

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

“EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*) SOBRE CEPAS CERTIFICADAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*.”

“Documento Final del Proyecto de Investigación como requisito para obtener el grado de Médico Veterinario Zootecnista”

**AUTOR: EDWIN ANDRÉS LOPEZ RIVERA**

**TUTOR: DRA MAYRA MONTERO**

**CEVALLOS-ECUADOR**

2018

## DECLARACION DE ORIGINALIDAD

“El suscrito, EDWIN ANDRES LOPEZ RIVERA, portador de la cédula de identidad número: 180456495-1 libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*) SOBRE CEPAS CERTIFICADAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*.” es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indiquen las fuentes de información consultadas”.

.....  
EDWIN ANDRES LOPEZ RIVERA

C.I. 180456495-1

## DERECHOS DE AUTOR

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*) SOBRE CEPAS CERTIFICADAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*.” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él”.

.....  
EDWIN ANDRES LOPEZ RIVERA

C.I. 180456495-1

“EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*) SOBRE CEPAS CERTIFICADAS DE *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*.”

**REVISADO POR:**

.....

**Dra. Mayra Montero Mg.**

**TUTOR**

.....

**PhD. Diana Avilés**

**ASESOR DE BIOMETRÍA**

**APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:**

**FECHA**

.....

.....

**Ing. Mg. Hernán Zurita**

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

.....

.....

**Dr. Gerardo Kelly Mg.**

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

.....

.....

**PhD. William Calero.**

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN**

## ÍNDICE

<b>DECLARACION DE ORIGINALIDAD</b> .....	ii
<b>DERECHOS DE AUTOR</b> .....	iii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	viii
<b>RESUMEN</b> .....	ix
<b>SUMMARY</b> .....	x
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>INTRODUCCION</b> .....	1
<b>CAPÍTULO II</b> .....	3
<b>REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO</b> .....	3
<b>2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS</b> .....	3
<b>2.2. CATEGORARÍA FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL</b> .....	7
<b>2.2.1 ACEITES ESENCIALES</b> .....	7
<b>2.2.2 CEPAS BACTERIANAS</b> .....	9
<b>2.2.3 MEDIOS DE CULTIVO</b> .....	11
<b>2.2.4 MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD</b> .....	12
<b>2.2.5 Unidad de Análisis</b> .....	13
<b>CAPÍTULO III</b> .....	15
<b>3.1 HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>3.2 OBJETIVOS</b> .....	15
<b>3.2.1 Objetivo General</b> .....	15
<b>3.2.2. Objetivos Específicos</b> .....	15
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	16
<b>4.1 UBICACIÓN GEOGRÀFICA</b> .....	16
<b>4.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR</b> .....	16
<b>4.3 EQUIPOS Y MATERIALES</b> .....	16

4.3.1	Material Experimental .....	16
4.3.2	Agentes Biológicos.....	16
4.3.3	Equipos .....	16
4.3.4	Materiales de laboratorio.....	17
4.3.5	Sustancias o Reactivos .....	17
4.4	FACTORES DE ESTUDIO .....	18
4.5	TRATAMIENTOS.....	18
4.6	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	19
4.7	MANEJO DE LA INVESTIGACION .....	19
4.7.1	Obtención del material biológico.....	19
4.7.2	Obtención del material experimental.....	19
4.7.3	Elaboración de las concentraciones de aceite de orégano .....	19
4.7.4	Elaboración de medios de cultivo .....	20
4.7.5	Activación de las Cepas .....	20
4.7.6	Preparación de discos de sensibilidad.....	20
4.8	VARIABLES RESPUESTA.....	20
4.8.1	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) .....	20
4.8.2	Concentración Mínima Bactericida (CMB) .....	21
4.9	PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION.....	22
CAPÍTULO V .....		23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....		23
5.1	RESULTADOS .....	23
5.1.1	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) .....	23
5.1.2	Concentra Mínima Bactericida (CBM) .....	24
5.1.3	Prueba de difusión por disco.....	25
5.2	DISCUSIÓN .....	26
CAPÍTULO VI.....		29
CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFIA Y ANEXOS.....		29

<b>6.1 CONCLUSIONES</b> .....	29
<b>6.2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	30
<b>6.3 ANEXOS</b> .....	38
<b>CAPÍTULO VII</b> .....	43
<b>PROPUESTA</b> .....	43
<b>7.1. DATOS INFORMATIVOS</b> .....	43
<b>7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA</b> .....	43
<b>7.3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	43
<b>7.4. OBJETIVOS</b> .....	43
<b>7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD</b> .....	44
<b>7.6. FUNDAMENTACIÓN</b> .....	44
<b>7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO</b> .....	44
<b>7.8. ADMINISTRACIÓN</b> .....	44
<b>7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN</b> .....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones meteorológicas .....	16
Tabla 2 Cepas y concentraciones respectivas del orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ).....	18
Tabla 3. Número de tratamientos y repeticiones para <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> subsp <i>aureus</i> . .....	19
Tabla 4. Concentraciones del aceite esencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ).....	20
Tabla 5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) sobre la cepa bacteriana <i>Escherichia coli</i> . .....	23
Tabla 6. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) sobre la cepa bacteriana <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	23
Tabla 7. Determinación de la Concentración Minina Bactericida (CBM) del aceite esencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) sobre la cepa bacteriana <i>Escherichia coli</i> . .....	24
Tabla 8. Determinación de la Concentración Minina Bactericida (CBM) del aceite esencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) sobre la cepa bacteriana <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	24
Tabla 9. Determinación de la sensibilidad bacteriana (mm) del aceite de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ) frente a las cepas <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> .....	25



## RESUMEN

El Proyecto de investigación tuvo como objetivo evaluar *in vitro* el efecto antimicrobiano del aceite de orégano (*Origanum vulgare*) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* subespecie *aureus*, en el cual se evaluaron concentraciones al 30%, 60% y 90% en dilución de aceite de orégano más tween 80. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria, para la cepa *Escherichia coli*, donde presentó turbidez al 30% en todas sus horas establecidas, mientras que al 60 % y 90% no presentó turbidez, por otro lado, para la cepa *Staphylococcus aureus*, no se presentó turbidez en ninguna de sus concentraciones; por otra parte se determinó la Concentración Mínima Bactericida sobre la cepa *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, donde la cepa *Escherichia coli* al 30% presentó formación de colonias en todos sus tiempos establecidos, mientras que al 60% y 90% no existió crecimiento bacteriano; por otro lado para la cepa *Staphylococcus aureus*, no existió crecimiento bacteriano en ninguna de las tres concentraciones. En cuanto a los halos de sensibilidad en la cepa *Escherichia coli* se obtuvo como valor mínimo un diámetro de 13.01mm al 30% y un valor máximo de 17.62mm al 60% respectivamente, determinando que el aceite de orégano impide el crecimiento de bacterias desde su valor mínimo al 30%, por otro lado, en la cepa *Staphylococcus aureus* se obtuvo un valor mínimo de 13.25mm a una concentración de 30% y un valor máximo de 25mm al 90%. En el análisis de varianza los resultados obtenidos en los tratamientos al 60% y 90%, no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) mostrándose estadísticamente iguales con valores de 17.62 mm y 16.05 mm respectivamente, en relación al 30% con un valor de 13.01 mm en halos de inhibición para la cepa *Escherichia coli*, mientras que las diluciones de los tratamientos al 30%, 60% y 90% frente a la cepa *Staphylococcus aureus* son estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ) con valores de 13.25 mm, 16.35 mm y 25.00mm de halos de inhibición.

**Palabras claves:** Concentración Mínima Inhibitoria, Concentración Mínima Bactericida, Muller Hinton, Aceite de orégano.

## SUMMARY

The objective of the research project was to evaluate *in vitro* the antimicrobial effect of oil of oregano (*Origanum vulgare*) on strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, in which concentrations of 30%, 60% and 90% were evaluated in dilution of oregano plus tween 80 oil. The Minimum Inhibitory Concentration was determined for the *Escherichia coli* strain, where turbidity was present at 30% in all its established hours, while at 60% and 90% it did not present turbidity, on the other hand, for the strain *Staphylococcus aureus*, no turbidity was present in any of its concentrations; The Bactericidal Minimum Concentration was also determined on the strain *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, where the 30% *Escherichia coli* strain presented colony formation at all established times, while at 60% and 90% there was no bacterial growth; On the other hand, for the strain *Staphylococcus aureus*, there was no bacterial growth in any of the three concentrations. Regarding the sensitivity halos in the *Escherichia coli* strain, a minimum diameter of 13.01mm at 30% and a maximum value of 17.62mm at 60% was obtained, determining that the oil of oregano prevents the growth of bacteria from its minimum value at 30%, on the other hand, in the *Staphylococcus aureus* strain, a minimum value of 13.25mm was obtained at a concentration of 30% and a maximum value of 25mm at 90%. In the analysis of variance the results obtained in the treatments at 60% and 90%, are not significantly different ( $p = <0.05$ ), being statistically equal with values of 17.62 mm and 16.05 mm respectively, in relation to 30% with a value of 13.01 mm in halos of inhibition for the strain *Escherichia coli*, while the dilutions of the treatments at 30%, 60% and 90% against the strain *Staphylococcus aureus* are statistically different ( $p = <0.05$ ) with values of 13.25 mm, 16.35 mm and 25.00mm of inhibition halos.

Key words: Minimal Inhibitory Concentration, Bactericidal Minimum Concentration, Muller Hinton, Oregano oil.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCION

Dentro de los temas más preocupantes para la comunidad científica, tanto para Medicina Humana y Veterinaria es el constante brote altamente mutagénico y peligroso que presentan algunas cepas bacterianas a uno o más antibacterianos, lo cual constituye un problema de salud pública a nivel mundial (OMS, 2001 citado por Cruz-Carrillo *et al.*, 2010). La resistencia antimicrobiana, es uno de los principales problemas dentro de la salud pública, afectando a varios países con un impacto negativo en el control de enfermedades bacterianas, generando problemas en humanos como en la producción animal, según la OMS los animales en producción son un reservorio de bacterias resistentes, que pueden transmitirse a la población humana constituyendo un problema zoonótico (San Martín *et al.*, 2005). A pesar de que las industrias farmacológicas han producido nuevos antibióticos en las últimas décadas, la resistencia a estos fármacos por parte de los microorganismos ha aumentado, en general, las bacterias poseen una capacidad genética de transmitir y adquirir resistencia a los fármacos, que se utilizan como agentes terapéuticos (Nascimento *et al.*, 2000). En respuesta a la necesidad de conseguir alternativas eficaces contra la resistencia antimicrobiana por parte del microorganismo, se ha recurrido a la fitoquímica y fitofarmacológica. (Ávila *et al.*, 2006). Existe un gran número de sustancias naturales que poseen alguna actividad frente a microorganismos, para lo cual se ha propuesto la utilización de compuestos o sustancias naturales para el tratamiento de enfermedades bacterianas como una alternativa natural (Domingo & López 2003), con la utilización de plantas como el tomillo, la menta, el orégano, etc.

El orégano (*Origanum vulgare*) es una planta que se encuentra distribuida en áreas de Asia y el mediterráneo, la cual pertenece a la familia Lamiaceae. La planta de orégano presenta diversas actividades biológicas con acción antiséptica, expectorante, carminativa y antiespasmódica (De Souza Prestes *et al.*, 2008). El orégano es una planta que tiene una variedad de aplicaciones en diversos ámbitos (Guerra 2009), esto se debe gracias a su aceite extraído de sus hojas, el orégano y sus derivados se han estudiado por tener efectos antimicrobianos, en particular este efecto se le atribuye a los compuestos carvacrol y timol

los mismos que actúan en la inhibición de microorganismos patógenos presentes en el aceite de orégano (Paredes, 2007).

En la actualidad el uso de aceites esenciales y extractos vegetales como bactericidas han cobrado mayor importancia (García *et al.*, 2006). Los aceites esenciales son mezclas homogéneas de sustancias orgánicas que provienen de una misma familia de terpenos y sus compuestos oxigenados, algunos aceites como el aceite de orégano que presentan propiedades antimicrobianas (Castaño, 2012). Dentro del grupo de aceites con propiedades antimicrobianas destaca el aceite esencial de orégano (AEO). De acuerdo con Burt (2004), el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano se debe principalmente a la presencia de metabolitos secundarios como el carvacrol y timol y, en menor grado, -terpineno y p-cimeno. La actividad antimicrobiana de estos aceites esenciales se ha atribuido a la presencia de compuestos aromáticos y grupos fenólicos como el eugenol en el aceite esencial de canela y el carvacrol en el aceite esencial de orégano (García *et al.*, 2006). Estos grupos fenólicos dañan la integridad de la membrana celular de las bacterias afectando la homeostasis y el equilibrio de los iones inorgánicos (Gámez *et al.*, 2015).

La presente investigación se la realizó con el fin de comprobar la eficacia antimicrobiana *in vitro* del aceite de orégano (*Origanum vulgare*) en distintas concentraciones sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

#### 2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Según Pereira et al., 2008, los aceites esenciales, extraídos de los vegetales por arrastre de vapor de agua u otras técnicas, son compuestos de gran importancia en investigaciones, por ser potencialmente útiles en el control fitosanitario, propiciando el desarrollo de técnicas que buscan disminuir los efectos negativos de oxidantes, radicales y microorganismos causantes de perjuicios en las industrias alimenticias, por lo tanto, la fitoquímica se presenta como un método útil, buscando técnicas analíticas e instrumentales que permiten el aislamiento y elucidación de innumerables compuestos.

Daouk et al., (1995), menciona que el aceite y extracto de distintas plantas han sido utilizados para una diversidad de propósitos por miles de años, esto se debe a su actividad antimicrobiana, siendo incluidos en ámbitos farmacológicos y tratamientos medicinales naturales. Esta propiedad fue estudiada por (Castaño, 2012), quien señalan que el aceite esencial de diversas plantas, entre las que se encontraban el *Origanum vulgare*, poseen actividad antimicrobiana frente a microorganismos, determinando que el orégano (*O. vulgare*) posee propiedades antioxidantes, antifúngicas, antiespasmódicas, antisépticas, y sobre todo se caracteriza por la potente acción de sus principios activos carvacrol y timol que le otorgan a esta planta un gran poder antibacteriano.

Abu-shanab (2004), comenta que el aceite de orégano posee una capacidad muy efectiva como antiséptico natural. Este compuesto elimina bacterias, hongos, parásitos y virus con tan solo unas pocas gotas y no ocasiona efectos secundarios ni potencia mutaciones que dan lugar a cepas patológicas resistentes, como ocurre con los antibióticos farmacológicos. El aceite de orégano posee un compuesto fenólico, carvacrol, este fenol se encuentra en la planta de orégano (*Origanum vulgare*) en concentraciones que oscilan del 30 al 87 por ciento, un alto porcentaje de carvacrol obtenido por destilación no implica mayor efectividad terapéutica, pues esta procede de la delicada sinergia creada por la

naturaleza y en la que intervienen otros componentes del orégano; obteniendo que el carvacrol puro es la mitad de efectivo que el aceite de orégano natural.

Según Albado et al., (2001), confirma que el aceite esencial del orégano, tiene efectos antimicrobianos frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* no muestra sensibilidad frente al aceite esencial de orégano.

Russo et al., (1998), comenta que existe un aumento en el uso de extractos naturales como una alternativa para la prevención y tratamiento de enfermedades; esto ha revelado que el orégano tiene un alto efecto bacteriano. Los aceites esenciales del orégano son también inhibidores de la mutagenicidad, lo cual ha despertado el interés por este tipo de plantas, como posible tratamiento de enfermedades; por otro lado, el extracto de orégano puede funcionar como antibactericida e insecticida, siendo igual o incluso más efectivo que los compuestos típicamente utilizados para estos propósitos.

Según Ávila et al., (2010), se ha demostrado que una de las especias que tiene efecto antimicrobiano es el aceite de orégano, teniendo la capacidad de inhibir el crecimiento de numerosas bacterias patógenas dicha actividad es debe, principalmente, a que sus aceites esenciales contienen compuestos volátiles, especialmente timol y carvacrol cuyo efecto antimicrobiano fue comprobado en el orégano.

Wayne (2015), menciona que la actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de orégano fueron determinados mediante la susceptibilidad antimicrobiana por el método de difusión en placa y la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) por microdilución en caldo, los cuales fueron llevados a cabo teniendo en cuenta los estándares de la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) M2-A7 y NCCLS M 27-A2 respectivamente.

Según Acevedo (2007), la composición química que presenta el aceite esencial de orégano pertenece al quimiotipo Timol, el cual es un efectivo agente antimicrobiano que

inhibe el crecimiento de microorganismos y bacterias y también forma parte de muchos productos antiinflamatorios por sus propiedades, antibacterianas y antifúngicas.

De Souza Prestes et al. (2008) Realizaron un estudio para determinar la actividad de extractos de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) frente a microorganismos asociados con otitis externa. La evaluación de los extractos fue realizada a través de microdiluciones en caldo frente a aislados de *Malassezia pachydermatis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, se evaluaron 3 extractos un aceite, una tintura y una decocción. Los aceites presentaron concentración inhibitoria mínima menor frente a los microorganismos, pero los extractos que presentaron mejor rendimiento fueron las tinturas.

Daferera (2003), menciona que los aceites esenciales de orégano, tomillo, lavanda, romero, fueron probados para conocer su eficiencia de control contra *Botritis cinerea*, *Fusarium sp.* *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*, en medios artificiales del crecimiento, obteniendo como resultado que el crecimiento de *Botritis cinerea*, *Fusarium sp* y de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* fue inhibido totalmente por los aceites esenciales del orégano y tomillo en bajas concentraciones (85-300 µg/ml), teniendo como componente principal del aceite de orégano el timol aceite, mientras que el aceite de tomillo, era rico en carvacrol.

Según Nostro (2007), se demostró que la actividad antimicrobiana del orégano se debe a los componentes fenólicos, carvacrol y timol, los cuales actúan debido a su naturaleza hidrófoba, sobre la bicapa lipídica de las membranas citoplasmáticas provocando la pérdida de su integridad y, a través de ella, fugas de material celular tales como iones, ATP y ácido nucleico.

Ultee et al., (1998), comenta que las sustancias activas presentes en el aceite de orégano se encuentran diversos compuestos fenólicos como es el caso del carvacrol y el timol que poseen actividad antimicrobiana y antifúngica, estos compuestos han sido probados en diferentes microorganismos de importancia en alimentos como, por ejemplo, *Fusarium*

*spp. Escherichia coli, Salmonella thiphymurium, Staphylococcus aureus, Bacillus*, entre otros.

Lambert et al., (2001) menciona que los componentes de los aceites esenciales, como el timol, carvacrol y eugenol, los cuales son compuestos fenólicos, poseen fuertes propiedades antimicrobianas contra diversos microorganismos, lo cual es razonable pensar que su mecanismo de acción es similar al de otros compuestos fenólicos, provocando desorden en la membrana citoplasmática.

Vokou et al., (1993), menciona que la sensibilidad bacteriana observada en los 14 terpenoides estudiados poseen actividad antimicrobiana contra alguna de las bacterias ensayadas y tan solo 3 de ellos (  $\alpha$ -terpineno, para-cimeno y mirceno) manifiestan no tener actividad alguna sobre las bacterias estudiadas; estos resultados pueden traducirse en que el 82% de los compuestos probados constituyen una potencial fuente de agentes antimicrobianos, destacándose que los terpenoides presentan mayor actividad sobre la bacteria *Escherichia coli*.

Aligiannis et al., (2001), menciona que 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*, tienen además capacidad antifúngica contra *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*, tienen además capacidad antifúngica contra *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Niger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomona aeruginosa*, evaluaron 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 más activo, dentro de los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los aceites esenciales se establecieron entre 0.28-1.27 mg/ml para bacterias.



Según Winward et al., (2008), el *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris*, no produjeron un efecto inhibitorio sobre *C. perfringens*; luego estudios realizados demostraron que el aceite esencial de estas especias, tienen efecto sobre bacterias entéricas tales como *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *C. perfringens* y *C. botulinum* produciendo halos de inhibición que oscilan entre 7 a 24mm.

Según Oliveira et al., (2009), se han demostrado las propiedades antimicrobianas que posee el aceite esencial de orégano, uno de ellos realizado en cepas de pacientes con conjuntivitis, demostró que el aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) causan un significativo efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano; con un halo de inhibición entre 27 a 32mm respectivamente para *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* y *Klebsiella*.

Burt & Reinder (2003), prueban la actividad antibacteriana de cinco aceites esenciales mediante la prueba de difusión en agar contra *Escherichia coli* y obtuvieron que el aceite de orégano es efectivo contra esta bacteria con 24mm de diámetro en el halo de inhibición; por otro lado, (Bayramoglu et al., 2008), encuentra resultados similares al utilizar aceite de orégano contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* utilizando la misma técnica obteniendo halos de inhibición de 40 y 45mm de diámetro, respectivamente; la diferencia entre los halos de inhibición obtenidos tanto por Burt como por Bayramoglu, radica en las concentraciones utilizadas ya que en el primer trabajo se utilizó el aceite esencial al 1%, mientras que en el segundo al 2%.

## **2.2. CATEGORÍA FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL**

### **2.2.1 ACEITES ESENCIALES**

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de líquidos que presentan alta volatilidad, evaporándose al contacto con el aire (Bello, 1999). Son obtenidos a partir de diferentes partes de las plantas como flores, yemas, semillas, hojas, ramas, corteza, hierbas, madera, frutos y raíces (Burt, 2007). Químicamente están formados por terpenos, monoterpenos y sesquiterpenos (hidrocarburos, alcoholes, cetonas, que pueden ser acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos), sustancias azufradas y nitrogenadas

(Acevedo *et al.*, 2007). Se consideran producto del metabolismo secundario de las plantas al igual que algunos alcaloides, flavonoides, taninos, y saponinas (Bandoni *et al.*, 2009; Madsen & Bertelsen 1995). La composición química de los AE puede verse afectada por el medio ambiente, la procedencia de la planta y el método de extracción (Combariza *et al.*, 1994). El valor económico de los AE y su aplicabilidad industrial están directamente relacionados con su composición química y con la actividad biológica (Stashenko *et al.*, 2010). De hecho, muchos autores han reportado propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes de diferentes especias y aceites esenciales y en algunos casos, una aplicación directamente relacionada con los alimentos (Madsen & Bertelsen, 1995).

## **ORÉGANO (*Origanum vulgare*)**

- **Descripción Botánica**

El orégano (*Origanum vulgare*), pertenece a la familia *Labiaceae*, y es una planta herbácea vivaz muy aromática (Carhuapoma, 2006; Arcila-Lozano, *et al.*, 2004; D'Antuono, *et al.*, 2000). Se ha demostrado que el orégano contiene aceites esenciales, por lo que no solo es benéfico para la salud humana, sino que además puede sustituir los aditivos sintéticos de los alimentos (Arcila-Lozano *et al.* 2004). El AE de orégano tiene actividad antiradicalaria y esta propiedad se les atribuye a los monofenoles carvacrol y timol principales quimiotipos, cada una con enzimas específicas que dirigen su biosíntesis (D'Antuono *et al.*, 2000).

- **Clasificación Taxonómica del Orégano**

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Origanum*

Especie: *Origanum vulgare*

- **Composición Química**

Sobre la composición química del orégano, y sus aceites esenciales se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano (Arcila-Lozano *et al.*, 2004), también se han encontrado ácidos coumérico, ferúlico, caféico, r-hidroxibenzóico y vainillínico (D'Antuono *et al.*, 2000). En el aceite de orégano que crece en forma silvestre se ha observado que un incremento en los porcentajes de timol provoca una disminución en el contenido de carvacrol (Albado *et al.*, 2001).

- **Mecanismo de acción**

La composición química que presenta el aceite esencial de orégano pertenece al quimiotipo Timol, el cual es un efectivo agente antimicrobiano (Acevedo, 2007), teniendo en cuenta que el mecanismo de acción del timol es semejante al del carvacrol, ya que su estructura química es similar; el timol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Healender *et al.*, 1998).

Juven *et al.*, (1994) estudiaron el mecanismo de acción del timol contra *S. thiphymurium* y *S aureus*, concluyendo que este agente antimicrobiano une las proteínas hidrofóbicas de la membrana mediante puentes de hidrógeno, cambiando a las características de permeabilidad de la misma. (Lambert *et al.*, 2001), señalaron que el timol cambia la permeabilidad de la membrana de la célula microbiana, dejando que se filtren los constituyentes químicos esenciales para el metabolismo tales como iones, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos, estos efectos provocan una disminución en la carga celular total.

## **2.2.2 CEPAS BACTERIANAS**

### ***Escherichia coli***

La *Escherichia coli* es una bacteria que se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales de sangre caliente, debido a su elevada presencia en el tracto gastrointestinal y en las heces, la *E. coli* se utiliza como el indicador principal de contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad de los alimentos y el agua; la mayoría de las *E. coli* son organismos comensales inofensivos cuando se encuentran en su hábitat intestinal natural, las *E. coli* patógenas se distinguen de otras *E.*

*coli* por su capacidad de provocar enfermedades mediante mecanismos genéticamente controlados, como la producción de toxinas, la adhesión e invasión de células huésped, la interferencia con el metabolismo celular y la destrucción de tejidos (Estape, 2012).

- **Características microbiológicas**

La bacteria *Escherichia coli* se caracteriza por ser un bacilo Gram negativos, no esporulante, producción de indol a partir de triptófano, no utilización de citrato como fuente de carbono y no producción de acetoina además, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas. Como todas las bacterias Gram negativas, la cubierta de *E. coli* consta de tres elementos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano, esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas, la *E. coli* es una bacteria mesófila, su óptimo de desarrollo se encuentra en el entorno de la temperatura corporal de los animales de sangre caliente (Benvenuto, 2017).

### ***Staphylococcus aureus***

El *Staphylococcus aureus*, es un microorganismo muy diseminado en el ambiente por poseer características particulares de virulencia y resistencia contra antibióticos, lo cual representa un grave problema de salud, esto es, gracias a que su distribución se extiende a nivel mundial y el impacto en la morbilidad es considerable a nivel comunitario e intrahospitalario, en los humanos, causa una amplia variedad de enfermedades infecciosas y su principal impacto es ocasionado por las cepas de *S. aureus*, que son sumamente resistentes a la meticilina y otros antibióticos que antes eran eficaces contra el tratamiento de las infecciones; desde el punto de vista genómico, la resistencia se produce por selección natural a través de mutaciones producidas al azar; sin embargo, también se pueden inducir artificialmente mediante la aplicación de una presión selectiva a una población, como sería el abuso o la utilización de antibióticos; asimismo, *S. aureus* tiene características genéticas que le han permitido convertirse en una de las bacterias más importantes en la clínica y en las enfermedades transmitidas por alimentos, se mencionan también algunas características principales para el aislamiento y el estudio del patógeno, utilizando procedimientos microbiológicos (Zendejas *et al.*, 2014)

- **Características microbiológicas**

Este género *Staphylococcus* es relativamente más resistente al calor, mientras que otras bacterias se destruyen en 30 minutos a 60 grados centígrados. Los *Staphylococcus* necesitan temperaturas más grandes y tiempos más largos. La resistencia al calor está acompañada por crecimiento máximo más elevado, a diferencia de muchas bacterias crecen a 45 grados centígrados. La resistencia a la desecación también es notable; pueden permanecer infecciosos en el medio ambiente durante largos periodos. Una característica que tienen en común los Gram positivos es que son sensibles a la acción bacteriostática de los colorantes trifenil-metano, también son sensibles a las penicilinas y antibióticos de amplio espectro, sin embargo, suelen desarrollar resistencia microbiana a los fármacos (Almeida, 2013).

### **2.2.3 MEDIOS DE CULTIVO**

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos (Apella, & Araujo, 2005).

#### **a. Medios de cultivo no selectivos**

Son medios complejos o sintéticos con aditivos adicionales para favorecer el crecimiento de determinados microorganismos (Apella, & Araujo, 2005).

- Caldo cerebro-corazón. - La infusión de cerebro y corazón ha resultado ser efectiva en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos muchos tipos de patógenos. Se ha utilizado como medio base para las nuevas fórmulas de medios de cultivo cuando se suplementa con sangre o agentes selectivos (Casado, *et al.*, 2012).

#### **b. Medios de cultivo selectivo**

Son aquellos que permiten el crecimiento específico de un determinado microorganismo o grupo de microorganismos, inhibiendo el desarrollo de los demás (Apella, & Araujo, 2005).

- Agar Manitol salado. - es un medio de cultivo que se utiliza normalmente en microbiología. Permite el crecimiento de un determinado grupo de bacterias mientras que inhibe el crecimiento de otras. Este medio es importante en el laboratorio clínico debido a que es capaz de distinguir los microorganismos patogénicos en un corto periodo de tiempo. Contiene una alta concentración (- 7.5%-10%) de sal (NaCl), haciéndolo selectivo para *Staphylococcus* debido a que el nivel de NaCl es inhibitorio para la mayoría de las bacterias (Casado *et al.*, 2012).
- Agar Mueller Hinton. - es un medio utilizado para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana en microorganismos aeróbicos por el método de Kirby- Bauer. Debido a su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente (Rivas, *et al.*, 2007).
- Agar MacConkey (McK): las sales biliares y el cristal violeta ejercen una inhibición significativa sobre las bacterias Gram Positivas. La lactosa y el indicador rojo neutro permiten comprobar la degradación de ese disacárido; las colonias lactosa positivas (*Escherichia coli*) aparecen roja con halo turbio; las lactosas negativas (*Salmonella spp.*) son incoloras. (Gentilini, *et al.*, 2017)

#### **2.2.4 MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD**

El estudio de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Pero la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos no implica solo realizar un conjunto de técnicas y medir los resultados. Es necesario saber interpretar los mismos y darles el significado que realmente tienen. Para la determinación la sensibilidad se han utilizados métodos cuantitativos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) y los métodos cualitativos (disco difusión) son aquellos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente, siendo uno de los métodos más utilizados en la práctica diaria por la obtención de datos de manera rápida y la interpretación de los resultados (Wikler, 2006).

- **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Es la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos, cuando la CMI sea menor, la susceptibilidad del microorganismo será mayor al fármaco utilizado (Botana, 2002).

- **Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

Corresponde a la mínima concentración de aceite que elimina el 99,9 % del número original de bacterias. Refleja la capacidad de un fármaco de disminuir de forma sustancial el número de bacterias (Botana, 2002).

- **Método de difusión por disco**

Consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con las diferentes sustancias. Tan pronto el disco impregnado de la sustancia se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el aceite difunde al agar. La sustancia difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Estrada, 2010).

### 2.2.5 Unidad de Análisis

Cervantes *et al.*, (2014) clasifican taxonómicamente *Staphylococcus aureus* de la siguiente manera:

#### Taxonomía

- Dominio: Bacteria
- Filo: Firmicutes
- Clase: Bacili
- Orden: Bacillales
- Familia: Staphylococcaceae
- Género: Staphylococcus
- Especie: S. aureus
- Subespecie: aureus

Haugen *et al.*, (2007) clasifican taxonómicamente *Escherichia coli* de la siguiente manera:

#### Taxonomía

- Dominio: Bacteria
- Filo: Proteobacteria
- Clase: Gammaproteobacteria
- Orden: Enterobacteriales
- Familia: Enterobacteriaceae
- Género: *Escherichia*
- Especie: *E. coli*



## CAPÍTULO III

### 3.1 HIPÓTESIS

Las cepas bacterianas certificadas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* presentan sensibilidad bacteriana al aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*).

### 3.2 OBJETIVOS

#### 3.2.1 Objetivo General

- Evaluar *in vitro* el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre cepas certificadas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

#### 3.2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la concentración del aceite de orégano (30%, 60% y 90%) de mayor sensibilidad para las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre cepas certificadas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Determinar la sensibilidad bacteriana mediante halos de inhibición al aplicar aceite de orégano (*Origanum vulgare*) en las cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

## CAPÍTULO IV

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1 UBICACIÓN GEOGRÁFICA

La presente investigación se realizó en la Universidad Técnica de Ambato, en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, campus Querochaca ubicado a 1km de la vía Cevallos- Quero, provincia de Tungurahua con las coordenadas geográficas: Latitud 1°22'3.45"S, Longitud 78°36'30.75"O y una altitud de 2883 msnm.

#### 4.2 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Bacteriología de la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en el que se maneja un ambiente controlado con condiciones ambientales de 19 °C y 40 % de humedad. Las condiciones meteorológicas del campus Querochada se presentan en la tabla 1.

**Tabla 1. Condiciones meteorológicas**

PARÁMETRO	VALOR
Temperatura:	13°
Humedad relativa:	78%
Precipitación:	10mm
Vientos:	11Km/hora

#### 4.3 EQUIPOS Y MATERIALES

##### 4.3.1 Material Experimental

- ✓ Aceite esencial de Orégano (*Origanum vulgare.*)

##### 4.3.2 Agentes Biológicos

- ✓ Cepa bacteriana *Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC292113*
- ✓ Cepa bacteriana *Escherichia coli ATCC25922*

##### 4.3.3 Equipos

- ✓ Cámara de flujo laminar.

- ✓ Agitador magnético con calentador.
- ✓ Refrigeradora
- ✓ Autoclave.
- ✓ Incubadora.

#### **4.3.4 Materiales de laboratorio**

- ✓ Utensilios y vidriería de laboratorio.
- ✓ Pipetas volumétricas de 1 ml, 5 ml, y 10 ml.
- ✓ Discos en blanco de sensibilidad bacteriana marca OXOID.
- ✓ Pizeta.
- ✓ Lámparas de alcohol.
- ✓ Papel aluminio.
- ✓ Asas metálicas.
- ✓ Cajas Petri desechables.
- ✓ Espátulas
- ✓ Algodón.
- ✓ Gasa.
- ✓ Cepillos para limpieza de materiales.
- ✓ Mascarillas.
- ✓ Mandiles.
- ✓ Guantes.
- ✓ Gorros.
- ✓ Calculadora.
- ✓ Cuaderno de Apuntes.
- ✓ Esferos, lápices y borrador.

#### **4.3.5 Sustancias o Reactivos**

- ✓ Agar Muller Hinton
- ✓ Agar MacConkey
- ✓ Agar Sal Manitol
- ✓ Caldo Cerebro- Corazón.
- ✓ Tween 80
- ✓ Agua destilada

#### 4.4 FACTORES DE ESTUDIO

El proyecto de investigación se tuvo como factores de estudio los siguientes:

##### A) Aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)

T. Tween 80

A1. 30 %

A2. 60 %

A3. 90 %

##### B) Cepas bacterianas

B1. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC292113

B2. *Escherichia coli* ATCC25922

#### 4.5 TRATAMIENTOS

La investigación evaluó el efecto antimicrobiano sobre cepas certificadas de *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC292113 utilizando tres concentraciones (30%, 60% y 90%) de aceite para las dos cepas, aplicándose en discos de sensibilidad marca Oxoid impregnados con 0,2ml de cada concentración de aceite de orégano en la superficie de Agar Muller Hinton. Con un total de 20 repeticiones, repartidas en cuatro discos por cada caja petri. Los tratamientos se presentan en la tabla 2 y 3.

**Tabla 2 Cepas y concentraciones respectivas del orégano (*Origanum vulgare*)**

Cepas bacterianas	Aceite de Orégano
	T= tween 80
B1 <i>Escherichia coli</i>	A1= 30%
B2 <i>Staphylococcus aureus</i>	A2= 60%
	A3= 90%

B=bacterias, T=testigo, A=aceite

**Tabla 3. Número de tratamientos y repeticiones para *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* subsp *aureus*.**

Número	Tratamientos	Descripción
0	Tween 80	Se realizó cinco repeticiones para cada cepa con 4 discos en cada caja petri empapados de tween 80.
1	B1A1	
2	B1A2	Se realizó veinte repeticiones con 4 discos de sensibilidad
3	B1A3	impregnados cada uno con 0,2 ml de aceite de orégano al
4	B2A1	30 %, 60%, y 90% respectivamente en cada caja petri y
5	B2A2	para cada cepa bacteriana.
6	B2A3	

B=bacterias, A=aceite

#### **4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL**

El diseño experimental utilizado fue el diseño completamente al azar (DCA) en arreglo grupal 2X3+1, con 20 repeticiones. Se realizó el análisis de varianza y la prueba de TUKEY al 5% para comparar los tratamientos.

#### **4.7 MANEJO DE LA INVESTIGACION**

##### **4.7.1 Obtención del material biológico**

Las cepas certificadas *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* ATCC292113 se las adquirió en el laboratorio MEDIBAC.

##### **4.7.2 Obtención del material experimental**

El aceite de orégano se lo adquirió en la empresa SiFaL, mediante el método de destilación por arrastre de vapor.

##### **4.7.3 Elaboración de las concentraciones de aceite de orégano**

Se utilizó tween 80 como solvente, las concentraciones se calcularon mediante el método de dilución, las mismas fueron calculadas en 3 ml de volumen, como se observa en la tabla 4.

**Tabla 4. Concentraciones del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)**

SUSTANCIAS	CONCENTRACIONES		
	30%	60%	90%
TWEEN 80	2,1ml	1,2ml	0,3ml
ACEITE DE ORÉGANO	0,9ml	1,8ml	2,7ml

#### **4.7.4 Elaboración de medios de cultivo**

Se prepararon los medios de cultivo para la experimentación, según lo recomendado por la casa comercial.

#### **4.7.5 Activación de las Cepas**

Para la activación de las cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* se hidrató a las cepas bacterianas, según reporta la casa comercial y se procedió a realizar la siembra en agar MacConkey para *Escherichia coli* y agar Manitol Salado para *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* por estriamiento con un asa bacteriológica en la caja petri rotulada respectivamente.

#### **4.7.6 Preparación de discos de sensibilidad**

Se ubicaron 20 discos de sensibilidad por cada concentración (30%, 60% y 90%), comprendidos en cuatro discos por cada caja petri, obteniendo un total de cinco cajas por cada concentración, posteriormente con la ayuda de un gotero estéril se impregnó 0.2 ml para cada disco de sensibilidad con las concentraciones respectivas de aceite de orégano.

### **4.8. VARIABLES RESPUESTA**

#### **4.8.1 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

Se determinó mediante el método de microdilución en caldo, se prepararon tubos con un volumen final de 5 ml de caldo cerebro corazón más las cepas bacterianas en estudio, luego se llevó a incubación a 37°C de 2 a 3 horas, posteriormente los tubos se examinaron visualmente para ver si presenta turbidez ligeramente visible, por otro lado, se elaboró las diferentes diluciones de Tween 80 (V/V) con el aceite de orégano para cada tubo en las tres concentraciones, esta metodología se la llevo a cabo de la siguiente manera.

### **Cepa *Escherichia coli***

- ✓ En el tubo N° 1 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml de la dilución del aceite esencial de orégano al 30 %.
- ✓ En el tubo N° 2 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml de la dilución del aceite esencial de orégano al 60 %.
- ✓ En el tubo N° 3 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml de la dilución del aceite esencial de orégano al 90 %.

### **Cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus***

- ✓ En el tubo N° 1 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml de la dilución del aceite esencial de orégano al 30 %.
- ✓ En el tubo N° 2 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml de la dilución del aceite esencial de orégano al 60 %.
- ✓ En el tubo N° 3 se colocó 1 ml de la dilución de la cepa en caldo Cerebro-Corazón más 1 ml de la dilución del aceite esencial de orégano al 90 %.

## **4.8.2 Concentración Mínima Bactericida (CMB)**

Se tomó como referencia el procedimiento realizado por Sadiki et al., (2014) donde para establecer la CMB de las bacterias certificadas de *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ATCC29213 y *Escherichia coli* ATCC25922 se tomaron los tubos con las distintas concentraciones y se procedió a la siembra en el agar Mueller Hinton dejando incubar a 37°C por 24 horas, posteriormente se procedió a la lectura de resultados.

## **4.8.3 Sensibilidad bacteriana**

Con un asa bacteriológica se tomó cinco colonias de la cepa *Escherichia coli* cultivada en agar MacConkey y la cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus* en agar Manitol salado cultivadas previamente por 24 horas y se inocularon en 5 ml de caldo Cerebro-Corazón luego se incubaron a 37°C de 2 a 3 horas hasta que apareció una turbidez visible. Una vez estandarizada la cepa se procedió a cultivar con ayuda de un hisopo estéril por

estriado múltiple en agar Mueller Hinton, dejando reposar por 10 minutos antes de colocar los discos de sensibilidad OXOID con dosis de los extractos e impregnándolos en el agar Mueller. Con ayuda de una pinza estéril se colocó 4 discos de sensibilidad en la superficie del agar de cada placa sembrada, distribuidos de forma que no se produzca superposición de los halos de inhibición y se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se midieron los halos de inhibición usando una regleta.

#### **4.9 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACION**

El análisis estadístico, se realizó utilizando el Programa INFOSTAT versión 2016



## CAPÍTULO V

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 RESULTADOS

##### 5.1.1 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

**Tabla 5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre la cepa bacteriana *Escherichia coli*.**

Cepa	Tiempo	Diluciones del aceite de orégano + tween 80			Control negativo Tween 80
		30%	60%	90%	
		Turbidez			
<i>E. coli</i>	0 horas	+	-	-	+
	2 horas	+	-	-	+
	4 horas	+	-	-	+
	6 horas	+	-	-	+
	24 horas	+	-	-	+

*E. coli*= *Escherichia coli*. Positivo (+), Negativo (-)

En la tabla 5 para la cepa bacteriana *Escherichia coli*, al 30% presentó turbidez en todas sus horas establecidas, refiriendo que existe un crecimiento bacteriano positivo, mientras que al 60% y 90% no presentaron turbidez es decir no hay crecimiento bacteriano.

**Tabla 6. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*.**

Cepa	Tiempo	Diluciones del aceite de orégano + tween 80			Control negativo Tween 80
		30%	60%	90%	
		Turbidez			
<i>S. aureus</i>	0 horas	-	-	-	+
	2 horas	-	-	-	+
	4 horas	-	-	-	+
	6 horas	-	-	-	+
	24 horas	-	-	-	+

*S. aureus*= *Staphylococcus aureus*. Positivo (+), Negativo (-)

En la tabla 6 para la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*, los niveles de dilución 30%, 60% y 90%, de dilución de aceite de orégano y tween 80 no presentó ninguna turbidez mostrando que se inhibió el crecimiento de bacterias.

### 5.1.2 Concentra Mínima Bactericida (CBM)

**Tabla 7. Determinación de la Concentración Minina Bactericida (CBM) del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre la cepa bacteriana *Escherichia coli*.**

Cepa	Tiempo	Tubos de ensayo con diluciones de aceite y cepas bacterianas			Control negativo Tween 80
		1	2	3	
		<b>Crecimiento</b>			
<i>E. coli</i>	0 horas	+	-	-	+
	2 horas	+	-	-	+
	4 horas	+	-	-	+
	6 horas	+	-	-	+
	24 horas	+	-	-	+

*E. coli*= *Escherichia coli*. Positivo (+), Negativo (-)

En la tabla 7 se presenta la Concentración mínima bactericida para la cepa bacteriana *Escherichia coli* donde muestra que en el tubo 1 se presentó la formación de colonias al apreciar el medio solido agar Muller Hinton, es decir, las concentraciones que no permitieron el desarrollo bacteriano fueron las concentraciones 60% y 90% de aceite de orégano más tween 80. Evidenciándose que el tween 80 no causa efecto inhibitorio sobre la bacteria.

**Tabla 8. Determinación de la Concentración Minina Bactericida (CBM) del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*.**

Cepa	Tiempo	Tubos de ensayo con diluciones de aceite y cepas bacterianas			Control negativo Tween 80
		1	2	3	
		<b>Crecimiento</b>			
<i>S. aureus</i>	0 horas	-	-	-	+
	2 horas	-	-	-	+
	4 horas	-	-	-	+
	6 horas	-	-	-	+
	24 horas	-	-	-	+

*S. aureus*= *Staphylococcus aureus*. Positivo (+), Negativo (-)

En lo que concierne a la Concentración mínima bactericida para la cepa *Staphylococcus aureus* en la tabla 8 se muestra que en los tubos 1, 2 y 3 no se encontró crecimiento de colonias al apreciar el medio solido agar Muller Hinton, es decir que las concentraciones de 30%, 60% y 90% de aceite de orégano más tween 80 no permitieron el desarrollo bacteriano.

### 5.1.3 Prueba de difusión por disco

**Tabla 9. Determinación de la sensibilidad bacteriana (mm) del aceite de orégano (*Origanum vulgare*) frente a las cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp. aureus***

CEPAS	CONCENTRACIONES			E.E	Valor de P
	30%	60%	90%		
<i>E.coli</i>	13,01 <sup>b</sup>	17,62 <sup>a</sup>	16,05 <sup>a</sup>	0,73	<.0,0001
<i>S. aureus</i>	13,25 <sup>c</sup>	16,35 <sup>b</sup>	25,00 <sup>a</sup>	0.66	<.0,0001

*E. coli*= *Escherichia coli*, *S. aureus*= *Staphylococcus aureus*, abc= Medias con una letra común entre columnas no son significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ). E.E= Error Estándar.

La tabla 7 demuestra el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano sobre las cepas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus subsp aureus*, demostrándose que para *Escherichia coli* el tratamiento más eficaz fue al 60% con un diámetro de 17.62mm, mientras que para *Staphylococcus aureus subsp aureus* el tratamiento más efectivo fue al 90% con un diámetro de 25.00mm, entre los tratamientos obteniendo del 60% y 90% no son significativamente diferentes ( $p = < 0.05$ ) mostrándose estadísticamente iguales con valores de 17.62mm y 16.05mm respectivamente, en relación al 30% con un valor de 13.01 mm en halos de inhibición para la cepa *Escherichia coli*, mientras que las concentraciones 30%,60% y 90% frente a la cepa *Staphylococcus aureus subsp. aureus* son estadísticamente diferentes con valores de 13.25mm, 16.35mm y 25.00mm de halos de inhibición, siendo el mayor efecto antimicrobiano para la cepa Gram positiva a la concentración del aceite de orégano al 90%

Al analizar los resultados permiten aceptar la hipótesis de la investigación planteada con respecto a la sensibilidad bacteriana del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*).

## 5.2 DISCUSIÓN

El aceite de orégano utilizado para la presente investigación mostro resultados positivos al inhibir *in vitro* el crecimiento de las cepas bacterianas *Escherichia coli* ATCC25922 y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC292113, al igual que (Avila *et al.*, 2010) demostró que una de las especias que tienen mayor efecto antimicrobiano es el aceite de orégano, inhibiendo el crecimiento de *Escherichia coli*, donde actúa el componente fenólico carvacrol que tiene un alto poder hidrofóbico y es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando con ella la salida del ATP (Lambert *et al.*, 2001), mientras que Helander *et al.*, (1998), estudió el mecanismo de acción del timol el cual presenta semejanza al del carvacrol, ya que su estructura química es similar cambiando únicamente la posición del grupo hidroxilo, por otro lado Juven *et al.*, (1994), estudia el mecanismo del timol contra *Staphylococcus aureus*, demostrando que este agente antimicrobiano une las proteínas hidrofóbicas de la membrana mediante los puentes de hidrógeno, cambiando las características de la misma así también que el efecto inhibitorio del timol es mayor a un pH de 5.5 que a 6.5, ya que a bajos valores de pH la molécula del agente antimicrobiano no está disociada, logrando unir las partes hidrofóbicas de la proteína y por lo tanto facilitando la disolución de la fase lipídica de la membrana (García, 2008); el timol provoca una distorsión en la estructura física de la célula, causando expansión y consecuente desestabilidad en la membrana, modificando su permeabilidad y alterando la fuerza protón motora por medio de variaciones en el pH y potencial eléctrica (Pereira *et al.*, 2008).

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI ) evidenció un efecto claramente marcado del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* desde el 30% siendo estos resultados similares a los obtenidos por De Souza *et al.* (2008) al 1,23 %, en el mismo tipo de cepa; mientras que Hammer, Carson, & Riley (1999) utilizaron aceite comercial al 2,0% sobre *S. aureus*. García (2006) al realizar un estudio con extracto alcohólico determinó la CMI al 2.77 %, el autor manifiesta que la variación se debe a que los extractos alcohólicos necesitan de mayor concentración para inhibir el crecimiento bacteriano. La comparación de datos obtenidos en este estudio con respecto a artículos previamente publicados resulta compleja, Hammer *et al.* (1999)

mencionan que, la composición de aceites y extractos como el *Origanum vulgare* y *Thymus vulgaris* cambian según las condiciones climáticas y ambientales de cada región, otro factor que influye en esta variación de datos es la metodología usada en la evaluación de la actividad antimicrobiana; por otro lado, Prestes et al., (2010), manifiesta que la Concentración mínima bactericida (CMB) fue mayor para las bacterias Gram positivas como el *Staphylococcus aureus*.

La prueba de sensibilidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*), en la presente investigación mostró que la cepa *Escherichia coli* obtuvo un valor máximo en su diámetro de halos de inhibición de 17.62mm, al 60% considerando a partir de 4 mm que existe sensibilidad antimicrobiana, siendo este el valor mínimo a considerar; por otro lado Biało et al.(2017), muestra que los halos en concentraciones que van desde el 0.5% a 1% alcanzan un diámetro de 17.05mm y 16.00mm respectivamente, mientras que Pereira et al. (2008), indicó que el aceite de orégano en concentraciones de 0.1% no promovió la inhibición del crecimiento bacteriano, probablemente por la baja concentración del mismo, y que en concentraciones de 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% y 50%, presentaron formación de halos de sensibilidad pero no presentaron una significativa variación en la formación del halo obteniendo valores de 6mm, 8mm, 8mm, 9mm,9mm, 9mm, 9mm, 9mm respectivamente, la constancia entre los resultados observados probablemente se dan debido a la influencia del etanol utilizado en la dilución de los aceites, este solvente puede alterar la entrada del aceite en la célula bacteriana, facilitando su difusión en mayores diluciones (Oussalah et al., 2007), en comparación a Dorman (2000) quien obtuvo halos de inhibición de 29.5mm en cepas bacterianas de *Escherichia coli*; sin embargo, Burt y Reinder (2009) demuestran la actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano, obteniendo que este es efectivo contra esta bacteria con valores de 24mm de diámetro del halo de inhibición con el aceite de orégano sin dilución, siendo estos valores superiores a los encontrados en nuestra investigación la cual se la realizo con aceite de orégano diluido.

La prueba de sensibilidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*), en la presente investigación mostró un valor máximo en su diámetro de halos de inhibición de 25mm, al 90% sobre la cepa *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* considerando a partir de 4 mm que existe sensibilidad antimicrobiana, siendo este el valor mínimo a considerar; por otro lado Pereira et al. (2008) obtuvo halos de inhibición con

concentraciones desde el 0.1%, con un diámetro de 8mm hasta concentraciones de 20%, 30%, 40% y 50%, encontrándose con halos de inhibición con diámetros de 10mm, 10mm, 12mm y 13mm respectivamente; así también Delgadillo et al. (2007) obtuvo un diámetro máximo de halos de sensibilidad de 10.5mm con la utilización del aceite diluido siendo su diámetro inferior al encontrado en este estudio mientras que Bayramoglu et al. (2008), obtuvo valores de 40mm y 45mm de diámetro en esta cepa bacteriana con la utilización del aceite de orégano sin dilución.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFIA Y ANEXOS

#### 6.1 CONCLUSIONES

- Se demostró que el aceite esencial de orégano fue más efectivo sobre *Staphylococcus aureus subsp aureus* que sobre la cepa de *Escherichia coli*
- Se determinó que la concentración de aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*), de mayor sensibilidad antimicrobiana fue la concentración al 60% sobre la cepa de *Escherichia coli*, mientras que para la cepa de *Staphylococcus aureus subsp aureus* la mejor respuesta a sensibilidad antimicrobiana fue la concentración al 90%.
- Se determinó que la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre la cepa *Escherichia coli*, presentó turbidez al 30%, mientras que para *Staphylococcus aureus subsp. aureus* no presentó turbidez en ningún de sus concentraciones; en cuanto a la Concentración Mínima Bactericida para *E. coli* al 30% presentó formación de colonias, y para *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, no existió desarrollo bacteriano.
- Se determinó la sensibilidad bacteriana mediante medición de halos; donde el aceite esencial de orégano formó al 90% halos de inhibición de 25mm sobre la cepa de *Staphylococcus subsp aureus* mientras que en *Escherichia coli* lo hizo de 17,62 mm.al 60%, siendo las inhibiciones de mayor tamaño *in vitro*.

## 6.2 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-shanab, B. (2004). Antibacterial Activities of Some Plant Extracts Utilized in
- Acosta, O., Castro, A., Roque, M., & Felix, L. (2000). Composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* L “Tomillo”, por cromatografía de gasesespectrometro de masa GC/MS y análisis de su actividad antimicrobiana. *Ciencia E Investigación*, 3(2), 69–78.
- Albado Plaus, E., Saez Flores, G., & Grabiell Ataucusi, S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Medica Herediana*, 12(1), 16-19.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(9), 4168-4170.
- Almeida Laz, C. (2013). Incidencia *Staphylococcus aureus* en la carne de pollo faenado que se expende en el mercado municipal del cantón Quevedo (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia).
- Apella, C. M., & Araujo, Z. P. (2005). Microbiología del agua. Conceptos Básicos. *Tecnologías Solares para la Desinfección y Descontaminación del Agua*, 33-50.
- Arcila-Lozano, C. C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., & González de Mejía, E. (2004). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(1), 100-111.
- Avila, L., & Baquero, e, Viña, a, Murillo, EE. (2006). actividad antibacteriana de *diplostephium tolimense* cuatrec. (asteraceae frente a *stafilococcus aureus*. *vitae*, 13 (1), 55-60.
- Avila-Sosa, R., Gastélum-Franco, M. G., Camacho-Dávila, A., Torres-Muñoz, J. V., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2010). Extracts of Mexican oregano



- (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 434-440.
- Bandoni, a. l., Retta, d., Di Leo Lira, p. m., & Baren, c. m. v. (2009). Son realmente útiles los aceites esenciales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(5).
- Bayramo lu, E. E., Gülümser, G., & Karaboz, . (2008). The Investigation of Antibacterial Activities of Some Essential Oils in Wet Blue Leather. *International Journal of Natural & Engineering Sciences*, 2(1).
- Bello, A. (1999). Estudios de aceites esenciales de especie Myrtaceae de la flora de Pinar del Río (Doctoral dissertation, Tesis de Maestría de Universidad del Rio]. Brasil).
- Benvenuto Vargas, V. P. (2017). Determinación de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) en agua de mar del Circuito de Playas de la Costa Verde.
- Botana, L. (2002). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Getafe: McGRAWHILL.
- Brandl, M.T. 2006. Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 367–392
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223-253.
- Burt, S. A. (2007). Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food (Doctoral dissertation, Utrecht University).
- Burt, S. A., & Reinders, R. D. (2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157: H7. *Letters in applied microbiology*, 36(3), 162-167.
- Carhuapoma, M., Bonilla, P., Suarez, S., Villa, R., & López, S. (2005). Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Moliná) A. Gray" arrayán". *Ciencia e Investigación*, 8(2), 73-79.

- Casado, C., Torrico, G., & Medina, M. (2012). Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología. Retrieved July 19, 2017, from <https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-unlaboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>
- Castaño Sepúlveda, M. V. (2012). Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*), sobre la levadura (*Rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín).
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Combariza, M. Y., Tirado, C. B., Stashenko, E., & Shibamoto, T. (1994). Limonene concentration in lemon (*Citrus volkameriana*) peel oil as a function of ripeness. *Journal of Separation Science*, 17(9), 643-646.
- Cruz-Carrillo, A., Rodríguez, N., & Rodríguez, C. E. (2010). in vitro evaluation of the antibacterial effect of *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* AND *Silybum marianum*. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 13(2), 117-124.
- D'Antuono, L. F., Galletti, G. C., & Bocchini, P. (2000). Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean Area (Liguria Region, Northern Italy). *Annals of Botany*, 86(3), 471-478.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop protection*, 22(1), 39-44.
- Daouk, R. K., Dagher, S. M., & Sattout, E. J. (1995). Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*, 58(10), 1147-1149

- De Souza Prestes, L., Frascolla, R., Santin, R., Ziemann dos Santos, M. A., Costa Schram, R., Alves Rodrigues, M. R., ... & Araújo Meireles, M. C. (2008). Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 13(4), 0-0. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962008000400003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962008000400003)
- Delgadillo Ruiz, L., & Bañuelos Valenzuela, R., & Delgadillo Ruiz, O., & Silva Vega, M., & Gallegos Flores, P. (2017). Composición química y efecto antimicrobiano in vitro de extractos de *Origanum tridentatum*, *Origanum vulgare*, *Artemisia ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Nova Scientia*, 9 (19), 273-290.
- Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap*, 16(4), 385-393.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
- García, C. (2006). Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple (Tesis pregrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torrión-México.
- Etapé, J. V., & Zboromyrska, Y. (2012). Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarreagénicas. *Gastroenterología y Hepatología*, 35(2), 89-93.
- Estrada, S. P. (2010). Determinación de la actividad antibacteriana In Vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*). (Tesis 40 pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador. Retrieved.
- Gámez Piñón, J. R., Rentería Monterrubio, A. L., Durán Meléndez, L. A., Chávez Martínez, A., Alarcón Rojo, A. D., Aguilar Palma, N. G., & Silva

- Vázquez, R. (2015). Efecto del aceite esencial de orégano en el rendimiento y las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de la carne de pollo. *Investigación y Ciencia*, 23(66).
- García-Camarillo, E. A., Quezada-Viay, M. Y., Moreno-Lara, J., Sánchez-Hernández, G., Moreno-Martínez, E., & Pérez-Reyes, M. C. J. (2006). Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera [*Carya illinoensis* (FA Wangenh) K. Koch]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1).
- García-García, R. M., & Palou-García, E. (2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 2(2), 41-51.
- Gentilini, E., Reinoso, E., Echeverría, M., & Leardini, N. (2007). Microbiología veterinaria. N. O. Stanchi, & P. E. Martino (Eds.). Buenos Aires: Inter-Médica.
- Guerra-Cantú, J. A., Moreno-Limón, S., Martínez-Rodríguez, A., Gámez-González, H., Ab, N. G. M., Moreno-Buentello, O. M., & de los Garza, N. determinación de pigmentos en orégano (*poliomintha bustamanta bl turner.*) en dos condiciones de crecimiento.
- Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985–990. <https://doi.org/10.1046/j.13652672.1999.00780.x>
- Haugen, B. J., Pellett, S., Redford, P., Hamilton, H. L., Roesch, P. L., & Welch, R. A. (2007). In vivo gene expression analysis identifies genes required for enhanced colonization of the mouse urinary tract by uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 dsdA. *Infection and immunity*, 75(1), 278-289.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., ... & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of

selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(9), 3590-3595.

Holden, M. T. G., Feil, E. J., Lindsay, J. A., Peacock, S. J., Day, N. P. J., Enright, M. C., ... & Barron, A. Spratt and BG, Parkhill, J. 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 9786-9791.

Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., & Weisslowicz, H. (1994). Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Microbiology*, 76(6), 626-631.

Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., & Nychas, G. J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 453-462.

Lozano-Guzmán, E., López-Guzmán, O. D., Bocanegra-Salazar, M., Davis-Figueroa, L. C., Flores, C., & Cervantes Flores, M. (2013). Interacción sinérgica de propóleo (Propolis) y orégano (*Lippia graveolens* Kunth sl) contra *Staphylococcus aureus*. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44(4), 73-78.

Madsen, H. L., & Bertelsen, G. (1995). Spices as antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 6(8), 271-277.

Muñoz Acevedo, A., Castañeda, M. L., Blanco, K. M., Cardenas, C. Y., Reyes, J. A., Kouznetsov, V. V., & Stashenko, E. E. (2007). Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et Technica*, 13(33).

Nascimento, Gislene G. F., Locatelli, Juliana, Freitas, Paulo C., & Silva, Giuliana L.. (2000). Atividade de extratos vegetais e fitofármacos sobre bactérias resistentes a antibióticos. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 247-256. <https://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822000000400003>

- Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., ... & Blanco, A. R. (2007). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of medical microbiology*, 56(4), 519-523.
- Oliveira, J. L. T. M. D., Diniz, M. D. F. M., Lima, E. D. O., Souza, E. L. D., Trajano, V. N., & Santos, B. H. C. (2009). Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(1), 45-50.
- Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L., & Lacroix, M. (2007). Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food control*, 18(5), 414-420.
- Paredes Aguilar, M, & Gastelum franco, M, & Silva Vazquez, R., & Nevarez Moorillon, G (2007). Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlanieri* Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *Vibrio*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30 (3), 261-267.
- Pereira, Alcilene de Abreu, Cardoso, Maria das Graças, Abreu, Luiz Ronaldo de, Morais, Augusto Ramalho de, Guimarães, Luiz Gustavo de Lima, & Salgado, Ana Paula Soares Pinto. (2008). Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(3), 887-893.
- Rivas, M., Miliwebsky, E., & Deza, N. (2007). Manual de procedimientos, Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de especímenes clínicos. Buenos Aires: Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas.
- Russo, M., Galletti, G. C., Bocchini, P., & Carnacini, A. (1998). Essential Oil Chemical Composition of Wild Populations of Italian Oregano Spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A Preliminary Evaluation of Their Use in Chemotaxonomy by Cluster Analysis.

1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(9), 3741-3746.
- Sadiki, M. Y., Balouiri, M. Barkai, H. Maataoui, H. Koraichi, S. I., & Elabed, S. O. U. M. Y. A. (2014). Synergistic antibacterial effect of *Myrtus communis* and *Thymus vulgaris* essential oils fractional inhibitory concentration index. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6, 121-124.
- San Martín, B, Bravo, V, & Borie, C. (2005). Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. *Archivos de medicina veterinaria*, 37(2), 117-123. <https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2005000200005>
- Stashenko, E. E., Martínez, J. R., Ruíz, C. A., Arias, G., Durán, C., Salgar, W., & Cala, M. (2010). *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *Journal of separation science*, 33(1), 93-103.
- Vokou, D., Vareltzidou, S., & Katinakis, P. (1993). Effects of aromatic plants on potato storage: sprout suppression and antimicrobial activity. *Agriculture, ecosystems & environment*, 47(3), 223-235.
- Wayne, P. A. (2015) CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second Informational supplement. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, P.A.(2015).CLSI.Performance standards for antimicrobial susceptibility testing
- Wikler, M. A. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. CLSI (NCCLS), 26, M7-A7.
- Winward, G. P., Avery, L. M., Stephenson, T., & Jefferson, B. (2008). Essential oils for the disinfection of grey water. *Water research*, 42(8), 2260-2268.
- Zendejas-Manzo, G. S., Avalos-Flores, H., & Soto-Padilla, M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 25(3), 129-143.

### 6.3 ANEXOS



**Anexo 1.** Concentraciones del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*)



**Anexo 2.** Activación e incubación de las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus subsp aureus* y *Escherichia coli*.

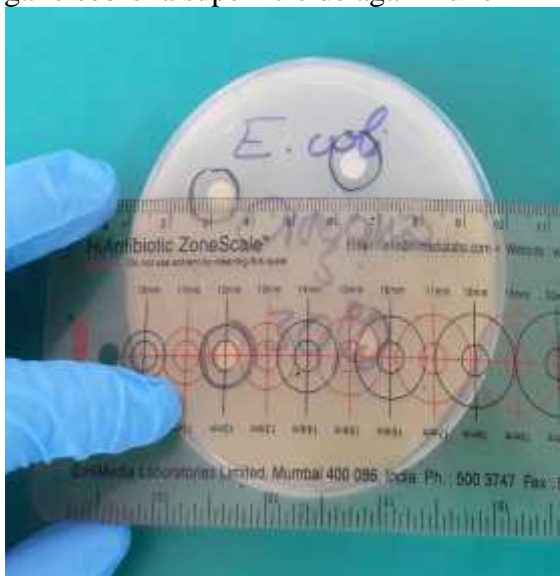




**Anexo 3.** Impregnación del aceite esencial de Orégano en discos Oxoid



**Anexo 4.** Distribución de discos de sensibilidad con las concentraciones de aceite de orégano sobre la superficie de agar Muller Hinton.



**Anexo 5.** Medición de halos de sensibilidad utilizando una regleta



**Anexo 6.** Halos de sensibilidad de *Staphylococcus aureus subsp. aureus* al 30%, 60% y 90% del aceite de orégano.



**Anexo 7.** Halos de sensibilidad de *Escherichia coli* al 30%, 60% y 90% del aceite de Orégano.

**Anexo 8. Diámetro de halos de inhibición de *Escherichia coli* (mm) usando aceite de orégano**

Tratamientos	I	II	III	IV	V
30%	14.5	11.33	11.5	16.25	11.5
60%	21.6	17.25	16.5	17	15.75
90%	16.5	15.25	16.5	15.5	16.5

**Anexo 9. Análisis de varianza para la variable sensibilidad antimicrobiana en *Escherichia coli* usando aceite de orégano**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	962,86	3	320,95	119,80	<0,0001
TRATAMIENTOS	962,86	3	320,95	119,80	<0,0001
Error	42,86	16	2,68		
Total	1005,72	19			

**Anexo 10. Prueba de Tukey al 5% para la variable sensibilidad antimicrobiana en *Escherichia coli* usando aceite de orégano**

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
C2B1	17,62	5	0,73	A
C3B1	16,05	5	0,73	A
C1B1	13,01	5	0,73	B
C0B1	0,00	5	0,73	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Anexo 11. Diámetro de halos de inhibición de *Staphylococcus aureus subsp aureus* (mm) usando aceite de orégano**

Tratamientos	I	II	III	IV	V
30%	13.75	13.5	12.5	13.25	13.25
60%	16.75	17	15.75	15.5	16.75
90%	26.5	20.75	26	28	23.75

**Anexo 12. Análisis de varianza para la variable sensibilidad antimicrobiana en *Staphylococcus aureus subsp aureus* usando aceite de orégano**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1612,98	3	537,66	248,81	<0,0001
TRATAMIENTOS	1612,98	3	537,66	248,81	<0,0001
Error	34,58	16	2,16		
Total	1647,55	19			

**Anexo 13. Prueba de Tukey al 5% para la variable sensibilidad antimicrobiana en *Staphylococcus aureus subsp aureus* usando aceite de orégano**

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.			
C3B2	25,00	5	0,66	A		
C2B2	16,35	5	0,66		B	
C1B2	13,25	5	0,66			C
C0B2	0,00	5	0,66			D

*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )*

## CAPÍTULO VII

### PROPUESTA

Aplicar aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) al 30% en la elaboración de dietas para lechones.

#### 7.1. DATOS INFORMATIVOS

Las instituciones involucradas en la presente propuesta será la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, los productores porcícolas del cantón Cevallos.

#### 7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

Los métodos para la obtención de aceites esenciales son relativamente sencillos de realizar ya que pueden ser obtenidos por, maceración o arrastre de vapor, preservando las propiedades de los aceites como el de orégano que es un excelente antimicrobiano.

En base a los resultados de la presente investigación, se obtuvo que el aceite de orégano a partir del 30% inhibió el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, las mismos que son responsables de la presencia de diarreas en lechones, por lo tanto, puede ser utilizado como una alternativa para el tratamiento de enfermedades entéricas, y así evitar el uso indiscriminado de antibióticos comerciales.

#### 7.3. JUSTIFICACIÓN

La aplicación del aceite de orégano al 30% en dietas para lechones tiene como fin proveer a los productores porcícolas una alternativa, para así evitar el uso de antibióticos para el tratamiento de diarreas causadas por el género *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. mediante la elaboración de dietas en base de una determinada cantidad de aceite a concentración del 30%, dando así una buena alternativa a los productores de cerdos para evitar el uso de antibióticos, mejorando la producción.

#### 7.4. OBJETIVOS

Elaborar dietas balanceadas para lechones con el uso de aceite esencial de orégano al 30% para el tratamiento de diarreas provocadas por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

## **7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD**

La obtención del aceite de orégano se lo realiza, mediante el método de arrastre de vapor. Él orégano se lo puede encontrar en cualquier casa comercial del país factible al público. La característica principal del aceite de orégano es su efecto antimicrobiano utilizado como aditivo o suplemento en la alimentación de animales en producción

## **7.6. FUNDAMENTACIÓN**

La presencia de diarreas en lechones producidas por bacterias enteropatógenos, provocan perdidas en la producción porcicola, debido a que los animales mueren por deshidratación, aunque se utilicen antibióticos para el tratamiento de estas bacterias, con la utilización excesiva de antibioticos se puede producir una resistencia de los animales, produciendo una pérdida económica.

Para ello se debe profundizar más sobre la fitoterapia como alternativa al uso de antibióticos mejorando la producción y obteniendo animales de calidad para el consumo humano.

## **7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO**

Promover el uso de aceites esenciales de plantas, de igual manera la elaboración de balanceados con aceites para el tratamiento de enfermedades entéricas producidas por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

## **7.8. ADMINISTRACIÓN**

La Universidad Técnica de Ambato mediante la Facultad de Ciencias Agropecuarias, así como docentes, estudiantes y productores será responsable de la realización de esta propuesta que pueda llevar a una adecuada utilización de aceites en explotaciones de cerdos mediante investigaciones que complementen el uso de aceites en animales.

## **7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN**

Los pequeños y medianos productores de cerdos mediante la realización de esta propuesta podrán mejorar la salud de sus animales mediante la utilización de aceites que formen parte de una dieta balanceada, para obtener buenos resultados tanto en producción como en el aspecto económico.