticios, debido a su efecto positivo en su vida de seguridad y al efecto antibacteriano que presentan.

- Jerković et al., (2001) demostraron que la temporada de recolección afectó la composición cualitativa y cuantitativa del aceite esencial de *Origanum vulgare*. La más impresionante diferencia fue el aumento del contenido de p-cimeno en agosto. Después de que el secado del material vegetal, todas las muestras mostraron una disminución menor en los rendimientos de aceites esenciales, en comparación con las plantas frescas. De secado, a temperatura ambiente, no tuvo efecto sobre la composición cualitativa del aceite de orégano.
- Michalis et al., (2013) estudiaron tres especies de plantas, los miembros de la familia de *Lamiaceae* y el género *Origanum*, a saber, *Origanum vulgare* subsp. *hirtu*, *Origanum onites* L., y *Origanum Marjorana* L. fueron estudiados por su composición química y actividad antibacteriana. Los aceites esenciales de estas plantas fueron obtenidos por medio de la destilación de micro-vapor, y sus componentes se analizaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-EIMS). Los



componentes principales identificados en las tres especies son carvacrol y timol. Los aceites se ensayaron como agentes potenciales de control de alimentos antimicrobianos, in vitro estudios mostraron que los aceites esenciales evidenciaron una fuerte actividad antimicrobiana, frente a 5 bacteriana y 1 cepas de levadura.

- Chávez et al., (2008) evaluaron el sinergismo antibacteriano entre el aceite esencial de *Origanum vulgare* y la Gentamicina en aislados de *Escherichia coli*. donde se aplicó el método de Kirby Bauer (discos de difusión) en 20 placas Petri. Se aisló la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, y se demostró que el aceite esencia de *Origanum vulgare* tiene efecto antibacteriano contra *E. coli* y, además, existe un efecto sinérgico antibacteriano in vitro entre el aceite esencial de *Origanum vulgare* y la gentamicina en *E. coli*.
- Leite et al., (2009) evaluaron la influencia del aceite esencial de *Origanum vulgare* L., en las características de producción de enterotoxina, permeabilidad de la membrana y de la superficie celular de *Staphylococcus aureus*, dándonos a conocer que el aceite esencial de *O. vulgare*, se podría aplicar racionalmente en productos alimenticios, tanto para inhibir el crecimiento de *S. aureus*, como para suprimir la síntesis de enterotoxina estafilocócica.
- Pesavento et al., (2015) evaluaron la actividad antimicrobiana de cinco aceites esenciales (EOS). Se investigó hasta 72 h frente a patógenos transmitidos por los alimentos (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*) a través de

difusión donde los aceites esenciales fueron capaces de suprimir concentraciones de  $<10^2$  CFU / g de los patógenos, revelando que *O. vulgare*, presenta un efecto antibacteriano igual que los otros aceites evaluados contra los agentes patógenos entre ellos *Staphylococcus aureus* y ello reveló el uso potencial de *R. officinalis*, *T. vulgare* y *O. vulgare*, como conservantes de alimentos en esta concentración.

- Bastos et al., (2011) evaluaron la concentración bactericida mínima del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano), frente a bacterias aisladas de leche mastítica, de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium*; y 3 cepas patrón de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. La técnica utilizada fue de dilución en microplaca y obtuvieron como resultados que la concentración bactericida mínima media varió de 0,23 a 2 % frente a las bacterias aisladas de leche bovina, con la menor concentración para el género *Streptococcus* y la mayor para *Staphylococcus coagulasa* negativa. En cuanto a las cepas patrones, la concentración bactericida mínima fue de 3,17 y 0,35 % para *S. aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente. No presentó efecto para *Pseudomonas aeruginosa*.

## **2.2. Marco doctrinal de las teorías particulares en el campo de la ciencia en la que se ubica el objeto de estudio**

### **2.2.1. *Origanum vulgare* L. “Orégano”**

#### **2.2.1.1. Taxonomía (Ramírez, 2012)**

**Reino** : Plantae

**División** : Magnoliophyta

---

<b>Clase</b>	:	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	:	Lamiales
<b>Familia</b>	:	Lamiaceae
<b>Subfamilia</b>	:	Nepetoideae
<b>Tribu</b>	:	Mentheae
<b>Género</b>	:	<i>Origanum</i>
<b>Especie</b>	:	<i>O. vulgare</i>

### 2.2.1.2.Descripción

El nombre "orégano", comprende más de dos docenas de diferentes especies de plantas, con flores y hojas que presentan un olor característico a "especioso". Las hojas secas del *Origanum vulgare* L., nativo de Europa es de uso culinario común. El género *Origanum*, pertenece a la familia Lamiaceae. Es una planta herbácea o sufruticosa, perenne, rizomatosa. Los tallos son erectos, de unos 90 cm o más, generalmente ramificados en la parte superior, pubescentes, hirsutos o vellosos, raramente glabros. Las hojas, de 10-40 x 4-25 mm, son ovaladas, enteras o ligeramente crenacio-serradas, glabras o pilosas, punteado glandulosas y pecioladas. Flores dispuestas en espiga de verticilastros de 5-30 mm, ovoide, oblonga o prismática, formando en conjunto, una inflorescencia corimbosa densa. Brácteas florales de 4-5 mm, diferentes a las hojas, casi dos veces más largas que el cáliz, ovaladas u oblongas, no apiculadas, pilosas o glabras, sin glándulas o ligeramente punteado-glandulosas, herbáceas, generalmente de color púrpura violáceo o grisáceo. El cáliz, punteado de glándulas amarillas,

con 5 dientes iguales, es piloso o glabro. La corola de 4-7 mm, es bilabiada, con el labio superior entero o escotado y el inferior trilobulado, blanca o rojo-púrpura. Androceo formado por 4 estambres fértiles, con los filamentos divergentes, didínamos (Muñoz, 2002).

**Figura 1: Hojas de *Origanum vulgare* "Orégano"**



**Fuente:** Colección de fotografías. Salud. Grupo RPP.

Las hojas de orégano (Figura 1) se usan no sólo como condimento de alimentos, sino también en la elaboración de cosméticos, fármacos y licores; por lo que se ha convertido en un producto de exportación. Adicionalmente, la Organización Mundial de la Salud estima que cerca del 80% de la población en el mundo usa extractos vegetales o sus compuestos activos, por ejemplo los terpenoides, para sus cuidados primarios de salud. En base a criterios morfológicos, el género *Origanum*, se ha clasificado en 3 grupos, 10 secciones, 38 especies, 6 subespecies y 17 híbridos. Lawrence informa

que son cuatro los grupos de orégano comúnmente usados con propósitos culinarios: el griego (*Origanum vulgare* spp. *Hirtum* (Link) *Ietswaart*), el español (*Coridohymus capitatus* (L.) *Hoffmanns* y *Link*), el turco (*Origanum onites* L.) y el mexicano (*Lippia graveolens* Kunth). La composición y la cantidad de los metabolitos secundarios de estas plantas dependen de factores climáticos: la altitud, la época de cosecha y su estado de crecimiento (Figura 2). Por lo expuesto, el estudio de dichos factores y su influencia en su cultivo es importante para el mejor aprovechamiento y explotación. El p-cimeno y los derivados fenólicos carvacrol y timol han sido encontrados en diversas hierbas y especias incluyendo el orégano. Estas sustancias son monoterpenoides, representativos de un pequeño grupo de compuestos aromáticos que la naturaleza produce vía la ruta del mevalonato, seguido por compuestos aromáticos que involucran al ácido shiquímico (Muñoz, 2002).

**Figura 2: Condiciones Óptimas para el cultivo de Orégano**

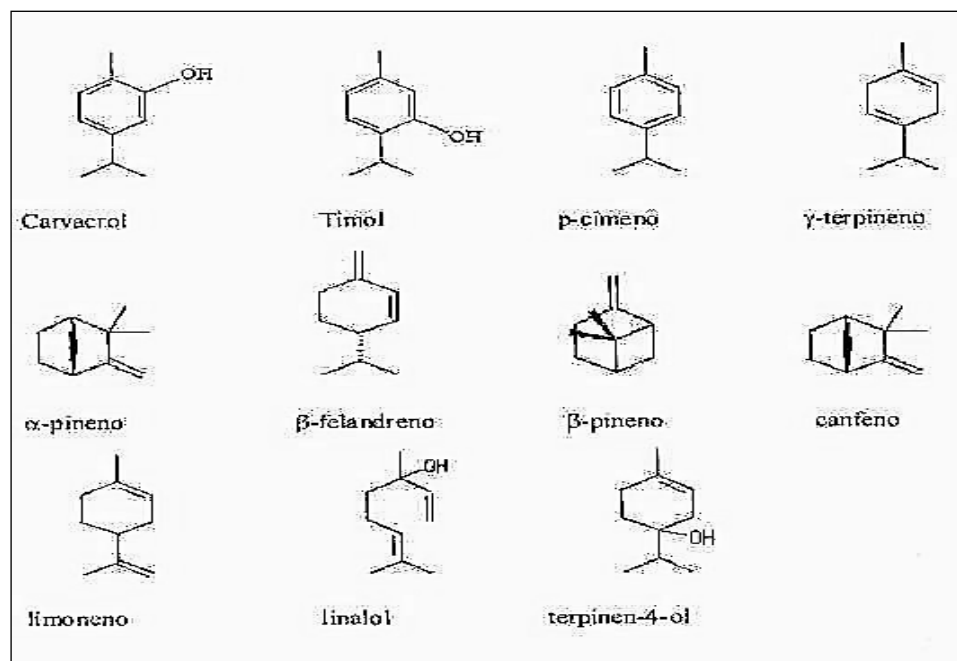
<b>Temperatura Óptima</b>	18 a 24 °C
<b>Humedad Relativa</b>	70%
<b>pH</b>	Tolera el pH alcalino.
<b>Altitud</b>	1500 a 3000 msnm
<b>Clima Suelo</b>	Tiene éxito en casi todos los tipos de suelo ricos en materia orgánica y con buen drenaje, de preferencia no salinos; en los suelos arcillosos la longevidad se reduce. Los mayores rendimientos en aceite esencial se obtienen en zonas bien soleadas y cuya altitud no sea excesiva. Crece espontáneamente donde el clima sea entre templado y subtropical, no demasiado seco. Resiste bien las heladas, sobre todo el orégano rojo (la <i>spp. vulgare</i> ) y ambos mucho más resistentes que el O. majorana. (Infoagro)

**Fuente:** Salamanca – Sánchez, 2009

### 2.2.1.3. Composición química del orégano

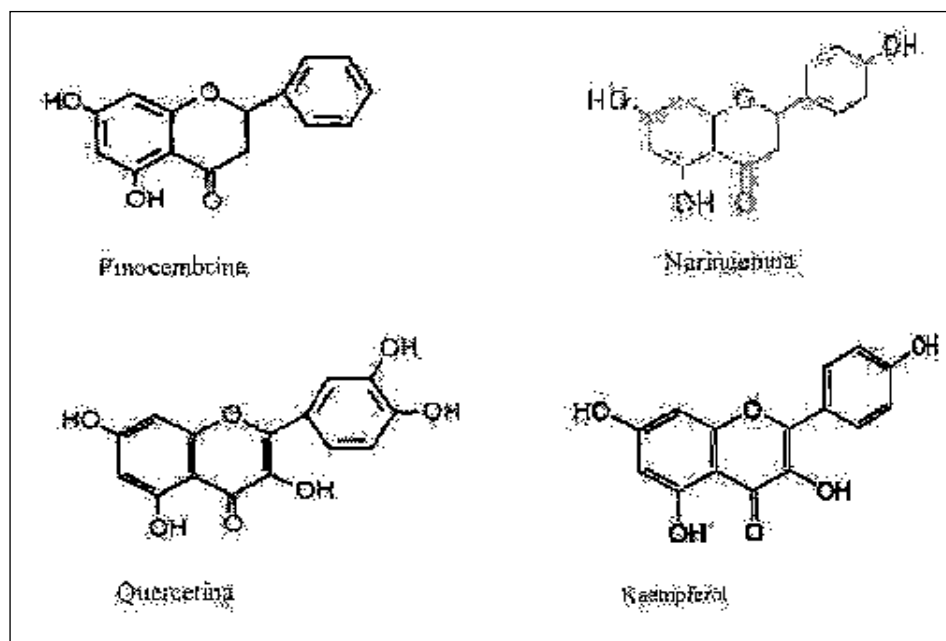
Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos, extractos hidroalcohólicos y sus aceites esenciales. Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. En *Origanum vulgare*, se han encontrado ácidos coumérico, ferúlico, caféico, *r*-hidroxibenzóico y vainillínico. También contiene flavonoides como naringenina y pinocembrina, lapachenol e icterogenina. Las Figuras 3 y 4 presentan las estructuras químicas de algunos de los compuestos principales presentes en el orégano (Corella-Bernal, 2013).

**Figura 3: Estructura química de los principales componentes en orégano**



Fuente: Arcila-Lozano, 2004

**Figura 4: Estructura química de los principios flavonoides en orégano**



Fuente: Arcila-Lozano, 2004

Los monoterpenoides, compuestos volátiles con olores intensamente pungentes, son los responsables de las fragancias, las sensaciones de olor y sabor de muchas plantas. Estructural y biológicamente son muy diferentes, llegándose a clasificarlos hasta en 35 grupos. Los principales quimiotipos de la especie *Origanum vulgare*, son el carvacrol y el timol, cada uno con enzimas específicas que dirigen su biosíntesis (Muñoz, 2002).

#### 2.2.1.4. Actividad biológica de los componentes del orégano

Se la considera espasmolítica, digestiva, carminativa, aperitiva, colerética, expectorante, antiséptica de las vías respiratorias, diurética, tónica. En uso externo es cicatrizante, analgésica, antiséptica y antifúngica. Se reconocen también las propiedades antisépticas de las vías respiratorias, expectorantes, béquicas, carminativas, digestivas,

aperitivas, coleréticas, espasmolíticas, diuréticas, antirreumáticas, sedantes y diaforéticas; aunque queda claro que estas acciones no están comprobadas y se consideran solo tras su uso empírico (Muñoz, 2002).

Al aceite esencial también se le atribuye una acción antioxidante (Araya et al., 2002).

#### ➤ Antioxidante

Una de las principales actividades biológicas del orégano es su capacidad antioxidante, especialmente en especies del género *Origanum* (Muñoz, 2002).

La función antioxidante de diversos compuestos en los alimentos ha atraído mucha atención en relación al papel que tienen en la dieta, en la prevención de enfermedades. Los compuestos antioxidantes son importantes porque poseen la capacidad de proteger a las células contra el daño oxidativo, el cual provoca envejecimiento y enfermedades crónico-degenerativas, tales como el cáncer, enfermedad cardiovascular y diabetes. Los antioxidantes como los tocoferoles, los carotenoides, el ácido ascórbico y los compuestos fenólicos se consumen a través de los alimentos. En algunos estudios de especias se ha aislado una amplia variedad de compuestos antioxidantes fenólicos (Arcila-Lozano, 2004).

El efecto antioxidante de las plantas aromáticas se debe a la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos. Entre las diferentes variedades de orégano se han encontrado altos niveles de antioxidantes (>140 mmol/100 g). El potencial



antioxidante de los extractos de orégano ha sido determinado por su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, protegiendo al ADN del daño por radicales hidroxilo, con los métodos de atrapamiento de peróxido de hidrógeno, atrapamiento de HOCl y por la prueba de la rancidez. En todas estas pruebas, los extractos de orégano han mostrado ser efectivos, en algunos casos a niveles superiores a los exhibidos por el propil galato, BHT y BHA. Sin embargo, sus aplicaciones industriales son limitadas debido al aroma y sabor que pueden dejar en los alimentos donde se colocarían, por lo que se requiere de investigación en procesos de deodorización. La actividad antioxidante depende del tipo y polaridad del solvente extractante; por ejemplo, los antioxidantes obtenidos con agentes lipofílicos son más efectivos en emulsiones. El aceite esencial de *Origanum vulgare* tiene actividad anti-radical, propiedad que se le atribuye a los monofenoles carvacrol y timol. Varios investigadores confirman el potencial antioxidante de extractos y aceites esenciales de diferentes variedades de orégano (*O. vulgare*, *O. compactum*, *O. majorana*). Las hierbas y especias como el orégano, son también una fuente potencial de vitamina C y de otros compuestos antioxidantes como los carotenoides. En el orégano (*Origanum vulgare*), se ha encontrado un contenido de ácido ascórbico de  $26 \pm 3$  M/g, de luteína de  $206 \pm 6$  g/g y de zeaxantina de  $44 \pm 1$  g/g. A partir de las hojas secas de orégano (*Origanum vulgare* L.), se ha identificado como principal antioxidante un glicósido fenólico (Muñoz, 2002).

➤ Potencial antimicrobiano

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los diferentes extractos y aceites esenciales de las especies del género *Origanum*, presentan actividad contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*. Tienen además capacidad antifúngica contra, *Candida albicans*, *C.tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomonas aeruginosa*. Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos, excepto para *Pseudomonas aeruginosa*, siendo el timol el más activo (Bastos et al., 2011).

En el caso de *Escherichia coli*, existe una relación concentración/efecto a 625 ml/L con actividad bactericida después de 1 minuto de exposición al aceite, mientras que después de 5 minutos se requirieron 156 y 312 ml/L. Dicha acción antimicrobiana, posiblemente se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana, provocando cambios en la composición de los ácidos grasos. Se ha

informado que las células que crecen en concentraciones subletales de carvacrol, sintetizan dos fosfolípidos adicionales y omiten uno de los fosfolípidos originales. Se ha encontrado que el aceite esencial de orégano es muy valioso en la inhibición de *Escherichia coli*. Otros microorganismos como *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii* biogroup *sobria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype *typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Staphylococcus aureus*, se han logrado inhibir gracias a la presencia de extractos de orégano (2% v/v). Estos estudios tienen importantes implicaciones para la industria alimentaria (Muñoz, 2002).

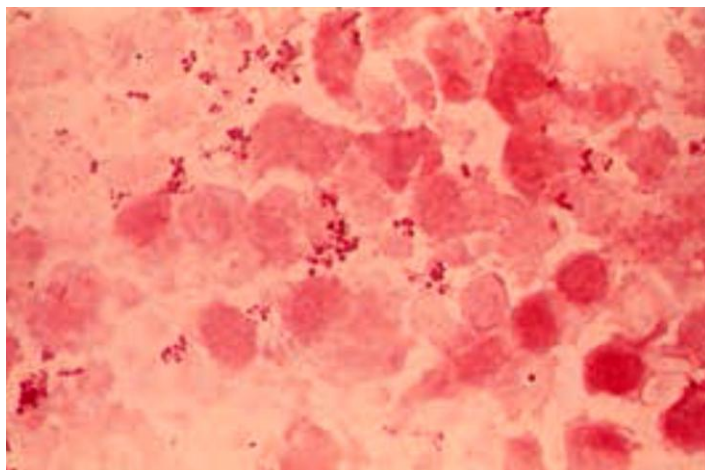
Como podemos ver, el orégano es una planta con muchas cualidades las que aún siguen estudiándose. Por ejemplo, hay estudios que se basan en la acción estrogénica, actividad insecticida, capacidad antigenotóxica (Bastos et al., 2011).

## **2.2.2. Agentes patógenos**

### **2.2.2.1. *Staphylococcus aureus***

Los miembros del género *Staphylococcus* (estafilococos) son cocos Gram positivos que tienden a disponerse en racimos similares a uvas (Figura 5). A nivel mundial, *Staphylococcus aureus*, es una de las causas más comunes de infecciones purulentas agudas (Albado et al., 2001).

**Figura 5: Tinción Gram de *Staphylococcus aureus*.**



Cocos Gram positivos semejantes a racimos de uvas.

**Fuente:** Ryan y Ray, 2011

➤ Clasificación científica (Ryan y Ray, 2011)

- Reino : Bacteria
- Filo : Firmicutes
- Clase : Bacilli
- Orden : Bacillales
- Familia : Staphylococcaceae
- Género : *Staphylococcus*
- Especie : *S. aureus*

➤ Morfología y estructura

En los cultivos que están en desarrollo, las células de *S. aureus* son uniformemente Gram positivas y de tamaño regular, y se unen en racimos con la precisión de bolas de billar. En cultivos más viejos, en lesiones en vías de resolución y en la presencia de ciertos antibióticos, es frecuente que las células demuestren una mayor variabilidad en tamaño y que muchas pierdan su Gram positividad. La pared celular de *S. aureus* consiste en un típico

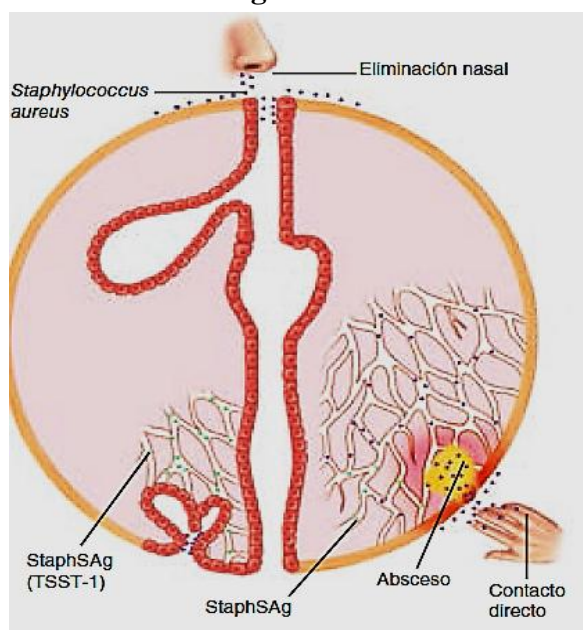
peptidoglucano Gram positivo, entreverado con cantidades considerables de ácido teicoico. El peptidoglucano de la pared celular, comúnmente se encuentra cubierto de polisacáridos y proteínas de superficie. Aunque se han identificado cápsulas de polisacárido, se desconoce su importancia en las infecciones humanas y no se discutirán en adelante. Es probable que las proteínas de superficie como un factor de aglutinación (Clf) que se enlaza al fibrinógeno, así como las proteínas fijadoras de fibronectina (FnBP), representen un papel en las primeras etapas de la infección. Otra proteína, la proteína A es única por cuanto enlaza la porción Fc de las moléculas de IgG, dejando la porción Fab de reacción al antígeno dirigida hacia el exterior. Este fenómeno se ha aprovechado en los sistemas de prueba para la detección de antígenos libres. Es probable que la proteína A contribuya a la virulencia de *S. aureus* como factor antifagocítico (Ryan y Ray, 2011).

➤ Epidemiología

*S. aureus*, es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial, bacteria oportunista que forma parte de la microflora humana: poco después del nacimiento, los neonatos son colonizados por *S. aureus* (Figura 6), los sitios de colonización incluyen el muñón del cordón umbilical, el área perineal, la piel y, a veces, el tracto gastrointestinal. También puede contaminar la vestimenta y la ropa de cama. La colonización más frecuente por *S.*

*aureus*, es la mucosa nasal, el principal reservorio lo constituye el hombre enfermo o el portador. Es más frecuente la colonización en el hospital, especialmente en pacientes con hemodiálisis, diabéticos tipo 1, pacientes con lesiones cutáneas, sujetos infectados con VIH y adictos a las drogas (Cervantes et al., 2014).

**Figura 6: Enfermedad estafilocócica**



Por lo común, la fuente de infección es endógena a partir de las narinas anteriores colonizadas o por contacto directo con alguien que transporta *S. aureus*.

**Fuente:** Ryan y Ray, 2011

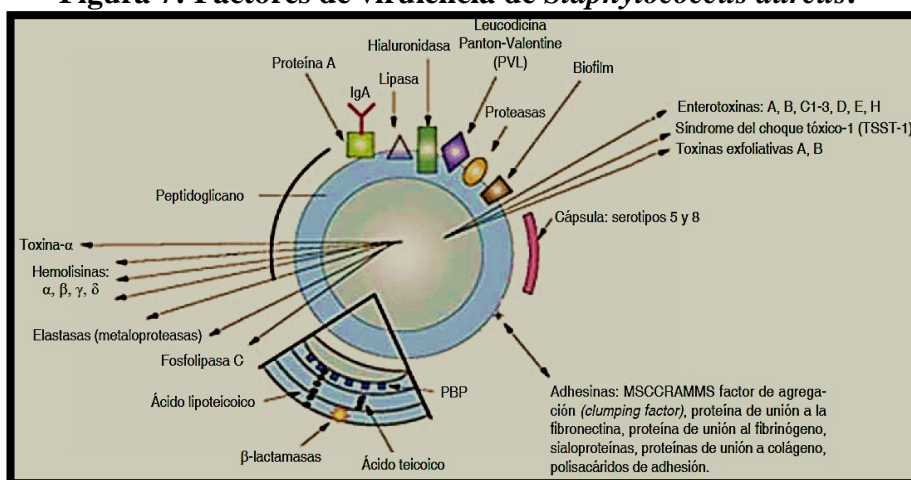
El portador nasofaríngeo asintomático es también origen frecuente de *S. aureus*, resistente a la meticilina. Las infecciones causadas por los MRSA son las mismas a las producidas por cepas sensibles a la meticilina, particularmente las heridas quirúrgicas, bacteriemias a partir de catéter y la neumonía en enfermos ventilados. Un aspecto importante en años recientes en salud pública son las infecciones por *S. aureus*, que han reemergido porque la bacteria se ha tornado resistente a diversos antibióticos con los que normalmente se las

trata. Durante varias décadas se ha reportado gran número de brotes epidémicos de *S. aureus*, a nivel mundial, sobre todo en los hospitales, centros de atención, clínicas y recientemente, en la comunidad. Actualmente, estos brotes se dividen como infecciones nosocomiales e infecciones adquiridas en la comunidad (Cervantes et al., 2014).

➤ Patogenia

Entre 20 y 50% de la población mundial es portadora de *S. aureus* en fosas nasales y 30% de forma permanente en piel y tracto gastrointestinal. Cuando las barreras mecánicas se rompen, esta bacteria puede alcanzar los tejidos más profundos y producir enfermedad, debido a los factores de virulencia que posee (Figura 7). Los pacientes con infecciones por *S. aureus*, suelen infectarse con la misma cepa que coloniza sus fosas nasales, colonización que también permite la transmisión entre individuos del hospital como en la comunidad. Para una adecuada supervivencia e invasión del huésped, todo este sistema de factores de virulencia debe de estar dentro de un sistema de comunicación célula-célula, conocido como quorum sensing (QS). Este sistema QS está mediado por pequeñas proteínas producidas por las bacterias que se denominan autoinductoras, y dependiendo de factores ambientales pueden activar un gran número de genes que contienen los factores de virulencia. El sistema QS más estudiado es el de *S. aureus*, denominado regulador de genes accesorios (Cervantes et al., 2014).

**Figura 7: Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*.**



*Fuente: Cervantes et al., 2014*

### ➤ Manifestaciones clínicas

Las infecciones causadas por *S. aureus* se producen por lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas, que favorecen la penetración de la bacteria desde la piel a los tejidos profundos. Las infecciones por *S. aureus*, son supurativas y tienden a producir abscesos. Debido a su amplia versatilidad, esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro, como infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y el síndrome de choque tóxico; así como infecciones gastrointestinales. Las infecciones de la piel y tejidos blandos se caracterizan por la formación de vesículas pustulosas, las cuales comienzan en los folículos pilosos y se propagan a tejidos vecinos. La foliculitis es una infección piógena superficial. Su extensión al tejido perifolicular da lugar al forúnculo. Otras infecciones cutáneas ocasionadas por *S. aureus*, son el impétigo (infección



superficial que afecta sobre todo a niños en áreas tropicales), mastitis, hidrosadenitis supurada, celulitis fascitis y paroniquia. *S. aureus* es uno de los patógenos que se observa con mayor frecuencia en infecciones de heridas quirúrgicas, tanto superficiales como profundas; asimismo, está implicado en las infecciones de úlceras crónicas como el pie diabético; además es causa común de bacteriemia, el foco inicial se desconoce. Las bacteriemias por *S. aureus* que se presentan en los hospitales, se relacionan con el uso de catéteres y otros procedimientos invasivos; mientras que las bacteriemias de la comunidad, el foco que las origina suele ser extravascular (infecciones de piel, ocasionalmente el aparato respiratorio y neumonías). Las infecciones metastásicas y la endocarditis son complicaciones importantes de la bacteriemia. La frecuencia de endocarditis en pacientes con bacteriemia por *S. aureus*, oscila en 5 a 20%, según sean los pacientes con bacteriemia hospitalaria o adquirida en la comunidad. *S. aureus* es la causa más frecuente de endocarditis infecciosa aguda, afecta sobre todo a la válvula mitral y aórtica, ya sea nativas o protésicas; entre las complicaciones por endocarditis por este patógeno están la insuficiencia cardíaca por diseminación valvular, embolismo séptico, abscesos hematógenos cerebrales o viscerales, abscesos miocárdicos y pericarditis purulenta, dicha bacteria también se encuentra en pericarditis; generalmente es de origen hematógeno, aunque también puede ocurrir tras cirugía en cuyo caso es de pronóstico grave; inclusive puede deberse a un traumatismo

penetrante. En infecciones músculo-esqueléticas, *S. aureus* es una de las bacterias que con mayor frecuencia origina infecciones óseas por diseminación hematológica y por contigüidad. En niños, la osteomielitis hematológica suele afectar la metafisis de los huesos largos, mientras que en los adultos, tal bacteria afecta el tejido esponjoso vertebral dando lugar a osteomielitis vertebral. La osteomielitis crónica por contigüidad es más frecuente y se produce como complicación de cirugía ortopédica y traumatismos. También puede ocasionar infecciones de prótesis articulares, siendo el principal agente etiológico causante de artritis séptica y de bursitis. Las articulaciones afectadas con mayor frecuencia son las rodillas, tobillos, caderas, hombros y las interfalángicas. La piomiositis es una infección poco común de los músculos de fibra estriada que afecta a personas con enfermedad de base. La forma más frecuente es el absceso del psoas de origen hematológico, o como consecuencia de una infección vertebral. Las neumonías por la referida bacteria son poco frecuentes, pero graves. Se pueden producir por aspiración de secreciones orales o por diseminación hematológica. La neumonía por aspiración de adquisición comunitaria se produce por complicación de cuadros virales, mientras que la nosocomial es más frecuente en pacientes con ventilación mecánica. La complicación más frecuente de la neumonía es el empiema, *S. aureus* puede ser la causa de infecciones del sistema nervioso central. La meningitis piógena estafilocócica puede ser de origen hematológico o como una

complicación de un absceso. Los abscesos cerebrales pueden ser de origen hematógeno a partir de una endocarditis o por contigüidad a partir de una sinusitis, traumatismos o cirugías. *S. aureus* también se considera como causa frecuente de empiema subdural y absceso epidural medular o intracraneal. Su presencia en infecciones de vías urinarias es rara. Su presencia en la orina sugiere origen hematógeno. Las infecciones ascendentes son debidas a la manipulación instrumental, asimismo, en infecciones por toxinas estafilocócicas, principalmente en el síndrome de la piel escaldada. Es una dermatitis exfoliativa ampollar que no afecta mucosas y es más frecuente en neonatos y niños, en zonas tropicales. Suele aparecer como una complicación de piodermal localizado, debido a que *S. aureus* produce una toxina exfoliativa o epidermolítica. La producción de estas toxinas tiene lugar especialmente durante la fase de latencia de crecimiento de la bacteria, lo que favorece su diseminación, lo que puede producir choque séptico por la activación del sistema inmunológico y del sistema de coagulación mediado por el peptidoglicano, los ácidos teicoicos y la toxina-alfa. El síndrome de choque tóxico (SST-1) es un cuadro grave debido a la producción de la toxina TSS-1, inicialmente se describió en niños y posteriormente en mujeres jóvenes que usaban tampones. En la actualidad, la mayor parte de los casos son secundarios a infecciones estafilocócicas diversas. También puede producir superantígenos, tales como las enterotoxinas que causan toxiinfecciones alimentarias o gastroenteritis estafilocócica y la

toxina TSST-1, causante del síndrome del choque tóxico. Estos superantígenos pueden generar cuadros similares al choque séptico por la producción incontrolada de citosinas. La toxiinfección alimentaria se debe a la ingestión de alimentos contaminados con toxinas del microorganismo. Es un cuadro autolimitado que cursa con vómitos, dolor abdominal, cólicos y diarrea. Podemos considerar que aún falta mucho por conocer de *S. aureus*, sobre todo a nivel de sus mecanismos de resistencia cambiantes y múltiples factores de virulencia. De este modo, podremos dar un tratamiento más adecuado a los pacientes infectados por esta bacteria (Cervantes et al., 2014).

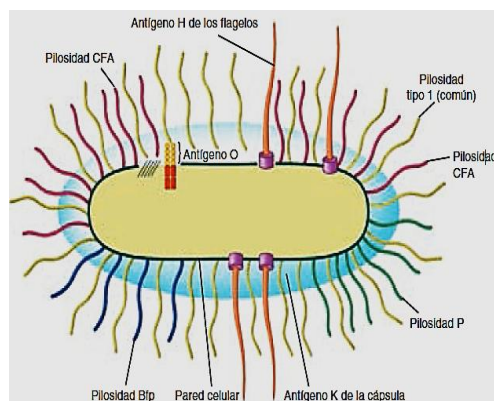
#### **2.2.2.2. *Escherichia coli***

El género *Escherichia* se compone de cinco especies, de las que *E. coli*) es la más frecuente y la más relevante desde el punto de vista clínico (Murray et al., 2009).

Toma este nombre en honor del pediatra que la aisló y caracterizó en 1885. Constituye la especie dominante de la flora aerobia del tubo digestivo, pues, más de 10 serotipos pueden coexistir normalmente en el mismo individuo. Son estas mismas bacterias integrantes de la flora normal, las que pueden causar en diversas circunstancias infecciones abdominales, septicemias, meningitis, etc. El hecho de poseer determinadas características antigénicas, como el antígeno de envoltura K1, muy parecido por su composición en ácido siálico al antígeno capsular de *Neisseria meningitidis*, del grupo B,

daría a este germen potencialidades invasivas. El 80% de *E. coli* aisladas de meningitis del recién nacido poseen este antígeno K1. Por otra parte, el poseer plásmidos que portan genes que codifican para la producción de diferentes adhesinas, enzimas o enterotoxinas, otorga a *E. coli* características patogénicas (Figuras 8) particulares y la capacidad en una u otra circunstancia, dependiendo de la o las proteínas producidas, generar infecciones urinarias o gastrointestinales. Es habitualmente fermentador de la lactosa, úrea y citrato negativo, indol positivo y móvil. Desde el punto de vista antigénico en *E. coli*, se han descrito más de 150 serogrupos O. Poseen antígenos de envoltura polisacáridos K, que, como es habitual en el mundo bacteriano, permiten a la bacteria resistir más fácilmente la fagocitosis que las bacterias no capsuladas. Asimismo, se describen más de 56 antígenos H que permiten completar su clasificación en serotipos O:H. De lo dicho se desprende que una tipificación antigénica completa es resorte de laboratorios especializados y no forma parte del trabajo corriente de los laboratorios (Algorta y Schelotto, 2008).

**Figura 8: Estructura antigénica de *Escherichia coli*.**



Fuente: Ryan y Ray, 2011

El antígeno O está contenido en unidades de polisacáridos repetidas en un lipopolisacárido (LPS) ubicado en la membrana externa de la pared celular. El antígeno H es una proteína flagelar. El antígeno K es un polisacárido de la cápsula que se encuentra presente en algunas cepas. La mayor parte de *E. coli*, tiene pilosidad de tipo 1 (común) que se extiende desde la superficie. Algunas bacterias del género *E. coli*, tienen antígenos de factor de colonización especializado P (CFA) o pilosidades formadoras de haces (Bfp), así como pilosidades de tipo 1.

La infección por *E. coli*, se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, productos cárnicos poco cocidos y leche cruda (Organización Mundial de la Salud, 2010).

Una cepa de la orina se puede identificar rápidamente como *E. coli*, por su hemólisis en agar sangre, su morfología de colonia característica con un lustre "iridiscente" en medios diferenciadores como agar EMB y una prueba de indol de mancha positiva. Más de 90% de las cepas de *E. coli*, tiene positividad para glucuronidasa  $\beta$ , si se utiliza el sustrato 4-metilumbeliferil- $\beta$ -glucurónido (MUG). Las cepas de otros lugares anatómicos además de la orina, con propiedades características (pruebas de oxidasa por encima de la negatividad adicional), a menudo se pueden confirmar como *E. coli*, con una prueba de MUG positiva (Brooks et al., 2010).

Los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta. También pueden aparecer fiebre y vómitos. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte (Organización Mundial de la Salud, 2010).

➤ Clasificación científica (Ciencias Médicas, 2011)

- Reino : Bacteria
- Filo : Proteo bacteria
- Clase : Gammaproteobacteria
- Orden : Enterobacteriales
- Familia : Enterobacteriaceae

- Género : *Escherichia*
- Especie : *E. coli*

➤ Patogenia e inmunidad

*E. coli* posee una amplia variedad de factores de virulencia. Además de los factores generales que comparten todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae, las cepas de *Escherichia*, responsables de enfermedades como las IAU y las gastroenteritis, poseen unos factores de virulencia especializados. Estas dos categorías generales son las adhesinas y las exotoxinas (Murray et al., 2009).

- Adhesión

*E. coli* es capaz de permanecer en el aparato urinario o en el aparato digestivo, como consecuencia de su capacidad de adherencia a las células en estas localizaciones, para evitar ser eliminado por el efecto de arrastre de la orina que se expulsa con la micción o por la motilidad intestinal. Las cepas de *E. coli* poseen numerosas adhesinas muy especializadas. Éstas incluyen factores antígenos del factor de colonización (CFA/I, CFA/II, CFA/III), fimbrias de adherencia y agregación (AAF/I, AAF/III), pili que forman haces (Bfp), intimina, pili P (que también se une a los antígenos del grupo sanguíneo P), proteína Ipa (antígeno del plásmido de invasión) y fimbrias

Dr (que se unen a los antígenos del grupo sanguíneo Dr)  
(Murray et al., 2009).

- Exotoxinas

*E. coli*, produce también un espectro variado de exotoxinas que incluyen las toxinas Shiga (Stx-1, Stx-2), las toxinas termoestables (STa, STb) y las toxinas termolábiles (LT-I y LT-II). Por otra parte, las hemolisinas (HlyA) se consideran importantes en la patogenia de la enfermedad producida por *E. coli* uropatógeno (Murray et al., 2009).

- Clasificación

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli*, causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: *enterotoxigénica* (ETEC), *enterohemorrágica* también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), *enteroinvasiva* (EIEC), *enteropatógena* (EPEC), *enteroagregativa* (EAEC) y *adherencia difusa* (DAEC) (Rodríguez, 2002).

- ***E.coli* enterotoxigénica**

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina



termoestable (ST). Sus genes están en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de ST se han encontrado en transposones. Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP, respectivamente, que se encuentran en la membrana de las células intestinales, provocando la salida de agua y iones. Las ETEC son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida. La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno de *E. coli*, en niños con diarrea es de 10 a 30%. En los niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente, o producir la diarrea del viajero. La enfermedad tiene un periodo de incubación de 14 a 50 h. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presenta fiebre y vómito. La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada, pero también puede ser grave. La contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección, siendo la dosis infectiva de 10<sup>8</sup> UFC (unidades formadoras de colonias) (Rodríguez, 2002).

▪ ***E. coli* enterohemorrágica**

Riley describió y relacionó a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis

hemorrágica (CH) causada por la ingestión de carne cruda o mal cocida. La bacteria aislada de todos los casos fue *E. coli*, del serotipo O157:H7. Karmali, en 1983, la asoció con casos aislados de síndrome urémico hemolítico (SUH), caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre, con la presencia en heces de *E. coli*, productora de una citotoxina con actividad en células Vero, por lo que se le llama verotoxina (VT), y a las cepas capaces de producirla se les denominó *E. coli*, verotoxigénicas (VTEC). Además, se observó que la citotoxina se neutralizó con antitoxina obtenida a partir de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que también se le llamó "shiga-like toxin" o toxina semejante a shiga (SLT) o "shiga toxin" (STX), y a las *E. coli*, capaces de producirla se les da el nombre de STEC. La capacidad toxigénica de las cepas es necesaria para que el paciente desarrolle colitis hemorrágica y diarrea con sangre, ya que la citotoxina STX es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC, y su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago STX, que está insertado en el genoma. La STX actúa a nivel de síntesis de proteínas, ya que se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero. En las cepas EHEC aisladas, se han encontrado las variantes STX1 y STX2 que son inmunológicamente diferentes, de tal manera que se pueden aislar bacterias que sintetizan alguna de las toxinas o

ambas. Además de la toxina, las EHEC tienen otros mecanismos de patogenicidad como el fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E), y presentan el gene cromosomal eae que codifica para la proteína de membrana externa (OMP) de 94 kilodaltones (kDa), llamada intimina, cuya expresión es regulada por genes plasmídicos. El gene eae también se encuentra en las cepas EPEC. Otro factor de patogenicidad es el plásmido pO157, de 60 megadaltones (MDa), que codifica para la enterohemolisina. Actualmente hay al menos dos clasificaciones del grupo EHEC. Una es en función de la presencia de sus factores de patogenicidad: a) cepas típicas cuando tienen el fago, el plásmido de 60 MDa y presentan el fenómeno de A/E, y b) cepas atípicas, cuando no producen lesiones de A/E y pueden presentar o no el plásmido de 60 MDa. La otra clasificación en función del serotipo es: Cepas *E. coli* O157:H7 y cepas no-O157:H7. El periodo de incubación de EHEC es de 1 a 8 días; inicialmente produce diarrea sin sangre, con o sin vómito, dolor abdominal, fiebre, y después de 1 a 2 días la diarrea se torna sanguinolenta y se intensifica el dolor abdominal, en un lapso de 4 a 10 días, con heces abundantemente sanguinolentas. Se cura o bien llega hasta SUH. La identificación de EHEC se puede hacer por las pruebas moleculares como RFLP, hibridación, campos pulsados, PCR y RAPD-PCR que pueden detectar hasta 102 UFC/0.1g de materia fecal, además de que permiten realizar una

subtipificación con fines epidemiológicos de este grupo de bacterias (Rodríguez, 2002).

▪ ***E. coli* enteroinvasiva**

El grupo EIEC y *Shigella* spp están relacionados genética y bioquímicamente, ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa, requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes. La información genética para este mecanismo está en loci del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado pInv, que codifica para proteínas como, por ejemplo las Ipa y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis. Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco; pero algunos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indistinguible de la que produce ETEC. Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de

persona a persona por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses. El diagnóstico de EIEC se hace por prueba in vivo como la de Sereny, que es la inoculación de un cultivo puro de la bacteria en un ojo de un cobayo, en el cual después de 24 a 96 h se produce una ulceración en el ojo, pero también hay métodos inmunológicos y moleculares (Rodríguez, 2002).

▪ ***E. coli enteropatógena***

EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E). La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman Bfp (bundle-forming pilus) cuya información genética está codificada en un plásmido de 50-70MDa, denominado EAF (EPEC adherence factor) y de algunos genes cromosomales. En la adherencia es necesaria la síntesis de una proteína de membrana externa de 94 kDa

llamada intimina, codificada por el gene cromosomal eae y que sirve como señal en A/E. En ensayos in vitro, las cepas EPEC se caracterizan por formar microcolonias en el citoplasma de las células Hep-2 y su estudio incluye factores de patogenicidad como el efecto A/E, presencia de plásmidos y fimbrias. Las cepas EPEC se consideran típicas cuando tienen los genes eae para la intimina, que participa en A/E, y el plásmido EAF que codifica para el Bfp; se dice que son atípicas cuando sólo presentan los genes eae, pero no el plásmido EAF. EPEC puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. Este grupo afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes. La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos. Los reservorios de EPEC pueden ser niños y adultos, con o sin síntomas. El cuadro clínico que produce EPEC se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción. El diagnóstico de EPEC incluye ensayos in vitro en cultivos celulares y métodos moleculares (Rodríguez, 2002).

▪ ***E. coli enteroagregativa***

Scaletsky y Nataro encontraron cepas aisladas de pacientes con diarrea, las cuales por serología no correspondían

al grupo EPEC, pero sí presentaban un patrón característico de adherencia diferente a EPEC y que, además, eran negativas a la prueba de EAF. En estudios posteriores se encontró el fenotipo de adherencia agregativa, caracterizada por autoaglutinación de las bacterias entre sí y por ser inespecífica, porque las bacterias se adhieren a la superficie de las células Hep-2 y a la superficie del cubreobjetos libre de células Hep-2. La adherencia a células Hep-2 y la hemaglutinación de eritrocitos humanos, se debe a la presencia de una fimbria o adhesina flexible llamada fimbria I de adherencia agregativa (AAF/I), codificada por el gene *aggA* que se encuentra en un plásmido de 60 MDa. También se ha descrito la fimbria AAF/II inmunológicamente diferente a AAF/I, la que está codificada por el gene *aafA*; sin embargo, no todas las EAEC presentan estas fimbrias. En el mecanismo de patogenicidad de EAEC, están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce. También se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco, la que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea. En el plásmido de 60 MDa de EAEC, también se encuentran los genes que codifican para la toxina EASTI. Eslava y colaboradores identificaron dos proteínas de alto peso molecular de cepas EAEC, aisladas de niños que

murieron de diarrea persistente. Estas proteínas fueron probadas en asa ligada de rata, observándose vellosidades cortas, hemorragia y necrosis. El gene para una de estas proteínas se encontró en un plásmido de 65 MDa, y a la proteína se le dio el nombre de Pet (plasmid-encoded toxin), la cual tiene la capacidad de producir efecto citopático en células Hep-2, caracterizado por arredondamiento y desprendimiento de las células, así como contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina. En EAEC se ha descrito también la proteína Pic que está codificada en el genoma y que tiene actividad de proteasa. El sitio blanco de daño de EAEC puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un periodo de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 o 20 días. Esta bacteria puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente. En niños puede manifestarse con diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre, y que en ocasiones puede llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa. Algunas veces el cuadro clínico se presenta como diarrea con moco con o sin sangre, vómito, y sin o con poca fiebre. La prueba de referencia para el diagnóstico de EAEC es la observación de la adherencia agregativa en células Hep-2 de cultivos bacterianos, previamente inoculados en medio Luria e incubados en condiciones estacionarias, y a 37 °C (Rodríguez, 2002).



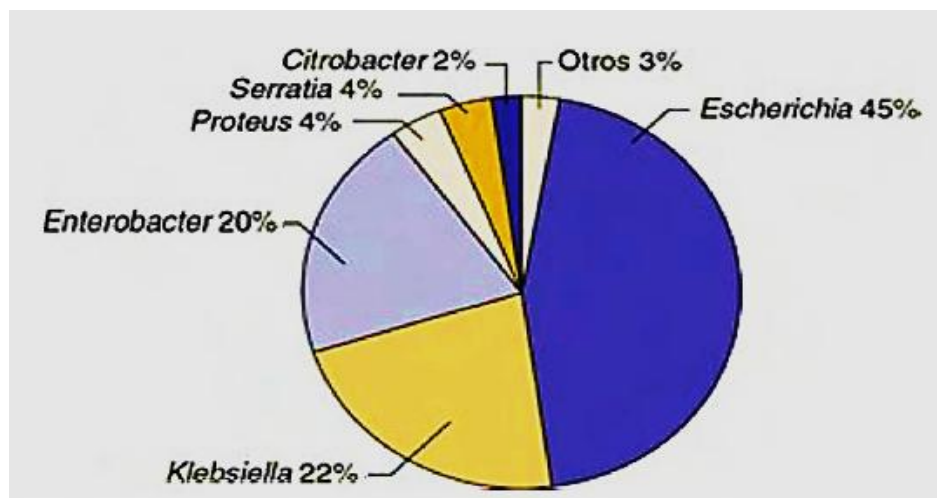
▪ ***E. coli* de adherencia difusa**

Las cepas de *E. coli*, de adherencia difusa, no forman microcolonias cuando se adhieren a células Hep-2. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad, pero se ha caracterizado una fimbria de superficie conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo 0126:H27, cuyos genes se han secuenciado, pero sólo se han encontrado en una minoría de las cepas aisladas. Al realizar ensayos in vitro en células CaCo y Hep-2, las cepas DAEC tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado in vivo. El grupo DAEC se puede aislar, tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos. La hibridación con sondas derivadas de un fragmento del gene *daaC*, que codifica para la fimbria F-1845, también se ha empleado para el diagnóstico pero puede presentar falsos positivos; en cambio, empleando la PCR aún no se ha desarrollado (Rodríguez, 2002).

➤ Epidemiología

En el tubo digestivo existen grandes cantidades de *E. coli*. Aunque estos microorganismos pueden comportarse como patógenos oportunistas cuando los intestinos se perforan y las bacterias acceden a la cavidad peritoneal, la mayor parte de *E. coli* que causan enfermedad digestiva y extraintestinal lo hacen porque han adquirido factores de virulencia específicos, codificados en plásmidos o en ADN de bacteriófagos. La eficacia de *E. coli*, como patógeno se ilustra por el hecho de que estas bacterias son 1) los bacilos Gram negativos que con más frecuencia se aíslan de pacientes con sepsis (Figura 9); 2) responsables de más del 80% de las ITU adquiridas en la comunidad y del mismo número de las infecciones hospitalarias, y 3) una causa destacada de gastroenteritis. La mayor parte de las infecciones (salvo la meningitis y la gastroenteritis neonatales) son endógenas, de modo que la *E. coli*, de la propia flora microbiana normal del paciente, consigue ocasionar infección cuando sus defensas se alteran (p. ej., a través de un traumatismo o supresión de la inmunidad) (Murray et al., 2013).

**Figura 9: Incidencia de enterobacterias que se asocian a bacteriemia**



**Fuente:** Murray et al., 2013

➤ Enfermedades clínicas

*E. coli*, está relacionado con muchas enfermedades entre ellas:

▪ Infección de vías urinarias (IVU)

*E. coli*, causa más del 90% de los más de 7 millones de casos de cistitis y de los más de 250 000 casos de pielonefritis, que se espera ocurran cada año en EUA, en individuos por lo demás sanos. Las IVU son mucho más frecuentes en mujeres, de las cuales el 40% tienen un episodio a lo largo de la vida, por lo común cuando tienen vida sexual activa. El reservorio para estas infecciones es la flora intestinal de *E. coli*, del propio paciente, la cual contamina la región perineal y uretral. En individuos con obstrucción o instrumentación de las vías urinarias, las fuentes de contaminación ambiental adquieren cierta importancia. Traumatismos hasta cierto punto menor o alteraciones mecánicas, pueden permitir que las bacterias

colonizan la región periuretral con acceso a la vejiga por periodos breves. Estas bacterias que originalmente se derivan de la flora fecal, con frecuencia están presentes en la vejiga de mujeres después del coito. En la mayor parte de los casos son eliminadas mediante la micción, pero pueden persistir dando origen a IVU, lo que depende de factores bacterianos y del hospedador. Las situaciones del hospedador que violan la integridad vesical (catéteres urinarios) o la obstrucción del flujo de orina (hipertrofia prostática), proporcionan más tiempo a las bacterias para su multiplicación, lo que causa la lesión. Sin embargo, la mayor parte de los casos de IVU ocurren en mujeres por lo demás sanas. En tal caso, son importantes los factores de virulencia bacteriana y *E. coli*, es el prototipo de patógeno para las infecciones de vías urinarias. Menos de 10 serotipos de la bacteria explican la mayor parte de los casos de IVU, y dichos serotipos no son los más comunes en la flora fecal. Estas cepas de *E. coli*, con incremento en el potencial para producir IVU se denominan *E. coli* uropática, (UPEC) (Ryan y Ray, 2011).

- Septicemia

De forma característica, la septicemia producida por los bacilos Gram negativos como *E. coli*, proviene de infecciones del aparato urinario o digestivo (p. ej., perforación gastrointestinal que provoca una infección

intraabdominal). La mortalidad que se asocia a la septicemia por dicha bacteria es elevada en pacientes cuya inmunidad está alterada, o en los que la infección primaria se localiza en el abdomen o en el sistema nervioso central (SNC) (Murray et al., 2013).

- Meningitis neonatal

*E. coli* y los estreptococos del grupo B causan la mayoría de las infecciones del SNC en los niños menores de 1 mes. Alrededor del 75% de las cepas de *E. coli* poseen el antígeno capsular K 1. Este serogrupo está habitualmente presente en el aparato digestivo de las mujeres embarazadas y de los recién nacidos. Sin embargo, no se conoce cuál es el mecanismo que gobierna la predilección de este serogrupo por la enfermedad en los neonatos (Murray et al., 2013).

- Gastroenteritis

Las cepas de *E. coli*, que provocan gastroenteritis se subdividen en los cinco principales grupos siguientes: *E. coli*, enterotoxigénica, enteropatógena, enteroagregativa, enterohemorrágica y enteroinvasiva. Los tres primeros ocasionan principalmente una diarrea secretora que afecta al intestino delgado, mientras que los dos últimos afectan, sobre todo, al intestino grueso (Murray et al., 2013).

### **2.2.3. Extracción del aceite esencial**

#### **2.2.3.1. Métodos de extracción: destilación por arrastre con vapor**

Es el método más utilizado para la extracción de aceites esenciales. Se genera vapor normalmente en un hervidor y luego se inyecta al destilador por donde pasa a través del material botánico. El principio básico de la destilación de dos líquidos heterogéneos, como el agua y un aceite esencial, es que cada uno ejerce su propia presión de vapor como si el otro componente estuviera ausente. Cuando las presiones de vapor combinadas alcanzan la presión del recinto, la mezcla hierve. Esta técnica es útil cuando la sustancia en cuestión a presión atmosférica, hierve por encima de los 100° C, y se descomponen en su punto de ebullición o por debajo de éste, logrando separar cantidades pequeñas que se encuentran en mezclas con grandes cantidades de sólidos, y en donde la destilación o la extracción son impracticables. En una mezcla binaria de líquidos completamente inmiscibles, cada componente ejerce su propia tensión de vapor, de manera que la presión total del sistema es la suma de las presiones parciales de ambos componentes (Michanie, 2003).

La composición del vapor, expresada en relación molar de los componentes x, y ( $N_x/N_y$ ), está relacionada con las presiones parciales  $P_x$ ,  $P_y$ , y con las cantidades relativas en peso de los líquidos que se recogen por destilación  $W_x, W_y$  (Neumayer y Cerutti, 2004).

### 2.2.3.2. Fundamento físico: Ley de Dalton

Los vapores saturados de los líquidos inmiscibles siguen la Ley de Dalton sobre las presiones parciales: "Cuando dos o más gases o vapores, que no reaccionan entre sí, se mezclan a temperatura constante, cada gas ejerce la misma presión que si estuviera solo, y la suma de las presiones de cada uno, es igual a la presión total (PT) del sistema". Su expresión matemática es la siguiente (Neumayer y Cerutti, 2004):

$$PT = P1 + P2 + \dots + Pn$$

Al destilar una mezcla de dos líquidos inmiscibles, su punto de ebullición será la temperatura en la cual la suma de las presiones de vapor es igual a la atmosférica. Esta temperatura será inferior al punto de ebullición del componente más volátil. Si uno de los líquidos es agua (extracción por arrastre con vapor de agua) y si se trabaja a la presión atmosférica, se podrá separar un componente de mayor punto de ebullición que el agua, a una temperatura inferior a 100°C. Esto es muy importante cuando el compuesto se descompone a su temperatura de ebullición o cerca de ella. En general, esta técnica se utiliza cuando los compuestos cumplen con las condiciones de ser volátiles, inmiscibles en agua, tener presión de vapor baja y punto de ebullición alto (Neumayer y Cerutti, 2004).

- Factores que influyen en la extracción por arrastre con vapor (Neumayer y Cerutti, 2004).

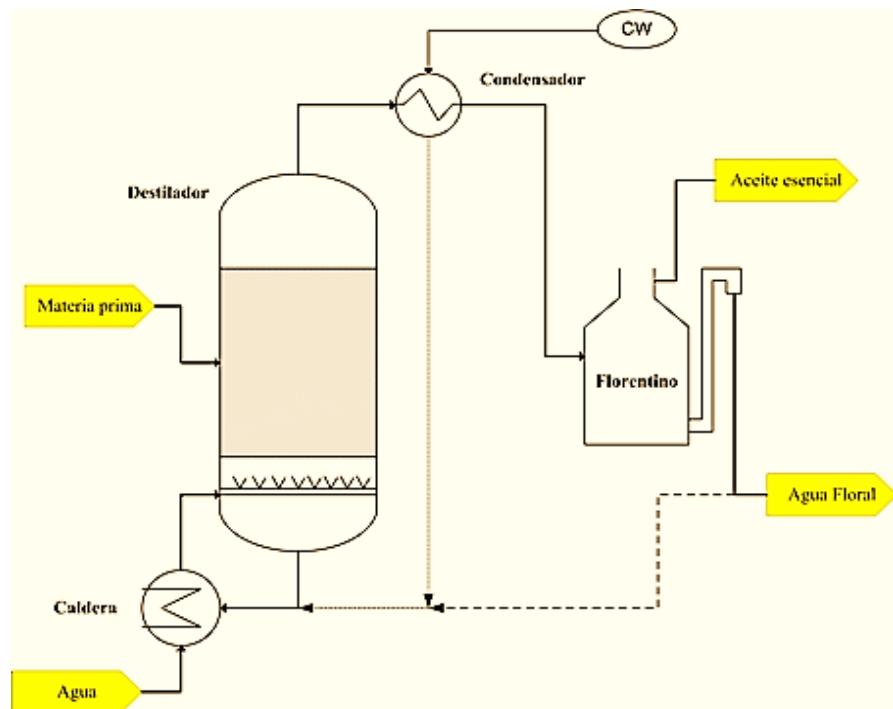
Los Factores que influyen en la extracción por arrastre con vapor son los siguientes:

- Tiempo de secado del material. La materia prima vegetal genera hongos que transfieren un olor terroso mohoso al aceite, debido a la formación de ácidos grasos; por esto si el material no se procesa pronto (3 días) se dispone en literas para su oreo.
- Tiempo de extracción. Pasado cierto tiempo ya no sale más aceite, y el vapor posterior causa el arrastre por solubilidad o emulsión del aceite, presentando una disminución en el rendimiento.
- Presión del vapor. Si la presión del vapor de arrastre es muy alta (máximo 6 psi), se presenta hidrólisis en el aceite, lo que disminuye su calidad y rendimiento.
- Factor de empaquetamiento. Si el material queda muy suelto, el proceso termina muy pronto, presentando un alto consumo energético; si queda muy apretado, el vapor se acanala disminuyendo el rendimiento del aceite, que debe de estar entre el 0.15 a 0.25 %.
- Condensación interior. Se evita realizando una purga previa a los 30 minutos de iniciado el proceso y, además, manteniendo el tanque bien aislado.
- Tiempo de residencia en el florentino. Sobre todo, si el diámetro es muy pequeño se produce arrastre del aceite.



- Material exhausto. El residuo se usa como compost, abonos, es celulosa hidrolizada.
- Distribución interior del vapor.
- Eficiencia del condensador.

**Figura 10: Estructura principal del destilador por arrastre con vapor.**



Fuente: Otarola, 2012

### 2.3. Marco conceptual

Sobre el aceite esencial de *Origanum vulgare* L "orégano", hay una buena cantidad de estudios que nos dan alcances sobre qué orégano presenta efecto antibacteriano; pero este efecto se puede ver afectado según el tiempo y modo de proceso desde su recolección hasta su extracción (Albado et al., 2001).

En cuanto a su actividad antimicrobiana, existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum*, presentan actividad contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Aligiannis et al., 2001).

Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol el más activo (Elgayyar et al., 2001).

Investigaciones similares, demuestran la acción antibacteriana de la familia de las labiadas, sin embargo, hay resultados contradictorios de los métodos utilizados en las evaluaciones de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, pudiéndose deber a las variaciones metodológicas y a los materiales empleados, señalando que puede deberse a diversos factores como la técnica de valoración, medio de crecimiento, microorganismos empleados y la composición química de los aceites esenciales (Albado et al., 2001).

#### **2.4. Definición de términos básicos**

- **Aceite esencial:**

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen

las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes) (Stashenko et al., 2003).

- **Cepa bacteriana**

Cepa es, en microbiología, una variante fenotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias (Murray et al., 2013).

- **Colonia bacteriana**

Una colonia bacteriana es una población de células que puede observarse macroscópicamente y que crece en un medio sólido, procedente de una sola célula (Murray et al., 2013).

- **In vitro**

Conjunto de fenómenos observados en el laboratorio a partir de productos biológicos vivos. Método para mantener en vida diversos organismos vivos (células, espermatozoides, óvulos, virus, etc.), en condiciones diferentes a las naturales, con técnicas de laboratorio (Murray et al., 2013).

- **Antimicrobiano**

Dícese de la sustancia que actúa contra microorganismos parásitos como bacterias, virus, u hongos, matando o inhibiendo su

---

crecimiento. Según el agente microbiano que ataca, se habla de antibiótico, antifúngico, antiviral, etc (Murray et al., 2013).

- **Refrigerante**

Es un aparato de laboratorio construido en vidrio, que se usa para condensar los vapores que se desprenden del matraz de destilación, por medio de un líquido refrigerante que circula por éste, usualmente agua (Iquimicas, 2014).

## CAPÍTULO III

### PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

#### 3.1.Hipótesis

- Hipótesis general

El aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano”, tiene efecto antibacteriano inhibiendo el crecimiento de las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, in vitro.

#### 3.2.Variables

- Variable independiente

Aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “Orégano”

- Variables dependientes

Crecimiento *in vitro* de las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

### 3.3. Definición operacional de variables

Variables	Definición conceptual	Indicadores	Instrumentos o medios
<p><b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b></p> <p>Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. "Orégano"</p>	<p>Aceites almacenados en hojas y tallos de <i>Origanum vulgare</i>, que poseen efecto inhibitorio del crecimiento de bacterias patógenas (Muñoz, 2002).</p>	<p>Fenoles, flavonoides, terpenos y alcoholes alifáticos.</p>	<p>Arrastre de vapor en el destilador de caldera de acero inoxidable.</p>
<p><b>VARIABLE DEPENDIENTE:</b></p> <p>Crecimiento <i>in vitro</i> de las cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p><i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>, microorganismos de la flora normal, que en ocasiones pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos (Murray Et al. 2002).</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Escherichia coli</i>: Gram (-).</li> <li>• <i>Staphylococcus aureus</i>: Gram (+).</li> </ul>	<p>Antibiograma.</p>

## CAPÍTULO IV

### MARCO METODOLÓGICO

#### 4.1. Unidad de análisis, universo y muestra

El universo estuvo conformado por todas las hojas de *Origanum vulgare* L. "Orégano", de donde extrajeron los aceites esenciales que tienen efecto antibacteriano sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, in vitro.

La muestra estuvo conformada por las hojas de *Origanum vulgare*, las cuales contienen dicho aceite. En total fueron utilizadas en este estudio 10 kilogramos de hojas.

- **Criterio de inclusión:** hojas enteras, exentas de microorganismos y en buenas condiciones.
- **Criterio de exclusión:** hojas picadas, secas, maltratadas o afectas con alguna enfermedad (hongos, bacterias, etc.).

#### 4.2. Procedimiento

##### 4.2.1. Obtención y preparación de la muestra vegetal:

- Se recolectaron las hojas de *Origanum vulgare* L. "Orégano", procedentes de la provincia de Cajamarca. Para este proceso de recolección se utilizaron guantes y tijeras.
- Se seleccionaron las hojas en buen estado, descartando aquellas que presentaron picaduras de insectos o plagas.

- Se lavaron con agua potable todas las hojas seleccionadas.
- Se pesaron 500 g de las hojas de orégano las que fueron puestas en el recipiente para la muestra y se colocaron 2 L de agua en el tanque generador de vapor; todo fue sometido a una temperatura aproximada de 110 °C por un tiempo de 4 horas aproximadamente. Posteriormente se acoplaron, tanto los tres componentes del equipo (resistencia, recipiente para la muestra y refrigerante), como dos mangueras en el refrigerante, una para el ingreso de agua y otra para el desfogue de la misma. El aceite esencial fue recepcionado en una pera de decantación.
- Transcurrido el tiempo de extracción, se agregó sulfato de sodio para atrapar los restos de agua. Se midió y se recogió el aceite esencial en frascos de color ámbar para evitar su desnaturalización.

#### **4.2.2. Determinación del efecto antibacteriano mediante el método de Kirby Bauer**

Fundamento del método de Kirby Bauer. El microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37 °C. Durante la incubación, el antibiótico se difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco.

En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área



de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R), de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos como por ejemplo, el Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards) (Instituto Nacional de Salud, 2000).

- Preparación del estándar (0.5 Mc Farland) para el inóculo (Instituto Nacional de Salud, 2000).
  - Para estandarizar la densidad del inóculo se utilizó una suspensión de sulfato de bario (0,5 de la escala de Mac Farland) como estándar. Para prepararlo, se agregaron 0,5 mL de una solución de  $\text{BaCl}_2$  0,048 M ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 1,175 % P/V) a 99,5 mL de una solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,18 M (0,36 N) (1 % V/V) en constante movimiento, para mantener la suspensión.
  - Se verificó la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro, cuya absorbancia a 625 nm es 0,08 a 0,10 para el estándar 0,5 de Mc. Farland. Se distribuyó de 4 mL a 6 mL en tubos con tapa de rosca o tapón de jebes, similares a los que se usaron para preparar el inóculo. Se ajustaron bien las tapas o tapones y se agitó vigorosamente, luego se comparó con la turbidez de las cepas inoculadas en el caldo Tripticasa Soya, y se verificó que la turbidez sea parecida.

- Preparación del Caldo tripticasa de soya.

Se pesaron 3 g de Caldo de tripticasa de soya los que fueron disueltos en 100 mL de agua destilada, luego colocamos el caldo en tubos con tapa rosca y los llevamos a autoclavar a 121 °C, entre 15 a 20 minutos (Instituto Nacional de Salud, 2000).

- Preparación del agar Mueller-Hinton (Instituto Nacional de Salud, 2000)

- Se pesaron 3,4 g de agar Mueller - Hinton que se los mezcló en 100 mL de agua destilada.
- Posteriormente se procedió a autoclavar y dejar enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45 °C-50 °C.
- Una vez esterilizado y solidificado, se midió el pH del Agar, obteniendo el valor de 7,4 a temperatura ambiente. Esta medición se realizó con el electrodo del potenciómetro.
- Se repartió el medio en placas petri (60mL-70mL para placas de 150 mm de diámetro interno), de manera que el grosor del agar en la placa sea de 4 mm.
- Se realizaron las pruebas de esterilidad, incubando dos placas a 35 °C durante 24 horas.
- Luego de comparar la turbidez de las cepas en el caldo Tripticasa Soya, y la esterilidad del medio de cultivo, se sembraron por agotamiento las cepas estandarizadas sobre las placas.

- Método de los discos de sensibilidad o de Kirby Bauer (Instituto Nacional de Salud, 2000).
  - Se depositaron 20  $\mu$ L de las diluciones al 10%, 50% y 100% sobre los discos de sensibilidad para analizar el efecto antibacteriano. Para obtener la disolución del 10% se hizo de siguiente manera; se tomó 1 mL del aceite esencial de orégano extraído y se agregó 9 mL de etanol de 96°. Para obtener la disolución del 50% se tomó 1 mL del aceite esencial de orégano extraído y se agregó 1 mL de etanol de 96°. Y para la concentración del 100%, se tomó 1 mL de aceite esencial y no se le agregó ningún otro componente.
  - Los discos embebidos con las diluciones de los aceites esenciales de las hojas de la especie vegetal, fueron colocados sobre la superficie de las placas sembradas con el inóculo bacteriano correspondiente, con la ayuda de una pinza estéril, presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar.
  - Se distribuyeron los discos uniformemente, de modo que estuvieron a una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud – OMS, debe ser de 6 mm), para evitar las superposición de las zonas de inhibición.
  - Se incubaron las placas a 35 °C durante 24 horas. Las pruebas se realizaron por triplicado y con un grupo control (etanol).

### **4.3. Lectura de las placas e interpretación de los resultados (Instituto Nacional de Salud, 2000).**

Las lecturas se realizaron a las 24 horas de iniciada la incubación de las placas. Para el método de los discos de sensibilidad, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla milimetrada. Se mantuvo iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada, localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro. Se tuvo la precaución de observar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto del paralelismo.

El punto final se tomó como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que pudo ser detectado mediante observación visual; no incluyó velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

Para el método de difusión en agar, la lectura fue medida según la presencia o ausencia del crecimiento de las cepas.

### **4.4. Técnicas de procesamiento y análisis de los datos**

Para el proceso y el análisis de los datos obtenidos, se utilizó el programa de SPSS de análisis estadístico, determinando la medida aritmética y desviación estándar de las variables cuantitativas y, a la vez, se realizó la comparación de los resultados obtenidos.

## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

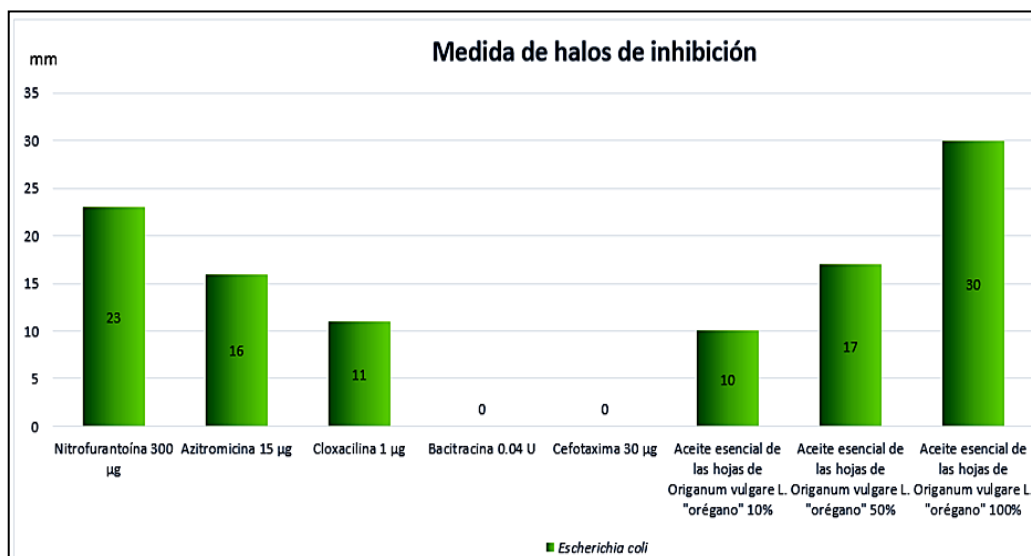
#### 5.1.Resultados del método de Kirby Bauer

Cuadro 1: Comparación de las medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", con los controles, sobre la cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922).

MEDIDA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN	
PROBLEMA	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
Aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" al 10 %	10 mm
Aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" al 50 %	17 mm
Aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" al 100 %	30 mm
CONTROLES	
Nitrofurantoina 300 µg	23 mm
Azitromicina 15 µg	16 mm
Cloxacilina 1 µg	11 mm
Bacitracina 0.04 U	0 mm
Cefotaxima 30 µg	0 mm

**Fuente:** Registro de resultados de la medida de los halos de inhibición elaborado por el tesista para el presente estudio.

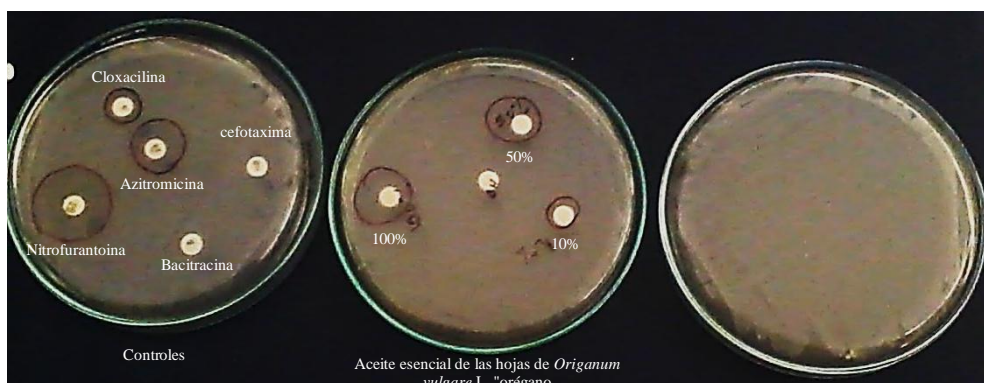
Gráfica 1: Medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", con los controles, sobre la cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922).



- ✓ Análisis estadístico según la prueba de Mann-Whitney para *Escherichia coli* (ATCC 25922).  
U de Mann-Whitney = 0.000  
p = 0.046, p < 0.05

Observamos que a mayor concentración del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", el halo de inhibición es mayor para la cepa de *Escherichia coli* (ATCC 25922), obteniendo mejores resultados de inhibición con las concentraciones de 100 %, en comparación con las concentraciones de los aceites esenciales al 10 % y 50 % y con los antibióticos usados como controles.

Fotografía 1: Halos de inhibición obtenidos con el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" y de los discos control, sobre *Escherichia coli* (ATCC 25922), por el método de los discos de sensibilidad o de Kirby Bauer

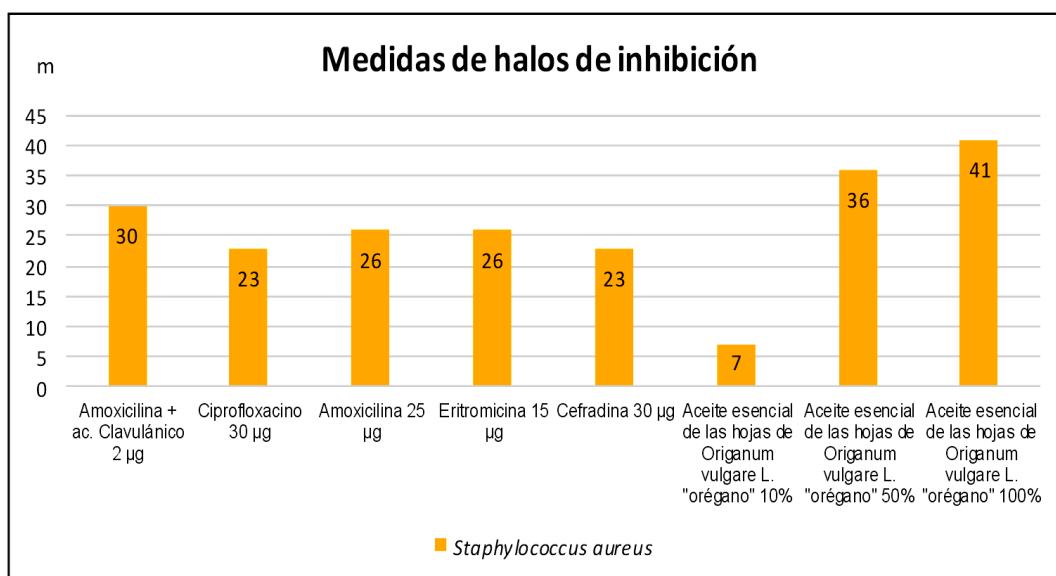


Cuadro 2: Comparación de las medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" con los controles, sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

<b>MEDIDA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN</b>	
<b>PROBLEMA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)
Aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". 10 %	7 mm
Aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". 50 %	36 mm
Aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". 100 %	41 mm
<b>CONTROLES</b>	
Amoxicilina + ac. clavulánico 2 µg	30 mm
Eritromicina 15 µg	26 mm
Ciprofloxacino	23 mm
Amoxicilina 25 µg	26 mm
Cefradina 30 µg	23 mm

**Fuente:** Registro de resultados de las medidas de los halos de inhibición elaborado por el tesista para el presente estudio.

Gráfica 2: Medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", con los controles, sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).



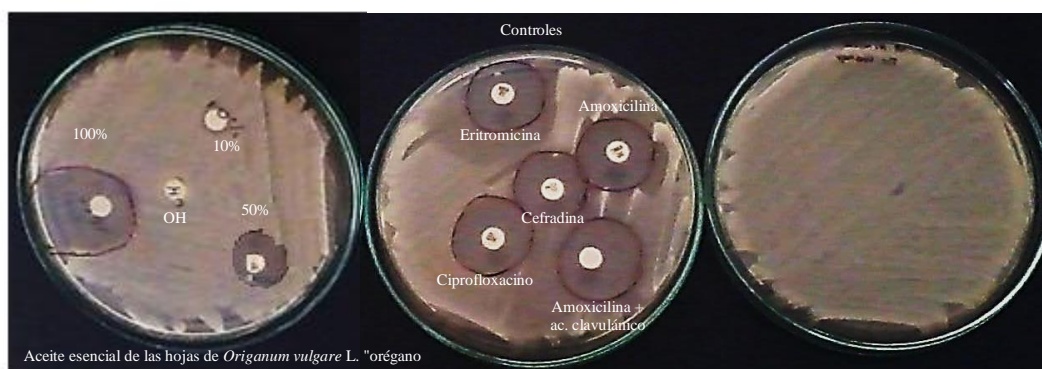
- ✓ Análisis estadístico según prueba de Mann-Whitney para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

U de Mann-Whitney = 0.000

p = 0.023, p < 0.05

Observamos que a mayores concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", el halo de inhibición es mayor para la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), obteniendo mejores resultados de inhibición a las concentraciones de 50 y 100 %, en comparación con los antibióticos usados.

Fotografía 2: Halos de inhibición del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), por el método de los discos de sensibilidad o de Kirby Bauer.



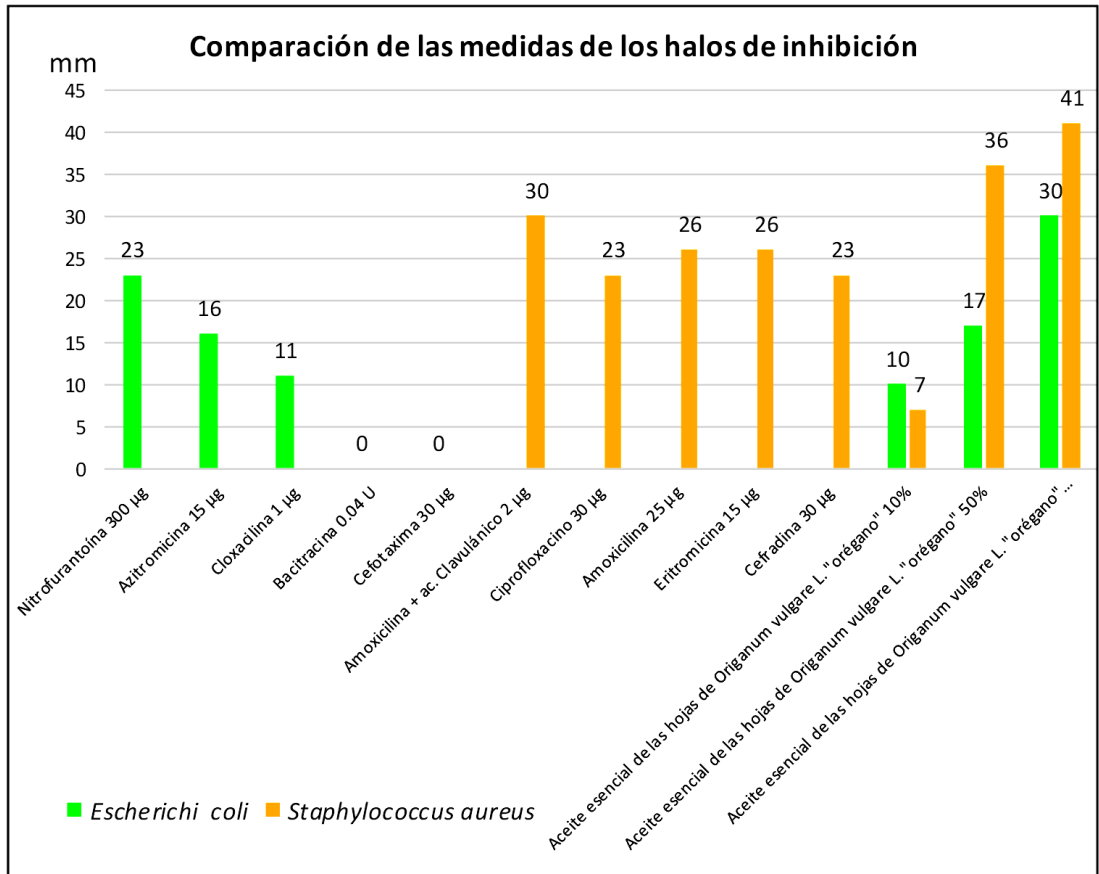


Cuadro 3: Comparación de las medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", con los discos control, sobre las cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

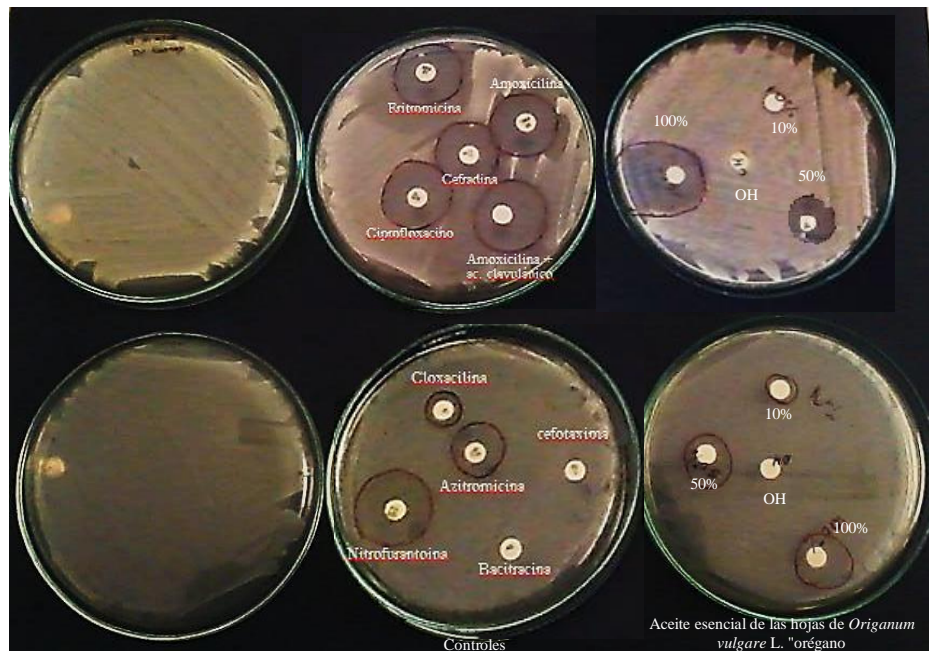
<b>MEDIDAS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN</b>		
<b>Cepa Bacteriana</b>	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)
<b>Aceite esencial y Antibiótico</b>		
Aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". 10 %	10 mm	7 mm
Aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". 50 %	17 mm	36 mm
Aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". 100 %	30 mm	41 mm
<b>CONTROLES</b>		
Nitrofurantoina 300 µg	23 mm	
Azitromicina 15 µg	16 mm	
Cloxacilina 1 µg	11 mm	
Bacitracina 0.04 U	0 mm	
Cefotaxima 30 µg	0 mm	
Amoxicilina + ac. clavulánico 2 µg		30 mm
Eritromicina 15 µg		26 mm
Ciprofloxacino		23 mm
Amoxicilina 25 µg		26 mm
CGD µg		23 mm

**Fuente:** Registro de resultados de las medidas de los halos de inhibición elaborado por el tesista para el presente estudio.

Gráfica 3: Comparación de las medidas de los halos de inhibición de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).



Fotografía 3: Halos de inhibición del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "Orégano" y disco control, sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25922), por el método de discos de sensibilidad.



## 5.2. Discusión

No cabe duda que en los últimos años, tanto *Staphylococcus aureus*, como *Escherichia coli*, se han convertido en dos de los microorganismos más involucrados en la larga lista de patologías infecciosas más difíciles de combatir. Ambas bacterias, con el paso de los años, han adoptado no solamente nuevas vías de contagio, sino también nuevas formas de defensa ante los antibióticos que comúnmente usamos (Etiopatogenia microbiológica, 2012).

Si bien el presente trabajo de investigación, es sobre el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano", sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, in vitro; la resistencia bacteriana es un problema que surge a partir de la adaptación de la bacteria al antibiótico, tras una mutación genética que la convierte en un enemigo cada vez más fuerte de combatir. La resistencia bacteriana ha suscitado un sinnúmero de investigaciones que justamente involucran la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para hacerles frente a microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En ese contexto, se espera que este aporte científico contribuya con dicha finalidad (Cano, 2007).

Sin lugar a duda, *Origanum vulgare* L. "orégano" es una especie vegetal con poderosas propiedades medicinales, de las cuales se destaca el hecho de que es un poderoso astringente. El aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" se obtuvo tras un proceso de Destilación en corriente de vapor, que aísla y separa los componentes oleosos de los acuosos, y concentra en especial a los aceites esenciales, cuya cantidad, si bien no es abundante,

pues, es suficiente para demostrar su poder frente a microorganismos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Barreto et al., 2006).

En la presente investigación se ha determinado la actividad antibacteriana del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", sobre cepas estandarizadas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) mediante el método de Kirby Bauer, dando como resultado la inhibición de la cepa *Escherichia coli*, observándose que a mayor concentración del aceite esencial, se obtiene que la mayor inhibición fue con la concentración de 100% como lo podemos ver en la tabla, el gráfico y la fotografía 01.

Resultados similares se observaron para la cepa *Staphylococcus aureus*, con la diferencia de que en esta cepa el aceite esencial de orégano al 100 % formó un halo de inhibición mucho mayor, como podemos observar en las tabla, gráfico y fotografía 02. Según la prueba estadística de Mann-Whitney también observamos que  $p = 0.023$ ,  $p < 0.05$ , lo que hace que el resultado sea altamente significativo. Estos resultados concuerdan con Gandra et al. (2013) en su estudio acerca del potencial antimicrobiano y antioxidante de extractos vegetales de romero, hinojo, estragón y orégano, en el que obtuvieron como resultado que *Origanum vulgare* L. "orégano" presenta efecto antibacteriano frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, posiblemente por la gran cantidades de compuestos fenólicos que presenta este vegetal.

Coelho et al., (2009) al estudiar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae), contra las cepas

multirresistentes bacterianas aisladas de pacientes nosocomiales, obtuvieron como resultado que el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. tiene efecto bactericida para microorganismos Gram positivos y Gram negativos; resultado similar al obtenido en el presente estudio y que lo podemos observar en la tabla, gráfico y fotografía 3 (Marino, 2001).

Una posible explicación del efecto inhibitorio observado en este estudio puede estar relacionado con los resultados obtenidos por Valero e Salmerón (2003), los que demostraron que el carvacrol es uno de los dos componentes que se encuentran en mayor cantidad en *Origanum vulgare*, y que este compuesto presenta elevada actividad antimicrobiana. El carvacrol presenta un punto de ebullición entre 234-236 ° C resistiendo bien a temperaturas de extracción en rotaevaporador. Debido a la gran cantidad de compuestos fenólicos, los cuales son poderosos antioxidantes y antimicrobianos, éstos posiblemente podrían ser capaces de disolver la membrana microbiana y penetrar en la célula. Por lo tanto, pueden alterar los mecanismos esenciales para el metabolismo microbiano, matando a las bacterias (Liu et al., 2002).

Otra posible explicación es la que refiere Chávez, et al., (2008) al estudiar el efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en cultivos de *Escherichia coli*, donde sus resultado dan a conocer que el aceite esencial de *Origanum vulgare* "orégano", tiene efecto antibacteriano contra *E. coli*, los cuales coinciden con los resultados obtenidos; además el estudio realizado por Chávez, et al.; demuestran que el posible efecto antibacteriano que presenta orégano es brindado por fitoconstituyentes denominados Carvacrol y Timol.

El mismo estudio dan a conocer que estos componentes tienen la capacidad de destruir la estructura de la membrana celular, causando el incremento de su permeabilidad y por consiguiente la salida de iones inorgánicos, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos, etc. Incluso, este estudio indica que el aceite esencial de *Origanum vulgare* tiene actividad antibacteriana contra otras bacterias Gram-negativas como: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella cholerae suis*, y *Vibrio cholerae* y las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, lo cual al ser comparado con los resultados obtenidos en este investigación concuerda claramente (Chávez et al., 2008).

Pesavento G et al., (2015) al estudiar la actividad antibacteriana del orégano, obtuvieron como resultado que el aceite esencial de orégano tiene efecto antibacteriano contra *S. aureus*.

Aligiannis et al., (2001) al estudiar la actividad del aceite esencial que presentan las especies de *Origanum*, demuestra que esta especie presenta efecto antimicrobiano contra Gram positivos y negativos, efecto que se le atribuye al carvacrol, principalmente.

Leite, et al., (2009) al estudiar efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en *S. aureus*, demuestra que este aceite afecta a la producción de enterotoxinas, permeabilidad de la membrana y de la superficie de *S. aureus*; ello conlleva a que el aceite esencial interfirió con las características fisiológicas y la morfogénesis microbiana en una manera dependiente de la dosis, además, el aceite conllevó a alguna alteración del fenotípico posiblemente surge debido a la prevención de la secreción de proteínas debido a cambios en la naturaleza física de la membrana citoplasma estafilocócica

causados por compuestos que se encuentran en el aceite esencial, esto completa y afianza los resultados obtenidos, ya que de este estudio se deduce que el aceite esencial de *Origanum vulgare*, tiene efecto contra Gram positivos y Gram negativos, lo cual se puede evidenciar en la tabla 2 y 3.

Otro aspecto que nos da Albado et al., (2001) sobre la actividad antibacteriana de *Origanum vulgare*, es que factores extrínsecos como el sembrado, tiempo de recolección del orégano y el método de extracción del aceite esencial, pueden conllevar que sus fitoconstituyentes puedan verse alteradas de una forma positiva o negativa, ya que según Albado et al.,(2001) da a conocer que todo lo mencionado anteriormente puede conllevar que la actividad antibacteriana sufra alguna alteración lo cual se puede observarse una diferencia en cuanto al diámetro de inhibición ya que el tipo de suelo, el tipo de sembrado pueden conllevar que hay más o menos fitoconstituyentes, ya que un terreno mal preparado y pobre en minerales puede conllevar que el orégano sembrado en ese lugar tenga una cantidad menor de carvacrol a comparación de un terreno bien sembrado y abonado. El transporte es otro factor que influye en la cantidad de fitoconstituyentes de una planta, ya que si se transporta en condiciones inadecuadas el orégano u otra especie vegetal conlleva que durante ese transcurso algunos fitoconstituyentes pueden alterarse por la luz solar, la humedad y el aire, lo que puede dar lugar a que los resultados varíen; además de lo mencionado, este estudio da a conocer que hay otros con resultados contradictorios de los métodos utilizados en las evaluaciones de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, pudiéndose deber a las variaciones metodológicas y de los materiales empleados, señalando que esto se debe a diversos factores como la técnica de

valoración, medio de crecimiento, microorganismos empleados y la composición química de los aceites esenciales. Todo esto acarrea que el halo de inhibición se vea en algunos casos de mayor tamaño que en otros, todo ello dependiendo de los métodos empleados; pero incluso con todos estos factores, la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Origanum vulgare* sigue demostrando efecto contra Gram positivos y Gram negativos (Albado et al., 2001).

Según la Tabla 1 y en el Gráfico 1 se demuestra que el aceite esencial sí presenta efecto contra *E. coli*; además de ello, se observa que al tiempo que el halo de inhibición va aumentando de tamaño, también va aumentando la concentración del aceite esencial, lo cual demuestra que el efecto antimicrobiano depende mucho de la concentración en que esté contenido el aceite esencial, ya que a mayor dosis mejor efecto antimicrobiano tiene. Lo mismo nos da a conocer la Tabla 2 y el Gráfico 2, que también demuestran que el aceite esencial de *Origanum vulgare*, tiene efecto antibacteriano contra *S. aureus*; e igual que el caso anterior se observa claramente que cuando aumenta la concentración del aceite, el efecto antimicrobiano va aumentando. Todo esto se puede observar en las Fotografías 1 y 2 respectivamente.

Al analizar la Tabla 3 y la Gráfica 3, en las que se comparan las medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", sobre las cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Claramente observamos cómo va aumentando de tamaño el halo de inhibición según aumenta la concentración del aceite esencial, y por otra parte, al



observar el tamaño de inhibición que presenta entre las dos bacterias, podemos determinar que el aceite esencial de *Origanum vulgare* L., es más eficaz contra *Staphylococcus aureus*, ya que presenta un halo de inhibición de 41mm a concentración del 100% es mayor a comparación con *Escherichia coli*, ya que el halo de inhibición que presenta este es solo es de 30mm a la misma concentración de aceite esencial, concluyendo que el aceite esencial presenta mejor efecto sobre bacterias Gram positivas que sobre bacterias Gram negativas.

Posiblemente el efecto se deba a que los aceites esenciales son más activos frente a bacterias Gram positivas, porque las bacterias Gram negativas presentan una superficie hidrófila en su membrana externa rica en moléculas de lipopolisacáridos, que impiden el ingreso de compuestos hidrófobos como monoterpenos y sesquiterpenos presentes en los aceites esenciales; en cambio en las bacterias Gram positivas no existe una cubierta de lipopolisacáridos en su membrana externa, que evita la difusión de los compuestos hidrófobos presentes en los aceites esenciales, de ahí que ejercen sus posibles mecanismos de acción antibacteriana en las bacterias Gram positivas como son: Desestabilizar el empaquetamiento de la bicapa lipídica, afecta la estabilidad estructural de la membrana a iones pequeños, pero según los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, las bacterias con que se ha trabajado aun no presentan resistencia bacteriana, y según todo lo mencionado puede ser contrastado con los estudios antes referidos. Solo para citar uno de ellos sería el de Albado et al., (2001), según el cual el aceite esencial de orégano aun presenta efecto antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus*, y la única bacteria que está presentando resistencia contra el aceite esencial de

*Origanum vulgare* L. "orégano", según la literatura es *P. aeruginosa*; además de ello como menciona este mismo autor junto con Leite et al., (2009), Alianni et al., (2001) y Pesavento et al., (2015) todos en sus respectivas investigaciones concluyen que el efecto antibacteriano es responsable a un fitoconstituyente denominado carvacrol. Al comparar el efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", con los antibióticos Nitrofurantoina, Azitromicina Cloxacilina, Bacitracina y Cefotaxima, utilizadas para *Escherichia coli* y, Amoxicilina + Ac. Clavulánico, Eritromicina, Ciprofloxacino, Amoxicilina y Cefradina para *Staphylococcus aureus*, podemos observar en las tablas, gráficos y fotografías 1, 2 y 3, que el aceite esencial a concentración de 100 % presentó mayor inhibición (halo de 30 mm) para *E.coli*, efecto antibacteriano mucho mayor que el de los antibióticos. Del mismo modo, podemos observar que para la cepa de *S. aureus* el aceite esencial a la concentración de 100 %, presenta una mayor inhibición (halo de 41 mm) que los antibióticos utilizados. Según los resultados obtenidos en la presente investigación, se demuestra que el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano", tiene efecto antibacteriano sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, in vitro.

## CONCLUSIONES

- Se demostró el efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "Orégano" en relación al crecimiento de las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, in vitro, dándonos a conocer que este aceite presentaría un efecto bacteriostático a nivel de bacterias Gram negativas, y cumpliría un efecto bacteriostático a nivel de bacterias Gram positivas.
- La concentración más efectiva del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "Orégano" contra *Escherichia coli* fue la del 100% in vitro, ya que presentó un halo de inhibición más amplio (30 mm), en comparación con otras disoluciones elaboradas (10% y 50%).
- La concentración más efectiva del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "Orégano" contra *Staphylococcus aureus* fue de 100% in vitro, ya que presentó un halo de inhibición más amplio (41 mm), en comparación con las otras disoluciones elaboradas (10% y 50%).
- Se comparó el efecto antibacteriano a las concentraciones de 10%, 50% y 100% del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "Orégano" in vitro, observándose que la concentración al 100% del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "Orégano", presentó la mayor inhibición sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 30 mm y 41 mm correspondientemente.

## RECOMENDACIONES

- Hacer una caracterización química del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* “orégano”, a fin de identificar específicamente los compuestos químicos correspondientes de su actividad antibacteriana, así como también las concentraciones presentes en las especies vegetales de cada uno de ellos.
- Diseñar estudios comparativos sobre el efecto antibacteriano de *Origanum vulgare L.* “orégano”, con otra especie vegetal.
- Fomentar la investigación en especies vegetales de la Región, para determinar el efecto antibacteriano, a fin de que se encuentren alternativas de tratamiento contra afecciones causadas por microorganismos patógenos.
- Dar a conocer los resultados preliminares de esta tesis como antecedentes para otros estudios relacionados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albado P, et al. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Rev Med Hered [online]. 2001, vol.12, n.1 [consultado el 20 de junio del 2014], pp. 16-19. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2001000100004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2001000100004&lng=es&nrm=iso). ISSN 1729-214X.
2. Algorta G, Schelotto F. Principales grupos de bacilos Gramnegativos no exigentes. En: Algorta G, Schelotto F, autores. Microbiología médica. 2ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 2008. pp. 315-38
3. Algorta G. Bacilos Gram negativos no exigentes Enterobacteriaceae, Vibrionaceae, *Pseudomonas*. [En línea] 2008 [accesado el 07 Mar. 2012] (2) [250 - 252]. Disponible en: [http://www.educa2.madrid.org/cms\\_tools/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b-4553dfefcd53/21.-%20Enterobacterias,%20Vibrios%20y%20Pseudomonas.pdf](http://www.educa2.madrid.org/cms_tools/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b-4553dfefcd53/21.-%20Enterobacterias,%20Vibrios%20y%20Pseudomonas.pdf)
4. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB, Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. J. Agric. Food Chem. 2001; 49: 4168-4170.
5. Araya A, Pavéz A, Valeria J, Vásquez M. Curso de agentes vivos de enfermedades más prevalentes *Staphylococcus aureus*, en Chile. Universidad Andrés Bello. [En línea] 2002 [Accesado el 11 Mar. 2012] Disponibles en: <http://staphylococcus-aureus-staphylococcus.blogspot.com/>
6. Arcila-Lozano C, Loarca-Piña G, Lecona-Urbe G, González DE Mejía E. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Rev. ALAN. [En línea] 2004 [Accesado el 05 Nov. 2011] 54 (1) [10p] Disponible en: [http://www.alanrevista.org/ediciones/20041/oregano\\_propiedades\\_composicion\\_actividad\\_biologica.asp](http://www.alanrevista.org/ediciones/20041/oregano_propiedades_composicion_actividad_biologica.asp)
7. Barreto G, Hernández R, Rodríguez M, Sanchén A. Diagnóstico de *Escherichia coli* enterohemorrágica en niños con diarreas. Revistas Científicas de América Latina. El Caribe [Internet]. España y Portugal. Redalyc. 2006; 10(3). [Accesado 14 de febrero de 2014]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/2111/211118136009.pdf>
8. Bastos M, et al. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. Revista Cubana de Plantas Medicinales. [En línea] 2011 [Accesado el 20 de Julio del 2014]. 16(3):260-266. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v16n3/pla06311.pdf>

9. Bonilla S. *Staphylococcus aureus*. [Archivo en formato PDF en línea]. México: Universidad Veracruzana. 2011. [Consultado: 15 de May. 2014]. Disponible en: <http://www.uv.mx/personal/sbonilla/files/2011/06/Staphylococcus-aureus.pdf>
10. Brooks G, Carroll K., Butel J, Morse S, Mietzner T. Bacilos Gram negativos entéricos (Enterobacteriaceae). En: Brooks G, Carroll K., Butel J, Morse S, Mietzner T, autores. Microbiología médica. 25ª ed. Santa Fe: McGraw-Hill Interamericana; 2010. pp. 213-26.
11. Bülent C, et al. The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. Tübitak [revista en Internet] 2011 May [Accesado el 15 de noviembre del 2014]; 1(35): 145-54 p. Disponible en: <http://dergipark.ulakbim.gov.tr/tbtkagriculture/article/viewFile/5000024675/5000024912>
12. Cano C. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* "muña" [tesis para optar el grado de Académico en Magister en recursos vegetales y terapéuticos]. Lima. Universidad Nacional de San Marcos; 2007. [Accesado 01 febrero 2014]. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=563959&indexSearch=ID>.
13. Castellano M., et al. *Staphylococcus aureus*: estado de portador en personal de enfermería y patrones de susceptibilidad antimicrobiana. Rev. Soc. Ven. Microbiol. [Revista en Internet]. Venezuela: Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, La Universidad del Zulia; 2005. [Accesado: 22 May. 2014]; 25(2): p. 72-78. Disponible en: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562005000200004&lng=es](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000200004&lng=es)
14. Cervantes E, García R, Salaza P. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab [revista en Internet]. 2014 Ene-Feb [accesado 28 de octubre del 2014]; 61(1): 28-40. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
15. Cetin B, Cakmakci S, Cakmakci R. The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. Tübitak. [En línea] 2011 [Accesado el 20 de Julio 2014]. 35 (2011) 145-154. Disponible en: <http://journals.tubitak.gov.tr/agriculture/issues/tar-11-35-2/tar-35-2-5-0906-162.pdf>
16. Chávez T, et al. Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. Cimel [Revista en internet] 2008 [accesado el 20 de Julio del 2014]; 13(2): 45-8 p. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articuloBasic.oa?id=71720916003>

17. Ciencias-medicas.com, *Escherichia coli* [sede Web]. Madrid: ciencias-medicas.com; 2011; [Accesado el 22 de noviembre del 2014]. Disponible en: <http://blog.ciencias-medicas.com/archives/1373>
18. Coelho et al. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) contra las cepas multirresistentes bacterianas aisladas de pacientes nosocomiales. Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy 19(1B): 236-241, Brasil. 2009.
19. Corella-Bernal R. Importancia del aceite esencial y la producción de Orégano (*Lippia palmeri* Watson) en el estado de Sonora. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora. A.P. 1819, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México. [En línea] 2013 [Accesado el 02 de Ago. 2014]. Disponible en: <http://www.biotecnia.uson.mx/revistas/articulos/229%20IMPORTANCIA%20DEL%20ACEITE%20ESENCIA.pdf>
20. De Falco, E et al. Composición Senatore F. química y la actividad biológica de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L. subsp. vulgare L. bajo diferentes condiciones de crecimiento. Moléculas [serie en Internet]. 2013 [Accesado 26 de julio 2014]; 18 (12): 14948 - 60. Disponible en: Academic Search Complete.
21. De la Cruz M, et al. Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlandieri schauer*) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *Vibrio* Revista Fitotecnológica Mexicana. [En línea]. 2011. [Accesado el 20 de Julio 2014]. Vol. 30 (3): 261 – 267. Disponible en: <http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/30-3/7a.pdf>
22. De Martino L, et al. Química y Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de Tres Quimiotipos de *Origanum vulgare* L. ssp. *Hirtum* Ietswaart Creciendo salvaje en Campania (sur de Italia). Moléculas [serie en Internet]. 2009 [Accesado 26 de mayo 2015]; 14 (8): 2735-2746. Disponible en: Academic Search Complete.
23. Elgayyar M, Draughon F., Golden DA, Mount JR. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. J. Food Protect. 2001; 64 (7): 1019-1024.
24. Etiopatogenia microbiológica. Género *Staphylococcus*. 2012. Temas de bacteriología y virología médica. Sesión III. Pág. 257. Consultado el: 11/03/2012. Disponible en URL: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/staphylococcus.pdf>
25. Fina B. Estrés oxidativo. [Archivo en formato PDF en línea]. Laboratorio de Biología Ósea y Metabolismo Mineral Facultad Cs. Médicas - UNR - Rosario – Argentina, 2009. [Consultado: 20 de Junio del 2014]. Disponible en: <http://www.biologiaosea.com.ar/files/seminarios/sem%20estres%20oxidativo.pdf>

26. Gandra et al. Potencial antimicrobiano y antioxidante de extractos vegetales de romero, hinojo, estragón y orégano. Rev. Cienc. Tecnol. N° 20. Pag. 24–29. Brasil. 2013.
27. Granados C, Yañez X, Et al. Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxylla* de Norte de Santander (Colombia). [Archivo on-line] Universidad de Cartagena, Facultad de Ingeniería, Programa de ingeniería de Alimentos, Bolívar – Colombia, 2013 [Consultado: 22 de Junio 2014] Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071807642014000300003&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071807642014000300003&script=sci_arttext)
28. Hernández E. 2010 “*Escherichia coli*” productores de blee aislados de urocultivo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento de la infección urinaria. Tesis Doct. Madrid. Univ. Complutense de Madrid. 177 p. Disponible en: <http://eprints.ucm.es/10442/1/T31499.pdf>
29. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión [sede web]. Lima: Ministerio de salud del Perú; 2000; [accesado el 25 de junio del 2014]. Disponible en: [http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/manua\\_1%20sensibilidad.pdf](http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/manua_1%20sensibilidad.pdf)
30. Iquimicas.com, Que es una cepa bacteriana [sede Web]. [s.l.]: iquimicas.com; 2014 [Accesado 19 de noviembre del 2014]. Disponible en: <http://iquimicas.com/que-es-una-cepa-bacteriana/>
31. Jerković I, Mastelić J, Milos M. The effect of air-drying on glycosidically bound volatiles from seasonally collected origano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) from Croatia. Pmid [revista en Internet] 2001 Feb [Accesado el 09 de noviembre del 2014]; 45(1): 47-9 p. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11253641>
32. Leite E, et al. Influencia del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. en la producción de enterotoxina, permeabilidad de la membrana y de la superficie características de *Staphylococcus aureus*. Elsevier. [Revista en internet] 2009 [accesado el 24 de Julio del 2014]; 137(2): 308-11 p. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509006199>
33. Liu B, Lengua L, Huapaya. C, Chauca. J. Evaluación de la Actividad Antibacteriana in vitro de los Extractos de *Caesalpinia spinosa* “tara” y *Eucalyptus* sp. “eucalipto. [Internet] 2002 [Accesado 26 noviembre 2013]. Disponible en: [http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2002/Art7\\_Vol2\\_N1-2.pdf](http://www.medicina.usmp.edu.pe/horizonte/2002/Art7_Vol2_N1-2.pdf)
34. Marino, M.; Bersani, C.; Comi, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. International Journal of Food Microbiology, 67(3): p. 187-195, 2001.



35. Michalis S, et al. La actividad antibacteriana de los aceites esenciales de plantas del género *Origanum*. Elsevier [Revista en internet] 2013 [accesado el 20 de Julio del 2014]; 34(2): 539-46 p. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513002739>
36. Michanie S. *Escherichia coli* La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne. Rev. Énfasis Aliment. [En línea] 2003 [accesado el 07 Mar. 2012] (03) [1-7p]. Disponible en: [http://bpm-haccp.com.ar/index\\_archivos/pdf/Escherichia-coli-O157-H7.pdf](http://bpm-haccp.com.ar/index_archivos/pdf/Escherichia-coli-O157-H7.pdf)
37. Muñoz L. Plantas medicinales: *Origanum vulgare* L.(Lamiaceae) "Oregano". Acta botánica Malacitana. Departamento de biología vegetal de la Universidad de Málaga. [En línea]. 2002 [Accesado 02 de Ago. 2014] Disponible en [http://www.biolveg.uma.es/abm/volumenes/vol27/27\\_munozcenteno.pdf](http://www.biolveg.uma.es/abm/volumenes/vol27/27_munozcenteno.pdf)
38. Muñoz M. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. 1ª ed. Cuba: Mundi-Prensa Libros: 1987
39. Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. Microbiología Médica. 4ª ed. Editorial Elsevier. España S.A. Barcelona- España. 2002.
40. Murray P, Rosenthal K, Pfäuer M. Enterobacteriaceae. En: Murray P, coordinador. Microbiología médica. 5ª ed. Madrid: Elsevier; 2009. pp. 323-38
41. Murray P, Rosenthal K, Pfäuer M. Enterobacteriaceae. En: Murray P, Rosenthal K, Pfäuer M, autores. Microbiología médica. 7ª ed. Barcelona: Elsevier; 2013. pp. 258-72
42. Neumayer F, Cerutti M. Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. Revista INVENIO, Facultad de Química de la Universidad del Centro Educativo Latinoamericano. Argentina [En línea] 2004 [Accesado el 20 de agosto del 2014] Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3331453.pdf>
43. Neves, D. O. Estudo farmacológico do timol e carvacrol sobre a contratibilidade da aorta isolada de rato. 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Instituto Superior de Ciências Biomédicas – Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza.
44. Nodarse R. visión actualizada de las infecciones intrahospitalarias. Rev Cub. Med Milit [En línea] 2002 [Accesado el 05 Mar. 2012] 31 (3) [201 – 8 p] Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v31n3/mil08302.pdf>
45. Organización Mundial de la Salud, *Escherichia coli* [sede Web]. Madrid: Organización mundial de la salud; 2010; [Accesado el 20 de noviembre del 2014]. Disponible en: [http://www.who.int/topics/escherichia\\_coli\\_infections/es/](http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/)

46. Otarola I. Extracción por arrastre con vapor: importancia y aplicación. Carrera de Ingeniería Industrial, Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba – Bolivia [En línea] 2012 [Accesado el 20 de agosto del 2014] Disponible en: <http://es.slideshare.net/RRALO/extraccion-por-arrastre-con-vapor>
47. Pesavento G, et al. La actividad antibacteriana de los aceites esenciales de orégano, Rosmarinus y Thymus contra *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* en albóndigas de carne Elsevier. [Revista en internet] 2015 [accesado el 24 de febrero del 2015]; 54(1): 188-99 p. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351500078X>
48. Plaus A, Saez E, Ataucusi G. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev Med Hered*, ene./mar. 2001, vol.12, no.1, p.16-19. ISSN 1018-130X. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2001000100004](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2001000100004)
49. Ramírez S. Orégano (*Origanum vulgare* L.) una alternativa de reconversión productiva para la mixteca poblana [tesis de Ingeniero Agrónomo administrador]. México: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Administración Agropecuaria; 2012.
50. Rodríguez G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Rev. Salud pública de México*. [En línea] 2002 [Accesado el 06 Mar. 2012] (44) [464 - 475 p]. Disponible en: <http://www.scielosp.org/pdf/spm/v44n5/14036.pdf>
51. Rodríguez G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública Méx* [revista en Internet]. 2002 Sep [accesado 12 denoviembre del 2014]; 44(5): 464-75. Disponible en: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0036-36342002000500011&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011&lng=es).
52. Ryan K, Ray G. Enterobacterias. En: Ryan K, Ray G, editores. *Sherris Microbiología Médica*. 5ª ed. Santa Fe: McGraw-Hill Interamericana; 2011. pp. 441-64.
53. Ryan K, Ray G. *Estafilococos*. En: Ryan K, Ray G, editores. *Sherris Microbiología Médica*. 5ª ed. Santa Fe: McGraw-Hill Interamericana; 2011. pp. 331-42.
54. Salamanca M., Sánchez M. Extracción y caracterización de la oleorresina del Orégano (*Origanum vulgare*). Trabajo de Grado. Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología. Escuela de Tecnología Química. [En línea] 2009 [Accesado 02 de Ago. 20014] Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1839/1/6650282S159.pdf>

55. Stashenko E, Jaramillo E, Martínez J. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. rev. acad. [En Línea] 2003 [Accesado el 06 Nov. 2011] (27) [580 – 595 p] Disponible en: [www.accefyn.org.co/revista/Vol\\_27/105/8-COMPARACION.pdf](http://www.accefyn.org.co/revista/Vol_27/105/8-COMPARACION.pdf)
56. Valero, M.; Salmeron, M.C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. International Journal of Food Microbiology. 85: p. 73-81, 2003.
57. Vásquez R. Sistemática de las plantas medicinales de uso frecuente en el área de Iquitos. Folia amazónica [revista en Internet] 1992 [Accesado el 15 de noviembre del 2014]; 4(1): 65-80 p. Disponible en: [http://www.iiap.org.pe/upload/publicacion/fofia4\\_1\\_articulo6.pdf](http://www.iiap.org.pe/upload/publicacion/fofia4_1_articulo6.pdf)
58. Villalobos L. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteroinvasiva en un producto cárnico. Rev. Cient. FCV-LUZ [En línea] 2003 [accesado el 06 Mar. 2012] (13) [7-11 p]. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/27908/2/articulo1.pdf>

# ANEXOS

**Anexo 1** Pesando los agares para su correspondiente preparación.



**Anexo 2:** Disolviendo los agares para poder servir y realizar las siembras correspondientes.



**Anexo 3:** Realizando el antibiograma para las cepas en estudio.



**Anexo 4:** Preparando las diluciones del aceite esencial del orégano.



**Anexo 5:** Colocando los discos embebidos con el aceite esencial de orégano, a las diferentes concentraciones.

