

DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, **HUALPA QUISPE MARY CRUZ**, con DNI **70433260** en mi condición de autor(a) de la tesis presentada para optar el TITULO PROFESIONAL QUIMICO FARMACEUTICO de título “Efecto inhibitorio del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) frente a cepas de bacteria gram negativa in vitro”, **AUTORIZO** a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para publicar de manera indefinida en el repositorio institucional, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Indicar que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud de dieciséis (16%) y, que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

Conforme a lo indicado firmo el presente documento dando conformidad a lo expuesto.

Lima, 27, de 10 2022



Mary cruz Hualpa Quispe
DNI: 70433260



Rosa Danitza Moyano Legua
DNI: 21409333

DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, **Visitacion Andrade Anthony Andre** , con DNI **46113108** en mi condición de autor(a) de la tesis presentada para optar el TITULO PROFESIONAL DE QUIMICO FARMACEUTICO de título “_“Efecto inhibitorio del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) frente a cepas de bacteria gram negativa in vitro”, **AUTORIZO** a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para publicar de manera indefinida en el repositorio institucional, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Indicar que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud de dieciséis por ciento (16%) y, que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

Conforme a lo indicado firmo el presente documento dando conformidad a lo expuesto.

Lima 27 de 10 de 2022



Anthony Andre Visitacion Andrade
DNI: 46113108



Dra. Rosa Danitza Moyano Legua
DNI: 21409333

INFORME DE ORIGINALIDAD – TURNITIN

INFORME_FINAL_VISITACION Y HUALPA 17_10_2022

INFORME DE ORIGINALIDAD

16%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

6%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.uma.edu.pe Fuente de Internet	4%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	3%
3	repositorio.unsaac.edu.pe Fuente de Internet	3%
4	www.repositorio.uma.edu.pe Fuente de Internet	2%
5	repositorio.uigv.edu.pe Fuente de Internet	2%
6	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	1%
7	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	1%
8	repositorio.espam.edu.ec Fuente de Internet	1%



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

“EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL DE
Origanum vulgare L (orégano) FRENTE A CEPAS DE
BACTERIA GRAM NEGATIVA IN VITRO”

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO

AUTORES

VISITACIÓN ANDRADE, ANTHONY ANDRÉ

<https://orcid.org/0000-0002-0927-4695>

HUALPA QUISPE, MARY CRUZ

<https://orcid.org/0000-0001-9420-9208>

ASESOR

Dra. MOYANO LEGUA, ROSA DANITZA

<https://orcid.org/0000-0002-8241-7031>

LIMA – PERÚ

2022

DEDICATORIA

A mi madre María por ser fundamental y apoyo en mi formación académica, a mi hermana Fiorela que es el ejemplo para luchar por mis metas, a mi padre Javier que desde el Cielo me guía por el buen camino, pues gracias a ellos logre mis sueños.

Bach. VISITACIÓN ANDRADE, ANTHONY ANDRÉ

A mis padres Obdulia y Juan por el amor, paciencia, esfuerzo incondicional, quienes han velado por mi bienestar y mi triunfo personal; a mi hermana Jennifer y mi abuela alejandrina por ser un ejemplo de no desfallecer, ni rendirme a conseguir mis metas trazadas

Bach. HUALPA QUISPE, MARY CRUZ

AGRADECIMIENTO

A nuestros padres por estar siempre con nosotros en todo momento de nuestra etapa de la vida.

A nuestra asesora Dra. Rosa Danitza Moyano Legua, porque fue nuestra mano derecha durante la realización de esta tesis, con su apoyo y conocimiento lo logramos.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I.	12
II.	18
II.1.	18
II.2.	18
II.3.	19
II.4.	20
II.5.	20
II.6.	23
II.7.	23
III.	23
III.1.	27
III.2.	29
IV.	43
IV.1.	43
IV.2.	44
IV.3.	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS	41
ANEXO A: Técnicas e instrumentos de recolección de datos	41
ANEXO B: Matriz de consistencia	43
ANEXO C: Operacionalización de las variables	44
ANEXO D: Carta de aprobación de la Institución, Empresa o Comunidad para la ejecución del proyecto de tesis.	45

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Determinación de la solubilidad	20
Tabla 2: Determinación de metabolitos secundarios	21
Tabla 3. Test de Eficacia inhibitoria del Aceite de orégano frente a <i>Escherichia coli</i> , (ATCC 29522) comparado contra Cefuroxima 30 [g/mL	22
Tabla 4. Efecto inhibitorio del aceite de las hojas de <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) frente a <i>Escherichia coli</i> (ATCC 29522) empleándose como control Cefuroxima 30 [g/mL ²³	
Tabla 5. Comparación múltiple para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	24
Tabla 6. Análisis de Prueba de Tukey para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25
Tabla 7. Subconjuntos homogéneos del efecto Inhibitorio frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 a las 24 horas de su aplicación.	27
Tabla 8. Comparación múltiple para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	28
Tabla 9. Subconjuntos homogéneos del efecto Inhibitorio frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 a las 48 horas de su aplicación	29
Tabla 10. Comparaciones múltiples del efecto inhibitorio de aceite esencial de <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) frente a <i>Escherichia coli</i> (ATCC 29522) a las 72 horas de su aplicación.	31
Tabla 11. Subconjuntos homogéneos del efecto Inhibitorio frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 a las 72 horas de su aplicación	32

INDICE DE FIGURAS

Fotografía n° 1 Pesado de la muestra de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano)	57
Fotografía n° 2 y 3 Destilación, filtrado de la solución oleosa. (obtención del aceite esencial).	58
Fotografía n° 4 y 5 Separación de la solución en pera de bromo y obtención del aceite esencial de <i>origanum vulgare L.</i> (oregano).	58
Fotografía n° 6 y 7 Preparación de las concentraciones del efecto inhibitorio al 50 %, 75 % y 100 %	59
Fotografía n° 8 Reactivos para la prueba de solubilidad	59
Fotografía n° 9 Resultados obtenidos del proceso de solubilidad del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano)	60
Fotografía n° 10 Resultados del tamizaje fitoquímico del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano)	60
Fotografía n° 11 Saponinas-RX. Espuma (++)	61
Fotografía n°12 Alcaloides	61
Fotografía n° 13 Flavonoides	62
Fotografía n° 14 Saponinas	62
Fotografía n° 15 Saponinas	63
Fotografía n° 16 Aminoacidos	63
Fotografía n° 17 Material requerido disponible en mesa de trabajo previamente desinfectado	64
Fotografía n° 18 y19 kwik-Stik contenidos con los pallets de cepas liofilizados	64
Fotografía n° 20 y 21 Activación de la cepa <i>Escherichia coli</i>	65

RESUMEN

Objetivo: Comprobar el Efecto Inhibitorio del aceite esencial del *Origanum vulgare L* (orégano) en cepas de *Escherichia coli* in vitro.

Materiales y método: Se utilizó 6.800 kg de hojas de *Origanum vulgare L* (orégano) para la extracción del aceite, se identificaron metabolitos secundarios, se midió con vernier los halos de inhibición y se comparó con la Cefuroxima.

Resultados: El aceite de *Origanum vulgare L* (orégano) presento efecto inhibitorio en cepas de *Escherichia coli* in vitro al 100% tiene mejor actividad inhibitoria mientras que el 75 % y 50 % son nulas de acuerdo a la escala de duraffourd. Al comparar con la cefuroxima esta tiene mayor efecto inhibitorio que el aceite esencial de *Origanum Vulgare L* (orégano).

Conclusiones El aceite esencial al 100% utilizado frente a los cultivos de *Escherichia Coli* ATTCC 25922 presentó un halo de inhibición de 15.33 mm de diámetro.

Palabras claves: aceite de *Origanum vulgare L* (orégano), metabolitos secundarios bacteria Gram negativa, halo de inhibición, efecto inhibitorio.

ABSTRACT

Objective: To test the inhibitory effect of *Origanum vulgare L* (oregano) essential oil on *Escherichia coli* strains in vitro.

Materials and method: 6.800 kg of *Origanum vulgare L* oregano leaves were used for oil extraction, secondary metabolites were identified, inhibition halos were measured with vernier and compared with Cefuroxime.

Results: The oil of *Origanum vulgare L* (oregano) presented an inhibitory effect on *Escherichia coli* strains in vitro at 100%, it has better inhibitory activity while 75% and 50% are null according to the duraffourd scale. When compared to cefuroxime, it has a greater inhibitory effect than the essential oil of *Origanum Vulgare L* (oregano).

Conclusions: The 100% essential oil used against *Escherichia Coli* ATCC 25922 cultures presented an inhibition halo of 15.33 mm in diameter.

Keywords: oil of *Origanum vulgare L* (oregano), secondary metabolites Gram negative bacteria, inhibition halo, inhibitory effect.

I. INTRODUCCIÓN

La medicina natural como la medicina tradicional tienen efectos curativos que provienen de culturas relativamente antiguas y de otras culturas que existieron más recientemente sin ninguna tradición. La medicina natural y medicina tradicional que utilizan todos los recursos naturales y otras se centran en medios técnicos elevados, pero ambos cumplen con los estándares de la medicina tradicional (1).

La (OMS) define a nuestra medicina tradicional como los estudios y habilidades en bases teóricas, creencias y costumbres propias de diferentes tradiciones, pueden ser revelados no, utilizadas para cuidar el bienestar y prevenir, diagnosticar, aliviar o calmar las enfermedades del ser humano (2).

Las bondades de las plantas y sus metabolitos son razón de varios estudios etnobotánicos, en donde vienen plasmando una rápida erosión de conocimientos tradicionales en nuestra cultura peruana, cuidando su conservación y mejora de supervivencia. Este estudio contribuye a la necesidad de nuevas terapias y desinfectantes producidos por bacterias multirresistentes para las infecciones clínicas (3).

El *Origanum vulgare L* (orégano) tiene principios activos como carvacrol y timol, entre otros principios fenólicos. (4).

El timol y el carvacrol son compuestos naturales antibacterianos hallados en el aceite de orégano, la membrana externa de las bacterias Gram negativas se desintegra por la presencia de estas sustancias químicas, elaborando orificios, y causando lisis a la bacteria (5).

En los últimos años, se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre la bioactividad del orégano, siendo la hierba aclamada como un anti-tripanosoma (Santoro et al., 2007), antioxidante (Fasseas et al., 2007), y también activa contra una amplia gama de bacterias patógenas (Albado et al., 2001). También se ha utilizado el doble beneficio del aceite esencial de orégano en el pescado en términos de características sensoriales y de vida útil, lo que hace que la vida útil del producto

se prolongue en comparación con la de otras técnicas de conservación (Viuda-Martos et al., 2009) (6).

Los mecanismos de inhibición de los antibióticos son: la replicación, interrupción de la transcripción, inhibición de la síntesis o traducción de proteínas, inhibición de peptidoglicano, síntesis de monómeros estructurales de la pared celular, que pueden ejercer sus efectos de alterar y/o interrumpir la permeabilidad de la membrana celular. Sin embargo, se dice que la resistencia a los antimicrobianos se desarrolla cuando las dosis de antibióticos comúnmente utilizadas no pueden dañar a los microbios (7).

En microbiología, se denominan bacterias gramnegativas aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue: de ahí el nombre de "gramnegativas" o también "Gram-negativas". Esta característica está íntimamente ligada a la estructura didérmica dada por la envoltura celular, pues presenta doble membrana celular (una externa y la otra citoplasmática), lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. (8)

Las bacterias gram negativas comúnmente causan infecciones del tracto urinario. Pueden adquirirse por vía hematológica, pero el 95% de las infecciones son causadas por bacterias que ascienden desde la abertura vaginal y colonizan la uretra hasta la vejiga y, en el caso de pielonefritis aguda no complicada, a través de la uretra hasta el riñón. Los estudios han demostrado que *Escherichia coli* es la causa más común de infecciones nosocomiales del tracto urinario, con tasas de infección que oscilan entre el 70,0 % y el 90,0 % en adultos y niños. También es la causa más común de infecciones urinarias nosocomiales; sin embargo, otras bacterias como *Proteus vulgaris*, *Klebsiella* y *Pseudomonas aeruginosa* son más comunes como infecciones comunitarias. (9)

Los compuestos orgánicos denominados “metabolitos primarios”, se encuentran en primer término, los azúcares o carbohidratos, que se producen como resultado de la fotosíntesis. Por otra parte, se sintetizan en concentraciones variables diferentes compuestos químicos denominados, “metabolitos secundarios”, ya que no intervienen directamente en su metabolismo, no se conoce con profundidad su función en la planta y se emplean como mecanismo de defensa. Ellos pertenecen a diferentes grupos como son: aceites esenciales, alcaloides, cumarinas, esteroides, fenoles, flavonoides, glucósidos, gomas, iridoideas, lignanos, mucílago, pectinas, quinonas, saponinas, taninos y terpenos, entre otros. (10)

El uso del aceite de orégano es importante si se tiene presente su contenido de carvacrol, triterpenos, taninos, flavonoides y timol, lo cual le confiere la propiedad antioxidante a fin de minimizar los efectos de los radicales libres. También, posee características antitumorales, antiespasmódicas, antiinflamatorias, vasodilatadoras, antialérgicas, estrogénicas, antivirales, antiparasitarias, anti fúngicas, antibacterianas. (11).

La propiedad más importante de los aceites esenciales es el monoterpeno de oxígeno, más que nada está formado por diferentes conjuntos funcionales, como éteres, cetonas, aldehídos, alcoholes, entre otros. Químicamente, los aceites fundamentales incluyen sesquiterpenos, monoterpenos, terpenos (cetonas, alcoholes e hidrocarburos, que tienen la posibilidad de ser de cadena abierta, monocíclicos, bicíclicos o tricíclicos), azufre y nitrógeno. La composición de los aceites esenciales ha sido estudiada para una variedad de hierbas y especias, especialmente las de la familia del tomillo “Lamiaceae”, de aroma o aroma agradable; Sin embargo, los aceites esenciales se pueden usar con éxito en otras áreas (12).

López E, (2018), Efectos inhibitorios contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* de la subespecie aureus del aceite "*Origanum vulgare L*", en diferentes diluciones de aceite de orégano. Definieron el concentrado inhibitorio mínimo, en cepa "*Escherichia coli*", manifestó al 30% de turbidez para cada una de sus horas establecidas. Mientras que al 60% y 90% no hubo opacidad, pero para la cepa "*Staphylococcus aureus*" no hubo turbiedad en cualquiera de sus concentraciones, concluyendo que concentraciones bactericidas mínimas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, de las cuales "*Escherichia coli*" se encontró en un 60% y un 90% no sobrevive al crecimiento bacteriano; en cambio, en cepa "*Staphylococcus aureus*" en las 3 concentraciones no presentó crecimiento bacteriano (13).

García G, (2017), Se estudio el "Efecto inhibitorio del aceite esencial de *Origanum vulgare L* (orégano) en cepas de *Porphyromonas gingivalis*". estudio in vitro, El aceite fue producido por el proceso de destilación al vapor, y fue procesado en dos concentraciones, 50% y 100% respectivamente. Para determinar su inhibición, tanto a las 24 como a las 72 horas de exposición, se utilizó el método Kirby Bauer (difusión en agar). Para ello, se colocaron cuatro discos blancos en cada una de las diez placas de Petri, previamente impregnados con aceite esencial en sus dos concentraciones, clorhexidina al 0,12% como control positivo y suero fisiológico como control negativo, y se incubaron las placas en un ambiente anaeróbico. Esto demostró que el aceite esencial de *Origanum vulgare L* en sus dos concentraciones tiene un efecto inhibitorio sobre *Porphyromona gingivalis* (14).

Palmay P, J (2019), Se evaluaron la actividad antimicrobiana de *Origanum vulgare L*. (Tipo) utilizando dos métodos diferentes de extracción de compuestos activos del material vegetal (hojas), incluyendo el aceite esencial y el extracto hidroalcohólico, contra cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Salmonella* el tratamiento más eficaz para las cepas de *Escherichia coli* del aceite esencial es a una concentración del 100% (totalmente puro) con un halo medido a 16,33 mm, que se clasifica como muy sensible (++) en la escala de Duraffourd; para el extracto hidroalcohólico, la concentración del 100% (totalmente puro) es la más eficaz con un halo de inhibición medido a 20. 33 mm, que se clasifica como muy sensible (+ La cepa de *Salmonella*

sp. determina una mayor eficacia del aceite esencial a un nivel de pureza del 25% con un halo medido igual a 13,5 mm, clasificándose en la escala como muy sensible (+), del mismo modo que para la misma cepa la eficacia del extracto hidroalcohólico se encuentran al 75% y al 100% calificando su actuación en la escala de Duraffourd como extremadamente sensible (+++) con halos calculados en mm iguales a 29, 5 y 31,16 respectivamente (15).

Guerrero J, Mejía E, (2021), Se realizó el “Efecto antimicrobiano de *Origanum vulgare L* sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*”. Se evaluó mediante el método de difusión en disco de Kirby y Bauer, con discos concentrados al 25, 50, 75 y 100% respectivamente. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para comparar las medias de las distintas medidas del halo de inhibición para el análisis inferencial, y se utilizó la prueba post hoc de Tukey para la comparación de cada grupo. Cuando se compararon los halos de inhibición utilizando la escala de Duraffourd, los resultados mostraron que el aceite de *origanum vulgare L* tenía un impacto inhibitorio in vitro contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* en todas las dosis. (16).

Medrano E, Medrano D, (2020), Actividad antimicrobiana y efecto desinfectante del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) frente a *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*” muestran su eficacia en términos de desinfección de superficies. La actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* midió una media de 8,0 mm, 8,0 mm, 9,3 mm y 14,7 mm, mientras que la actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* midió una media de 8,0 mm, 9,3 mm, 15,7 mm y 12,0 mm. Estos resultados se obtuvieron a concentraciones del 20%, 40%, 80% y 100%, respectivamente, para cada cepa (17).

Salazar R, Yerren M (2021), Se utilizó el método de difusión en pozo para ilustrar el impacto antibacteriano, y se emplearon pruebas estadísticas realizadas con un nivel de confianza del 95% para examinar los resultados. El propósito de este estudio era proporcionar pruebas de que el aceite esencial extraído de *Melissa officinalis*, a veces conocida como "melisa", y de *Origanum vulgare L.*, "orégano", inhibe el crecimiento de *Escherichia coli*. Los resultados del aceite de melisa al 50%

y al 100% fueron de $10,36 + 0,30$ mm y de $12,05 + 0,31$ respectivamente; asimismo, los resultados del aceite de orégano al 50% y al 100% fueron de $11,68 \pm 0,29$ mm y de $15,28 \pm 0,36$ mm; los resultados del control negativo, DMS, fueron de $6,17 \pm 0,20$ mm, y los del control positivo, ciprofloxacina, de $30,35 \pm 0,32$ mm. Se determinó que *Escherichia coli* era susceptible a los efectos antibacterianos de ambos aceites (18).

El presente estudio, se justifica porque no hay estudios suficientes que establezcan las concentraciones y dosis adecuada que sustenten el efecto inhibitorio de *Origanum vulgare L.* (orégano).

Este estudio pretende contribuir con el conocimiento acerca de la seguridad y el efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano), en el tratamiento de las infecciones causada por bacterias, constituyendo una nueva alternativa de tratamiento natural.

El aceite de las hojas de *Origanum vulgare L.* (orégano) se puede utilizar como un tratamiento alternativo de enfermedades de origen bacteriano con información validada científicamente y así evitar la resistencia bacteriana y efectos secundarios en los pacientes.

El objetivo general fue “Comprobar el efecto inhibitorio del aceite esencial del *Origanum vulgare L.* (orégano) en cepas de *Escherichia coli* in vitro”

Hipótesis general declaro que “El aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) posee efecto inhibitorio en bacterias de *Escherichia coli* in vitro”.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Diseño y enfoque del estudio

Enfoque cuantitativo: Porque tuvo como propósito la medición para probar la hipótesis formulada.

Diseño de la investigación: (Es experimental). Por qué el aceite del "*Origanum vulgare L*" (orégano) fue sometido al experimento microbiológico "in vitro".

Tipo de investigación: Explicativa – Descriptiva. Descriptiva, señalando las propiedades de la planta en situaciones experimentales. Explicativa, buscó determinar los efectos inhibitorios in vitro del aceite esencial.

Comparativo: Se comparó el aceite del "*Origanum vulgare L*" (orégano) con el producto farmacéutico (Cefuroxima), frente a *Escherichia Coli*.

Aplicada: Los resultados se utilizarán para desarrollar nuevas opciones terapéuticas para grupos en situación de vulnerabilidad.

Prospectivo: Los datos se registraron desde el momento que se inició el estudio hasta que termino la medición del "halo de inhibición".

Transversal: Los datos se recopilaron en momentos determinados de la investigación

II.2. Población, muestra y muestreo

Población vegetal: 10 kilos de Plantas de orégano "*Origanum vulgare L*" del Departamento de Junín.

Población microbiológica: Cepas del microorganismo de *Escherichia coli*.

Muestra:

Muestra vegetal: 6.800 kilos de hojas del orégano "*Origanum vulgare L*"

Muestra Microbiológica: Cepas estandarizadas: "*Escherichia coli*" (ATCC® 25922™)

Criterios de Inclusión:

- Material vegetal perteneciente al distrito de Tarma provincia de Tarma departamento de Junín pertenece a la familia: Lamiaceae Genero: *Origanum* Especie: *origanum vulgare L.*
- Hojas pequeñas ovaladas, lanceoladas, bien desarrolladas, frescas, limpias, verdes y en excelentes condiciones.

Criterios de Exclusión:

- Material vegetal de origen desconocido.
- Hojas deterioradas, secas, rotas, quebradas y en mal estado de conservación

II.3. Variables de investigación

Variable Independiente: Aceite esencial Producto obtenido de varias hojas de orégano "*Origanum vulgare L*"

Definición conceptual: Los metabolitos secundarios presentes en el aceite de las hojas de *Origanum vulgare L* (orégano) presentan propiedades farmacológicas variadas, se demuestra su actividad inhibitoria.

Definición operacional: 6.800 gramos de hojas se sometieron a arrastre de vapor para su obtención, por 27 veces en muestras pequeñas de 250 gramos cada una.

Variable dependiente: Actividad inhibitoria.

Inhibición del crecimiento de la bacteria Gram negativa: cepas de *Escherichia coli* (ATCC 29522)

Definición conceptual: Es un proceso de inhibir la proliferación o crecimiento bacteriano, determinado mediante el halo de inhibición.

Definición operacional: Medición de los diámetros de los halos de inhibición mediante un vernier

Variable Interviniente: Periodo de Incubación. El intervalo entre la exposición de agentes biológicos y la aparición de la enfermedad.

II.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

Se efectuó mediante técnica de observación directa para recopilación de información.

El instrumento de recolección:

- Fichas de observación de ad- doc: prueba de solubilidad (anexo A).
- Fichas de observación de ad- doc: marcha fitoquímica (anexo A).
- Fichas para los datos de medición de los halos de inhibición del control y del aceite.
- Regla para la medición de los halos se utilizó el vernier calibrador en mm.

II.5. Plan metodológico para la recolección de datos

Recolección de la planta *Origanum vulgare L*: Fueron traídas del distrito de Tarma, provincia Tarma, Departamento de Junín y fueron recolectados a las 4 de la tarde de su lugar de origen, para su posterior traslado a Lima. Finalmente se compró la planta a las 8am, en el mercado (Lobatón) del distrito de Lince del Departamento de Lima (febrero 2022). Se seleccionó las hojas verdes, en buen estado, se acondicionó la muestra en un gran estado de conservación, y se llevó al secado en sombra, para luego realizar la destilación del aceite esencial.

- Identificación botánica

Mediante la constancia N° 010-2022 se indicó la especie a la que pertenece la planta. Para la entrega de la muestra se tuvo en cuenta las siguientes consideraciones (Anexo D N°47).

- Elaboración de la Muestra:

Limpiar: Se colecto de acuerdo con su estado y su aspecto descartando muestras en mal estado o secas de las hojas del *Origanum vulgare L* (orégano)

Secado: A temperatura ambiente en la sombra.

Seleccionar: Se desechó hojas con señales de descomposición.

Extracción del aceite: 8 días.

Obtención del aceite esencial de las hojas del *Origanum vulgare L* (orégano)

Método de arrastre vapor: La muestra con un peso total de 6.800 gramos de las hojas *Origanum vulgare L* (orégano) se colocó en un matraz de destilación y se realizó 27 repeticiones distribuidos en 250 gramos cada una, llegando a un punto de ebullición de 100 c°, con agua y es transportado por una corriente de vapor generada en el refrigerante, luego se forma la mezcla (agua y aceite) y se recepcionó en el matraz Erlenmeyer, se separa el aceite y el agua que al pasar por una pera decantación, se retira el agua en un vaso de precipitado y el aceite obtenido se filtra en un frasco ámbar.

Análisis de calidad del aceite

Características sensoriales:

Aspecto: Liquido cristalino

Color: Amarillo claro

Olor: Característico

Actividad inhibitoria

Adquisición del microorganismo Se realizo la compra de las cepas *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), en el laboratorio GEN LAB DEL PERU S.A.C JR. Cápac Yupanqui N° 2434 Lince – Lima - PERU lo cual se requiere para el estudio de investigación in vitro.

Reactivación de la cepa bacteriana

Elaboración del inóculo bacteriano

Técnica de suspensión directa

Discos de sensibilidad Preparación de los discos sensibles para el aceite esencial de las hojas del *Origanum vulgare L* (orégano) con papel de filtro (Whatman # 2) de 6 mm de diámetro, para su posterior uso, en el medio de cultivo.

La actividad inhibitoria del aceite esencial se evaluó a través de técnica “difusión en disco” en los tres grupos de concentraciones de estudio.

Las sensibilidades bacterianas se evaluaron utilizando la placa de difusión como método.

Método "Kirby Bauer". (M. cultivo en disco).

Agar Müller Hinton.

Sembrado del inóculo bacteriano

Incubación: Identificación y rotulación de las placas.

Lectura del efecto inhibitorio del aceite esencial de hojas del orégano "*Origanum vulgare L*" se realizó a las 24, 48 y 72 horas.

Se utilizó el vernier digitlizado, instrumento que permite la lectura precisa de halos de inhibición y fueron comparados con los valores de sensibilidad sugerido por la escala de sensibilidad de Duraffourd.

Escala de sensibilidad

ESTATUS	MEDIDA en mm
Sensibilidad nula (-)	< 8 mm
Sensible (+)	8mm a ≤14mm
Muy Sensible (++)	< 14mm a 20 mm
Sumamente Sensible (+++)	>21mm

Preparación de aceite esencial de hojas de *Origanum vulgare L*

Concentración 50%, se preparó: recipientes estériles colocando 2 ml de DMSO y 6 ml de aceite, con 8 ml de volumen final.

Concentración 75%, se preparó recipientes estériles, colocando 2 ml DMSO y ml 8 de aceite con 10 ml de volumen final.

Concentración 100%, volumen final 10 ml, aceite esencial (puro).

Rendimiento del Aceite esencial de hojas de *Origanum vulgare L* (orégano)

Para la obtención del rendimiento se calculó al dividir la cantidad del aceite que se obtuvo de la muestra vegetal entre el peso de la masa seca de la misma muestra.

$$\frac{\text{Cantidad del Aceite total / Densidad}}{\text{Masa de la muestra seca}} = \frac{180 \text{ ml} / 0.9132\text{g/ml}}{6.800 \text{ gr.}} = 2.41\%$$

El rendimiento al 100% del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare L* se llegó a obtener un resultado del 2.41 %.

Muestra	<i>Origanum vulgare L</i>
Tiempo de destilación	90 min
Rendimiento	2,41 %
Densidad específica a 20 °C	0,9132 g/ml

II.6. Procesamiento del análisis estadístico

Los datos obtenidos en la evaluación del efecto inhibitorio se registraron en una hoja de Microsoft Excel, posteriormente fueron procesados con el paquete estadístico SPSS versión 26.0, en el cual se aplicó las estadísticas descriptivas principales (media y desviación estándar).

Con la prueba de homogeneidad de varianza (Levene) y la de normalidad (Shapiro-Wilk), se demostró el uso de métodos paramétricos para contrastar la existencia de efectos significativos (Anova y Tukey). Se presentó los datos en tablas y gráficos.

II.7. Aspectos éticos

La experimentación estuvo regida con los aspectos relacionados al desarrollo sostenible, la biodiversidad para sujetar la recuperación, conservación de las plantas

III. RESULTADOS

CARACTERISTICAS DEL ACEITE: El aceite obtenido de *Origanum vulgare L* (orégano) presentó las siguientes características:

- Color: Amarillo verdoso
- Olor: característico a *Origanum vulgare L* (orégano)
- Aspecto: Oleoso
- Consistencia: Densa

5.2. DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LAS HOJAS DE *Origanum vulgare L* (orégano)

Tabla 1: Determinación de la solubilidad

SOLVENTES	RESULTADOS
Etanol 96%	++
Etanol 70%	+
Metanol	+
Benceno	-

Butanol	+++
----------------	------------

Leyenda:

Muy soluble: +++

Soluble: ++

Poco soluble: +

Insoluble: -

En la tabla 1, se puede apreciar que el aceite esencial de *Origanum vulgare L* (orégano), fue muy soluble en butanol, soluble en etanol, poco soluble en metanol e insoluble en Benceno.

5.3. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	REACCIÓN
Compuestos fenólicos	Prueba Cualitativas	+++
Taninos	Reactivo Gelatina	++
Flavonoides	Reactivo Shinoda	+++
Antraquinona	NaOH	++
Aminoácidos	Reactivo Ninhidrina	+
Alcaloides	Reactivo Mayer	++

	Reactivo Dragendorff	++
Esteroides	Reactivo Lieberman - Burchard	+
Triterpenos		++
Saponinas	Reacción de Espuma	++

Leyenda

Reacción muy evidente: +++

Reacción evidente: ++

Reacción poco evidente: +

No hubo reacción: -

En el presente cuadro se puede observar los datos cualitativos del aceite de *Origanum vulgare L* (orégano) posee metabolitos secundarios; tales como: taninos, flavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos carvacrol y timol; así mismo, poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativo

Concentración del aceite	Lectura									Promedio (mm)	
	24 horas			48 horas			72 horas				Σ
	Lectura 1 (mm)	Lectura 2 (mm)	Lectura 3 (mm)	Lectura 1 (mm)	Lectura 2 (mm)	Lectura 3 (mm)	Lectura 1 (mm)	Lectura 2 (mm)	Lectura 3 (mm)		
50 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75 %	4	4	4	4	5	5	5	6	6	43	4,78
100 %	4	6	6	10	10	12	14	16	16	94	10,44
Cefuroxima	10	12	12	12	14	14	16	16	18	124	13,78
Agua Destilada 0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

III.1. Efecto inhibitorio del aceite de las hojas de *Origanum vulgare L* (orégano) frente a bacteria gram negativa.

Tabla 3. Test de Efecto Inhibitorio del Aceite de orégano frente a *Escherichia coli*, (ATCC 29522) comparado contra Cefuroxima, 30 [g/

En la tabla 3 se muestra los resultados del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano) y sus lecturas de 24, 48 y 72 horas, frente a *Escherichia coli*, comparada con la cefuroxima con lo cual se realiza las sumatorias totales y promedios. Se puede observar que en la concentración al 50% no hubo actividad, en comparación del 75 % y 100 % hubo actividad conforme fueron incrementándose las concentraciones del aceite esencial de *Origanum vulgare L* la actividad inhibitoria también.

III.2. Análisis Estadístico del efecto inhibitorio del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano).

Tabla 4. ANOVA de un Factor del efecto inhibitorio de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) frente a *Escherichia coli* (ATCC 29522)

ANOVA

Lectura

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1381,867	4	345,467	64,173	,000
Dentro de grupos	215,333	40	5,383		
Total	1597,200	44			

En la tabla 4 se observa que, considerando un 95% de confianza existe diferencia estadística del efecto inhibitorio de al menos dos de las muestras de diferentes concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano), cefuroxima y DMSO ya que tenemos un valor sig. menor que 0,05.

III.3. Tabla 5: Comparaciones múltiples del efecto inhibitorio de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) frente a *Escherichia coli* (ATCC 29522)

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Lectura

HSD Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
50%	75%	-4,77778*	1,09375	,001	-7,9016	-1,6539
	100%	-10,44444*	1,09375	,000	-13,5683	-7,3206
	Cefuroxima	-13,77778*	1,09375	,000	-16,9016	-10,6539
	DMSO	,00000	1,09375	1,000	-3,1239	3,1239
75%	50%	4,77778*	1,09375	,001	1,6539	7,9016
	100%	-5,66667*	1,09375	,000	-8,7905	-2,5428
	Cefuroxima	-9,00000*	1,09375	,000	-12,1239	-5,8761
	DMSO	4,77778*	1,09375	,001	1,6539	7,9016
100%	50%	10,44444*	1,09375	,000	7,3206	13,5683
	75%	5,66667*	1,09375	,000	2,5428	8,7905

	Cefuroxima	-3,33333*	1,09375	,031	-6,4572	-,2095
	DMSO	10,44444*	1,09375	,000	7,3206	13,5683
Cefuroxima	50%	13,77778*	1,09375	,000	10,6539	16,9016
	75%	9,00000*	1,09375	,000	5,8761	12,1239
	100%	3,33333*	1,09375	,031	,2095	6,4572
	DMSO	13,77778*	1,09375	,000	10,6539	16,9016
DMSO	50%	,00000	1,09375	1,000	-3,1239	3,1239
	75%	-4,77778*	1,09375	,001	-7,9016	-1,6539
	100%	-10,44444*	1,09375	,000	-13,5683	-7,3206
	Cefuroxima	-13,77778*	1,09375	,000	-16,9016	-10,6539

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

En la tabla 5 se observa las diferencias estadísticamente significativas con un 95% de confianza entre los grupos a diferentes concentraciones.

Se observa, por ejemplo, que no existe diferencia significativa entre el aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 50% y el DMSO que muestra una significancia de 1, mayor a 0.05. Esto significa que no existe efecto inhibitorio del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 50% de concentración.

Se determinó que sí existe diferencia significativa entre las muestras del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 75% y el DMSO al tener una significancia de 0,001, menor a 0,05. Para determinar cuál de ellos es mayor, observamos que la diferencia de medias entre el halo de inhibición al 75% y el DMSO es de 4.78 % lo que significa que el aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 75% de concentración no presenta efecto inhibitorio.

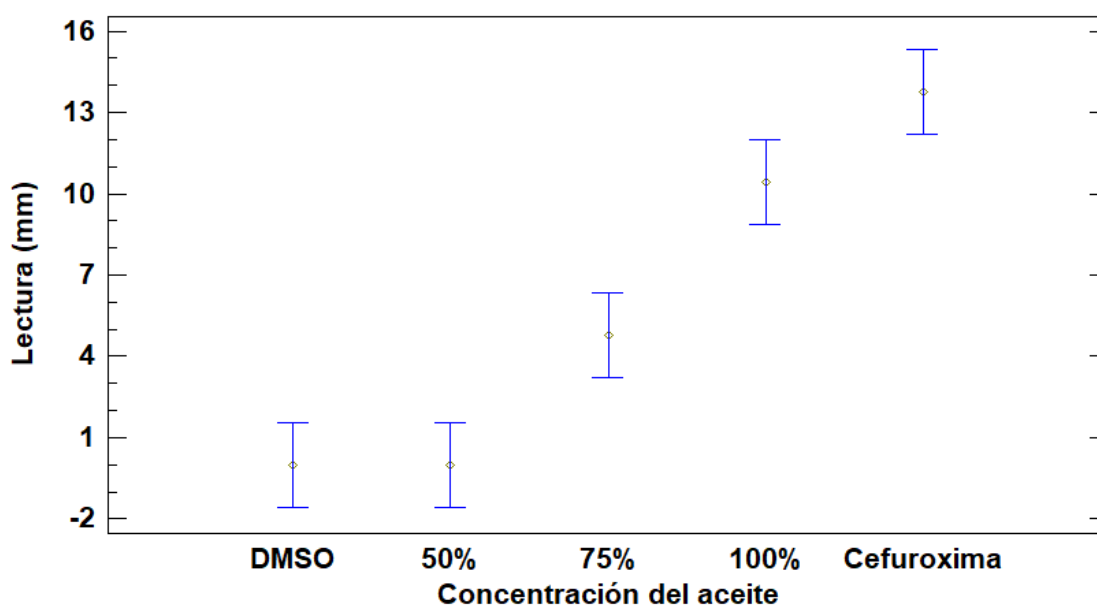
Se observa también que sí existe diferencia significativa entre las muestras de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 100% y el DMSO al tener una significancia de 0,001, menor a 0,05. Para determinar cuál de ellos es mayor, observamos que la diferencia de medias entre el halo de inhibición al 100% y el DMSO es 10,44, lo que significa que el aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 100% de concentración también presenta efecto inhibitorio.

De los párrafos anteriores se concluye que sí existe efecto inhibitorio del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) a las concentraciones al 100%.

Para comparar el efecto inhibitorio entre el aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) y la cefuroxima observamos que la diferencia de medias entre las concentraciones al 50%, 75% y 100% respecto a la cefuroxima es de -13.78, -9 y -3.33 respectivamente; y tiene una significancia menor a 0.05. De ello se concluye que el efecto inhibitorio de las concentraciones al 50%, 75% y 100% es significativamente menor que la Cefuroxima.

Gráfico 1: Intervalos de confianza Tukey del efecto inhibitorio aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) frente a *Escherichia coli* (ATCC 29522)

Medias y 95,0% de Tukey HSD



Según el gráfico anterior se puede confirmar lo obtenido en la tabla 6, donde se observa la diferencia estadística que existe entre las muestras de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 75%, 100% y Cefuroxima respecto al DMSO ya que los intervalos de Tukey no se traslapan horizontalmente con el DMSO ni entre sí. Además, se observa la supremacía inhibitoria de la Cefuroxima respecto a todas las concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) y el DMSO.

A continuación, se analizó la diferencia estadística que existe del efecto inhibitorio de las concentraciones de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 50%,

75%, 100%, Cefuroxima y DMSO frente a la *Escherichia coli* ATCC 25922 durante 3 instantes de tiempo: a 24, 48 y 72 horas de su aplicación.

Lectura a las 24 hrs:

III.4. Analisis de prueba tukey para *Escherichia coli* ATCC25922

Tabla 6: Comparaciones múltiples del efecto inhibitorio de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) frente a *Escherichia coli* (ATCC 29522) a las 24 horas de su aplicación

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Lectura

HSD Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
50%	75%	-4,0000*	,59628	,000	-5,9624	-2,0376
	100%	-5,3333 [†]	,59628	,000	-7,2958	-3,3709
	Cefuroxima	-11,3333 [†]	,59628	,000	-13,2958	-9,3709
	DMSO	,0000	,59628	1,000	-1,9624	1,9624
75%	50%	4,0000*	,59628	,000	2,0376	5,9624
	100%	-1,3333	,59628	,242	-3,2958	,6291
	Cefuroxima	-7,3333 [†]	,59628	,000	-9,2958	-5,3709
	DMSO	4,0000*	,59628	,000	2,0376	5,9624
100%	50%	5,3333*	,59628	,000	3,3709	7,2958
	75%	1,3333	,59628	,242	-,6291	3,2958
	Cefuroxima	-6,0000*	,59628	,000	-7,9624	-4,0376
	DMSO	5,3333*	,59628	,000	3,3709	7,2958
Cefuroxima	50%	11,3333 [†]	,59628	,000	9,3709	13,2958
	75%	7,3333 [†]	,59628	,000	5,3709	9,2958
	100%	6,0000*	,59628	,000	4,0376	7,9624
	DMSO	11,3333 [†]	,59628	,000	9,3709	13,2958
DMSO	50%	,0000	,59628	1,000	-1,9624	1,9624
	75%	-4,0000*	,59628	,000	-5,9624	-2,0376
	100%	-5,3333 [†]	,59628	,000	-7,2958	-3,3709
	Cefuroxima	-11,3333 [†]	,59628	,000	-13,2958	-9,3709

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,533.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

En la tabla 6 se observa la comparación de medias del efecto inhibitorio que existe entre las diferentes muestras frente a la *Escherichia coli* ATCC 25922 a las 24 horas de su aplicación. Se observa que no existe diferencia significativa entre el efecto inhibitorio de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 75% y 100%. Tampoco existe diferencia estadística entre el efecto inhibitorio del DMSO y el aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 50%.

Existe diferencia estadística del efecto inhibitorio de la Cefuroxima respecto a las demás muestras, ya que muestra una significancia menor que 0,05. Además, la diferencia de medias entre la Cefuroxima y las demás muestras toma un valor positivo. Se concluye que la Cefuroxima muestra un efecto inhibitorio estadísticamente superior al resto de muestras a las 24 horas de su aplicación

Tabla 7. Subconjuntos homogéneos del efecto Inhibitorio frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a las 24 horas de su aplicación.

Lectura

HSD Tukey^{a,b}

Concentración	N	Subconjunto		
		1	2	3
50%	3	,0000		
DMSO	3	,0000		
75%	3		4,0000	
100%	3		5,3333	
Cefuroxima	3			11,3333
Sig.		1,000	,242	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,533.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = ,05.

Fuente: Datos estadísticos

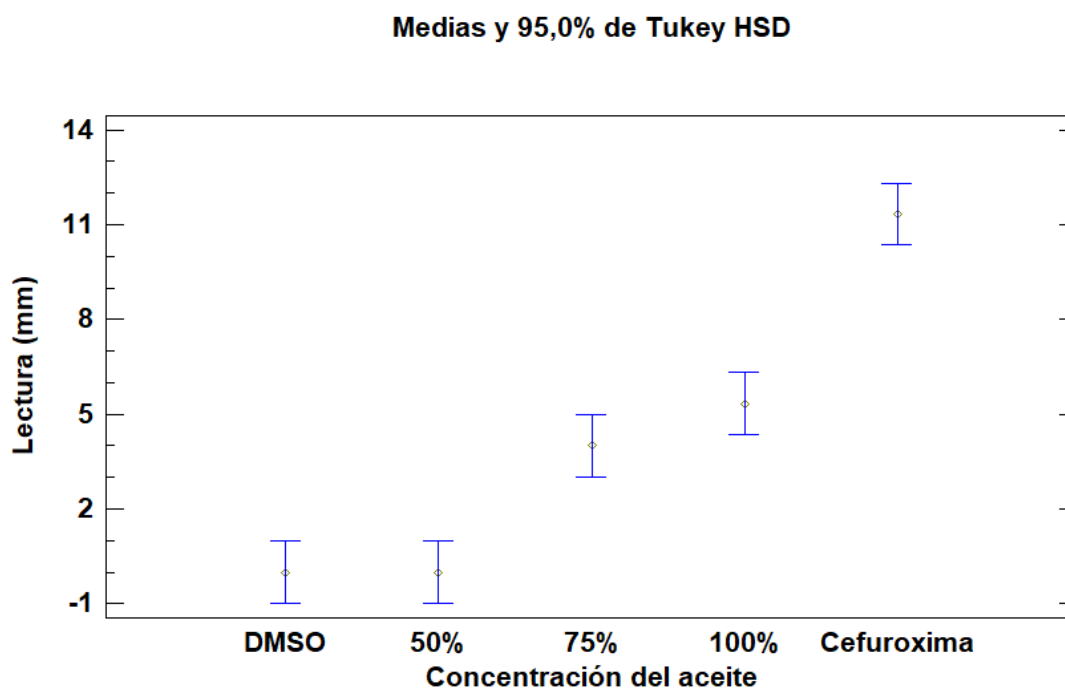
En la tabla 7 la prueba de Tukey señala que, a las 24 horas de su aplicación, la concentración del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 50% presenta un halo de inhibición (0.0mm) al igual que utilizando el DMSO y pertenecen al mismo

subconjunto, lo cual significa que no existe diferencia estadística entre ellos con un nivel de confianza del 95%.

Lo mismo sucede si observamos el subconjunto 2 formado por las muestras de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 75% y 100% cuyos halos de inhibición no son estadísticamente diferentes entre sí, pero sí lo son respecto al DMSO y al aceite de orégano al 50% de concentración.

El subconjunto 3 está formado solo por la Cefuroxima cuya media es de 11,33. Esto significa que a las 24 horas de su aplicación la capacidad inhibitoria de la Cefuroxima es superior al resto de muestras.

Gráfico 2: Intervalos de confianza Tukey del efecto inhibitorio de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) frente a *Escherichia coli* (ATCC 29522) a las 24 horas de su aplicación



Según el intervalo de confianza de Tukey, observa que la Cefuroxima muestra un efecto inhibitorio superior al resto de concentraciones de aceite de orégano a las 24 horas de su aplicación. Con un nivel de confianza al 95%.

Se observa también que a las 24 horas el efecto inhibitorio del aceite de orégano al 100% y 75% son superiores al del 50%, y DMSO. Esto significa que sí existe poder inhibitorio del aceite de orégano en sus concentraciones al 75% y 100% respecto al DMSO durante las primeras 24 horas de su aplicación.

Es decir, con un nivel de confianza del 95% se comprueba que al menos uno de los grupos de muestra es estadísticamente diferente que el resto de grupos.

Tabla 8: Comparaciones múltiples del efecto inhibitorio de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) frente a *Escherichia coli* (ATCC 29522) a las 48 horas de su aplicación.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Lectura

HSD Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
50%	75%	-4,6667*	,63246	,000	-6,7481	-2,5852
	100%	-10,6667*	,63246	,000	-12,7481	-8,5852
	Cefuroxima	-13,3333*	,63246	,000	-15,4148	-11,2519
	DMSO	,0000	,63246	1,000	-2,0815	2,0815
75%	50%	4,6667*	,63246	,000	2,5852	6,7481
	100%	-6,0000*	,63246	,000	-8,0815	-3,9185
	Cefuroxima	-8,6667*	,63246	,000	-10,7481	-6,5852
	DMSO	4,6667*	,63246	,000	2,5852	6,7481
100%	50%	10,6667*	,63246	,000	8,5852	12,7481
	75%	6,0000*	,63246	,000	3,9185	8,0815
	Cefuroxima	-2,6667*	,63246	,012	-4,7481	-,5852
	DMSO	10,6667*	,63246	,000	8,5852	12,7481
Cefuroxima	50%	13,3333*	,63246	,000	11,2519	15,4148
	75%	8,6667*	,63246	,000	6,5852	10,7481
	100%	2,6667*	,63246	,012	-,5852	4,7481
	DMSO	13,3333*	,63246	,000	11,2519	15,4148
DMSO	50%	,0000	,63246	1,000	-2,0815	2,0815
	75%	-4,6667*	,63246	,000	-6,7481	-2,5852
	100%	-10,6667*	,63246	,000	-12,7481	-8,5852
	Cefuroxima	-13,3333*	,63246	,000	-15,4148	-11,2519

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,600.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

En la tabla 8. Se observan los intervalos de confianza de Tukey obtenidos de las diferentes muestras a las 48 horas se su aplicación frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922

Se aprecia que existe diferencia estadística en el efecto inhibitorio entre las muestras a excepción del DMSO y el aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 50%.

Tabla 9. Subconjuntos homogéneos del efecto Inhibitorio frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a las 48 horas de su aplicación

Lectura

HSD Tukey^{a,b}

Concentración	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
50%	3	,0000			
DMSO	3	,0000			
75%	3		4,6667		
100%	3			10,6667	
Cefuroxima	3				13,3333
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,600.

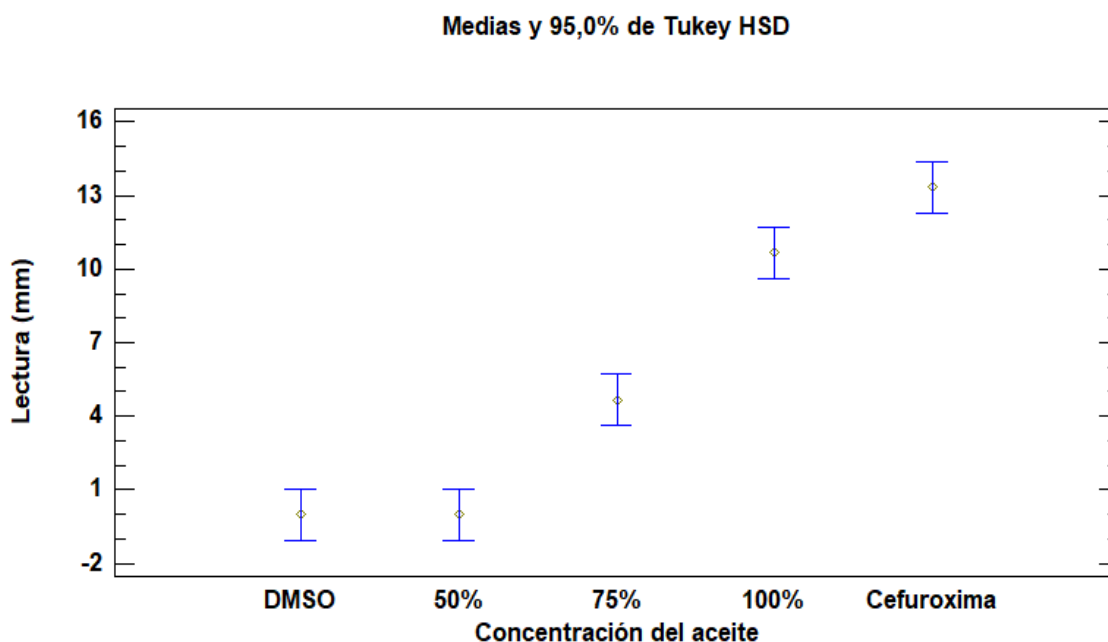
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

b. Alfa = ,05.

Fuente: Datos estadísticos

En la tabla 9, se observa que existen 4 grupos estadísticamente diferentes: El subconjunto 1 formado por el aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 50% y el DMSO, arrojó un halo de inhibición menor (0,00 mm); el subconjunto 2 conformado por el aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) de concentración 75% obtuvo un halo inhibición mayor (4,67 mm), mientras que el tercer subconjunto formado por la concentración del aceite al 100% obtuvo (10,67 mm) de halo de inhibición. Finalmente, el subconjunto 4 formado por la Cefuroxima formó un halo de inhibición notablemente mayor de (13,33 mm).

Gráfico 3: Intervalos de confianza Tukey del efecto inhibitorio de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) frente a *Escherichia coli* (ATCC 29522) a las 48 horas de su aplicación.



Según el gráfico anterior se observa que la Cefuroxima muestra un poder inhibitorio estadísticamente superior al resto de grupos a las 48 horas de su aplicación.

Se observa también que a las 48 horas el efecto inhibitorio del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 100% es estadísticamente superior al del 50%, 75% y DMSO. Esto significa que sí existe poder inhibitorio del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) en sus concentraciones al **75% y 100%** respecto al DMSO durante las primeras 72 horas de su aplicación.

Tabla 10: Comparaciones múltiples del efecto inhibitorio de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) frente a *Escherichia coli* (ATCC 29522) a las 72 horas de su aplicación.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Lectura

HSD Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
50%	75%	-5,6667*	,63246	,000	-7,7481	-3,5852
	100%	-15,3333*	,63246	,000	-17,4148	-13,2519
	Cefuroxima	-16,6667*	,63246	,000	-18,7481	-14,5852
	DMSO	,0000	,63246	1,000	-2,0815	2,0815
75%	50%	5,6667*	,63246	,000	3,5852	7,7481
	100%	-9,6667*	,63246	,000	-11,7481	-7,5852
	Cefuroxima	-11,0000*	,63246	,000	-13,0815	-8,9185
	DMSO	5,6667*	,63246	,000	3,5852	7,7481
100%	50%	15,3333*	,63246	,000	13,2519	17,4148
	75%	9,6667*	,63246	,000	7,5852	11,7481
	Cefuroxima	-1,3333	,63246	,288	-3,4148	,7481
	DMSO	15,3333*	,63246	,000	13,2519	17,4148
Cefuroxima	50%	16,6667*	,63246	,000	14,5852	18,7481
	75%	11,0000*	,63246	,000	8,9185	13,0815
	100%	1,3333	,63246	,288	-,7481	3,4148
	DMSO	16,6667*	,63246	,000	14,5852	18,7481
DMSO	50%	,0000	,63246	1,000	-2,0815	2,0815
	75%	-5,6667*	,63246	,000	-7,7481	-3,5852
	100%	-15,3333*	,63246	,000	-17,4148	-13,2519
	Cefuroxima	-16,6667*	,63246	,000	-18,7481	-14,5852

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,600.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

Fuente: Datos estadísticos

En la tabla 10 Se observan los intervalos de confianza de Tukey obtenidos de las diferentes muestras a las 72 horas frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Se aprecia que, si bien el efecto inhibitorio de la Cefuroxima muestra una media mayor que la del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 100%, no es estadísticamente diferente a las 72 horas de su aplicación, ya que tiene un valor significación = 0.288 > 0.05.

Tabla 11. Subconjuntos homogéneos del efecto Inhibitorio frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a las 72 horas de su aplicación

Lectura

HSD Tukey^{a,b}

Concentración	N	Subconjunto		
		1	2	3
50%	3	,0000		
DMSO	3	,0000		
75%	3		5,6667	
100%	3			15,3333
Cefuroxima	3			16,6667
Sig.		1,000	1,000	,288

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática (Error) = ,600.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

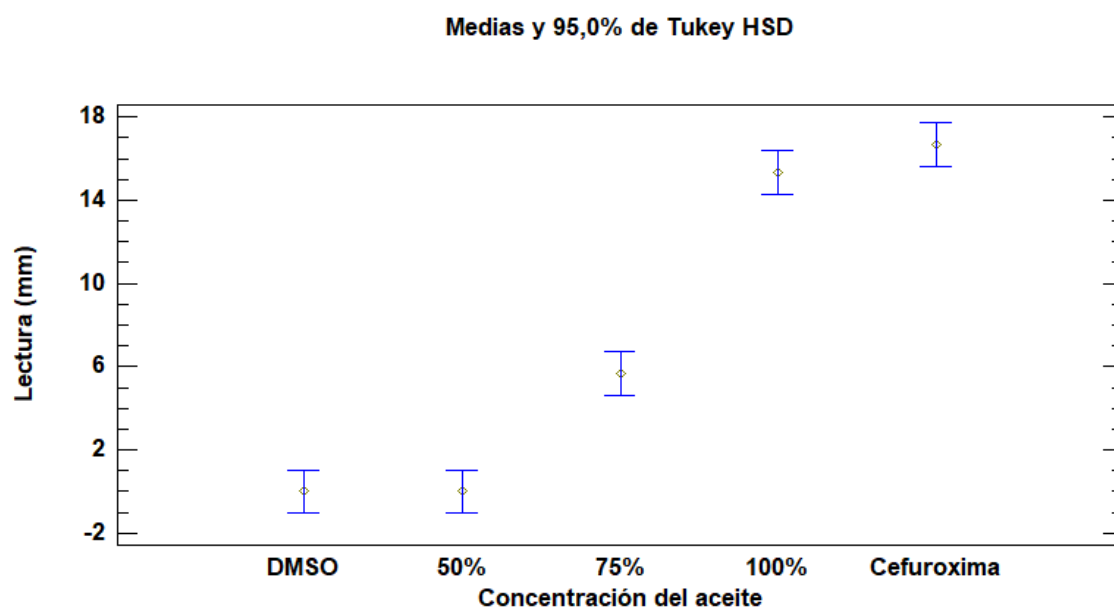
b. Alfa = ,05.

Fuente: Datos estadísticos

En la tabla 11. Se observa la prueba de Tukey, donde el aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 50% y el DMSO formaron un halo de inhibición menor (0,00 mm), el aceite de orégano a concentración al 75 % presenta una inhibición de 5,67 mm, mientras que la concentración al 100 % tiene un halo de inhibición medio de 15,33 mm y la Cefuroxima formó un halo inhibición de 16.67

mm. De estos hallazgos se afirma que la Cefuroxima y el aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 100% presentaron mayor efecto inhibitorio en comparación con el Aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (Orégano) al 50% y 75%.

Gráfico 4: Intervalos de confianza Tukey del efecto inhibitorio del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) frente a *Escherichia coli* (ATCC 29522) a las 72 horas de su aplicación.

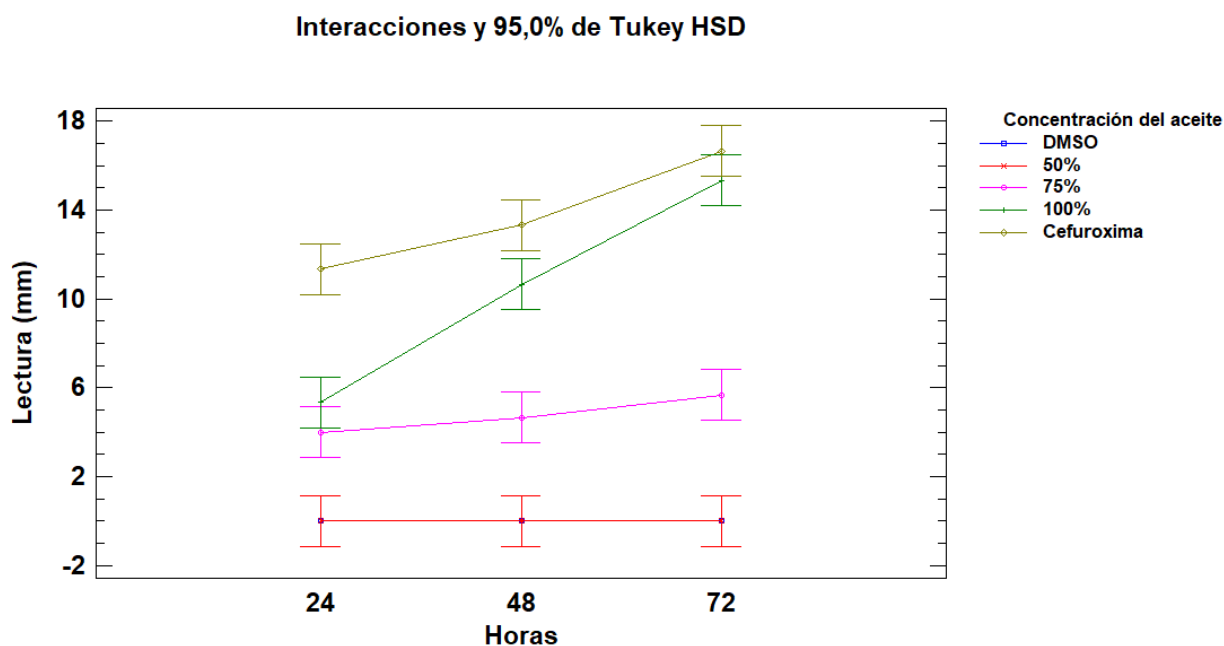


En el gráfico se puede observar los intervalos de confianza de Tukey del poder inhibitorio para cada muestra a las 72 horas de su aplicación, donde apreciamos que la Cefuroxima y el aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 100% tienen mayor poder inhibitorio que el resto de grupos de muestreo.

Se observa también que a las 72 horas el efecto inhibitorio del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 100% no es estadísticamente diferente al de la Cefuroxima.

También se observa que sí existe poder inhibitorio del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) en sus concentraciones al 75% y 100% respecto al DMSO durante las primeras 72 horas de su aplicación.

Gráfico 5: Interacciones de las horas y concentración respecto al efecto inhibitorio de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) frente a *Escherichia coli* (ATCC 29522)



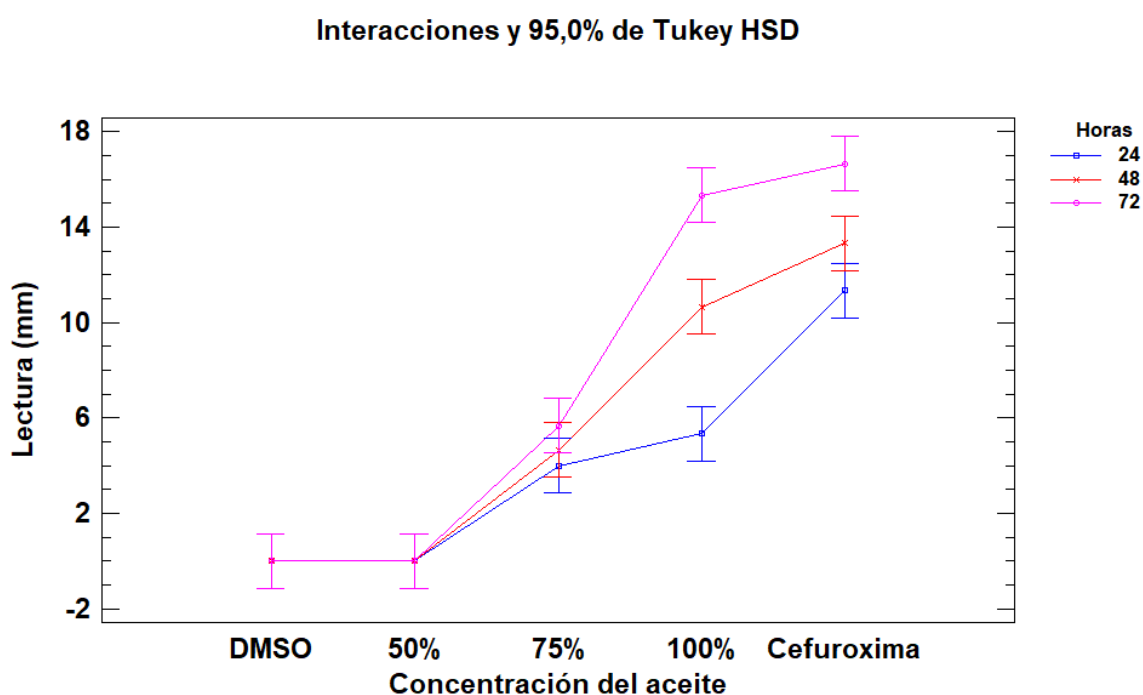
En el gráfico anterior se observa que la Cefuroxima muestra un poder inhibitorio estadísticamente superior al resto de muestras a las 24 y 48 horas.

A las 72 horas no podemos rechazar la hipótesis nula con una significancia del 95% que el efecto inhibitorio de la Cefuroxima sea igual al de la concentración de aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 100%. Ya que según la imagen se observa que los intervalos de Tukey se traslapan.

Por otro lado, podemos confirmar que sí existe efecto inhibitorio del aceite de orégano, pero sólo en sus concentraciones al 75% y 100% ya que sus intervalos de confianza Tukey no se traslapan con el control negativo (DMSO).

Observamos también que el aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 100% muestra un mayor incremento de efecto inhibitorio durante los tres instantes de tiempo, esto lo podemos confirmar al observar la pendiente que forma. Para el caso del aceite de orégano al 75%; si bien muestra una pendiente positiva no es tan pronunciada como el de la concentración al 100%.

Gráfico 6: Interacciones de la concentración y horas respecto al efecto inhibitorio de las hojas de *Origanum vulgare* L (orégano) frente a *Escherichia coli* (ATCC 29522)



Del gráfico anterior 6 observamos la diferencia estadística que existe entre el efecto inhibitorio de las muestras a los diferentes instantes de tiempo. Se observa por ejemplo que para el caso del aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 100% existe una marcada diferencia estadística entre sus efectos inhibitorios a las 24, 48 y 72 horas.

Caso contrario es el aceite esencial de *Origanum vulgare* L (orégano) al 75% ya que según se observa sus intervalos de confianza se traslapan en los diferentes instantes de tiempo.

IV. DISCUSION

IV.1. Discusión de resultados

El gráfico muestra a los grupos de ensayo del estudio, señalando el efecto inhibitorio de la Cefuroxima formado por un halo de inhibición de 24 y 48 horas superior (11.33 mm) a las concentraciones en 50%, 75% y 100% del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (Orégano) sobre las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

El efecto Inhibitorio del aceite de orégano en la concentración al 100% para la *Escherichia coli* presento un halo de inhibición de (15.33 mm), que se clasifica como muy sensible (++) en la escala de Duraffourd.

En las tablas se demuestra la comparación de las muestras del aceite esencial del orégano con el medicamento cefuroxima demostrando su efectividad en ambos casos, pero la cefuroxima tiene un mayor halo inhibitorio de 16. 67 mm.

Se puede inferir que la diferencia de los halos en cada concentración al 50% y 100% se debe probablemente a la mayor concentración metabolitos secundarios de los fenoles que está determinado por el tiempo de incubación.

Otros autores evaluaron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare*, donde comprobaron su efecto antimicrobiano frente a bacterias grampositivas y sobre bacterias gramnegativas.¹⁶

Medrano E, En su investigación muestran su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* midió una media de 8,0 mm, 8,0 mm, 9,3 mm y 14,7 mm, mientras que la actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* midió una media de **8,0 mm, 9,3 mm, 15,7 mm y 12,0 mm**. Estos resultados se obtuvieron a concentraciones del 20%, 40%, 80% y 100%, lo cual se podría considerar similar efecto inhibitorio frente a la *Escherichia coli*. Resultados similares a los hallados en nuestro estudio ⁽¹⁵⁾.

López E, (2018), compararon 3 concentraciones del aceite de *Origanum vulgare L.* (orégano) sobre *staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* el cual no presentó crecimiento bacteriano al 60% y 90%. Efecto similar a los hallados en nuestro estudio ⁽¹¹⁾.

Palmay P, J (2019), Evaluaron la actividad antimicrobiana de *Origanum vulgare L.* (Tipo) utilizando dos métodos diferentes de extracción de compuestos activos del material vegetal (hojas), incluyendo el aceite esencial y el extracto hidroalcohólico, contra cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Salmonella* el tratamiento más eficaz para las cepas de *Escherichia coli* del aceite esencial es a una concentración del 100% (totalmente puro) con un halo medido a 16,33 mm, que se clasifica como muy sensible (++) en la escala de Duraffourd. ⁽¹³⁾. Este hallazgo es similar a los encontrados en nuestro estudio.

Guerrero J, Mejía E, (2021), en su estudio “Efecto antimicrobiano de *Origanum vulgare L* sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*”. Se evaluó mediante el método de difusión en disco de Kirby y Bauer, con discos concentrados al 25, 50, 75 y 100% respectivamente. Cuando se compararon los halos de inhibición utilizando la escala de Duraffourd, los resultados mostraron que el aceite de *origanum vulgare L* tenía un impacto inhibitorio in vitro contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* en todas las concentraciones. ⁽¹⁴⁾.

La diferencia entre los resultados de esta investigación respecto a otras investigaciones se debería a diversos factores que estarían interviniendo para ello. Uno de ellos sería el porcentaje de los componentes que tienen los especímenes estudiados, por ser de procedencia diferente.

IV.2. Conclusiones

- Existe presencia de metabolitos secundarios en el aceite esencial las cuales son: flavonoides, taninos, aminoácidos, saponinas y alcaloides. Son los que probablemente tienen efecto inhibitorio.

- El aceite esencial de *Origanum vulgare* L.(orégano) en la concentración de 75% presentó un porcentaje de un halo de inhibición de (5,67 mm) siendo no sensible mientras que en la concentración al 100 % el halo de inhibición fue (15,33 mm) que fue clasificado como muy sensible (++) según la escala de Duraffourd presentando el efecto inhibitorio en los cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922, in vitro.
- Se comprobó que el aceite de orégano concentrado al 100% sí presenta un efecto inhibitorio frente a los cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922, in vitro a las 48 y 72 horas de su aplicación.
- Se determinó que el aceite de orégano a 50% de concentración no muestra efecto inhibitorio frente a los cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922, respecto a la aplicación de DMSO a las 24, 48 y 72 horas de su aplicación.
- El mejor poder de inhibición frente a los cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922 lo obtuvo la Cefuroxima, seguido de la concentración de aceite de orégano al 100% respectivamente, a las 48 y 72 horas de su aplicación.
- La Cefuroxima y el aceite de orégano al 100% presentan una diferencia mínima en su efecto inhibitorio a las 72 horas de su aplicación, con un nivel de confianza del 95%.
- El menor poder de inhibición frente a los cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922 lo obtuvo el aceite de orégano al 50% durante todo el período experimental el cual no formó halos de inhibición.
- Se determinó que el poder inhibitorio del aceite de orégano frente a los cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922 en sus concentraciones al 100% y la Cefuroxima aumenta a medida que pasa el tiempo entre las 0 horas y las 72 horas de su aplicación que es lo que duró el experimento.

IV.3. Recomendaciones

- Existe el potencial de efecto antimicrobiano en el aceite esencial de *Origanum vulgare* L “orégano” demostrado en varios estudios y corroborado con el nuestro, por lo que se recomienda a futuros investigadores realizar estudios que permitan ampliar el campo de aplicación del aceite.
- El aceite esencial de *Origanum vulgare* L “orégano” se requiere investigar las propiedades antiinflamatorias y antifúngicas que presenta esta planta, debido a que se observa que su efecto inhibitorio varía según la especie microbiológica empleada y el medio del cultivo.
- Se sugiere realizar investigaciones de todas las partes de la planta a fin de comparar el contenido de metabolitos secundarios responsables de la actividad farmacológica y realizar ensayos clínicos en seres humanos.
- Se sugiere a la población e instituciones de salud, el empleo de estos aceites para contrarrestar algunas enfermedades antimicrobianas o como tratamiento complementario al farmacológico, lo que puede llevar a disminuir los índices de resistencia microbiana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rojas, Silva, Sansó, & Alonso, (2013). La Medicina Natural y Tradicional y la Medicina Convencional no responden a paradigmas en pugna
<https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubsalpub/csp-2013/csp133l.pdf>
2. (OMS, 2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional
https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiixlfFier0AhWslLkGHVC1DeAQFnoECAMQAQ&url=https%3A%2F%2Fapps.who.int%2Firis%2Fbitstream%2Fhandle%2F10665%2F95008%2F9789243506098_spa.pdf&usq=AOvVaw3qGyh60p0TvpRCd0F7qh6l
3. Albán-Joaquina, Chilquillo Eder, Melchor Briggithe. (enero - abril, 2021) Categorización de usos de plantas utilizadas por los pobladores de zonas urbanas y rurales del Perú
http://www.scielo.org.pe/pdf/arnal/v28n1/2413-3299-arnal-28-01-85.pdf?fbclid=IwAR3PG6l_IY3fumqhpLGrTH4dnk7iRuDwesx_4t9ZXSfW1rYC7S0B4c0H38U
4. Rumiche, Ramos y Colca, (2018). Suplementación alimenticia con orégano (*Origanum vulgare*) y complejo enzimático en pollos de carne
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6317321>
5. Abdul Qadir, Shahzadi, Bashir, Munir & Shahzard, (2017) Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S2313-29572020000100025&script=sci_arttext
6. Acevedo Di, Navarro M y Monroy L, (2013) COMPOSICION QUIMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE HOJAS DE OREGANO (*Origanum vulgare*)
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v24n4/art05.pdf>
7. Villarreal Jesús Ma, Díaz Miguel Ángel (2016) Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952015000200007&fbclid=IwAR0n3NOdD0bODRLv4Dola2_6laC_niMvZ0zbGiJbFOtD1XIZegKj0ndRMi4

8. Salton MJR, Kim KS (1996). Structure. in: Baron's Medical Microbiology (Baron S et al, eds.) (4th ed. edición). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.

9. Horna Gertrudis, Silva María, Vicente William (2005) Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uro patógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007

10. Paumier et al. 2018 y Pinard et al. 2019

http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S207934802021000100008&script=sci_arttext&lng=es

11. Loeza-Concha, H., Salgado-Moreno, S., Ávila-Ramos, F., Gutiérrez-Leyva, R., Domínguez-Rebolledo, A., Ayala-Martínez, M., & Escalera-Valente, F. (2019). Revisión del aceite de orégano spp. en salud y producción animal. Abanico Agroforestal.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S222479202021000100037#B19

12. Govindarajan, Rajeswarya, Hotib y Benellic, (2016) Estudio de la composición química del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* spp.) de Tacna

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKewjOpvuj_On0AhXQp5UCHQ3NAAkQFnoECAIQAQ&url=https%3A%2F%2Frevistas.ulima.edu.pe%2Findex.php%2FIngenieria_industrial%2Farticle%2Fdownload%2F1801%2F1816%2F&usq=AOvVaw0s7xGmN3SkDwaUVUzQwPqH

13. López EA. (2018.) Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre cepas certificadas de *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*.

[http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27546/1/Tesis 130 Medicina Veterinaria y Zootecnia -CD 568.pdf](http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27546/1/Tesis%20130%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20568.pdf).

14. García G, (2017) busca determinar el efecto inhibitorio del aceite esencial de *Origanum Vulgare* (orégano) en cepas de *Porphyromonas gingivalis*.

<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/9490>

15. Palmay P, J (2019) En este estudio se evalúa la actividad antimicrobiana de *Origanum vulgare L.*

<http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/5527>

16. Guerrero J, Mejía E, (2021), En su investigación “Efecto antimicrobiano de *Origanum vulgare L* sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*”. <https://rpm.pe/index.php/RPMI/article/view/198>

17. Medrano E, Medrano D, (2020), En su investigación “Actividad antimicrobiana y efecto desinfectante del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) frente a *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*”

[/https://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12970/375/ACTIVIDAD%20ANTIMICROBIANA%20Y%20EFECTO%20DESINFECTANTE%20DEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12970/375/ACTIVIDAD%20ANTIMICROBIANA%20Y%20EFECTO%20DESINFECTANTE%20DEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

18. Salazar R, Yerren M (2021), Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Melissa officinalis* (toronjil) y *Origanum vulgare* (orégano) frente a cepas de *Escherichia Coli*.

<http://hdl.handle.net/20.500.14140/641>

ANEXOS

ANEXO A: Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Tabla A: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL DEL *Origanum vulgare L.* MEDIANTE PRUEBA DE SENSIBILIDAD POR DISCOS

: FICHA DE RESULTADOS.

Concentración del aceite de <i>Origanum vulgare L.</i>	Cepas <i>Escherichia Coli</i>			
	Halo de inhibición (mm)			
	N			X
(%)	1	2	3	
50%	0	0	0	0
75%	4	5	6	4,78
100%	6	10	16	10,44

N: Número de ensayos microbiológicos

X: Promedio

Tabla B: Marcha fitoquímica del aceite de *Origanum vulgare L.*

CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	REACCIÓN
Compuestos fenólicos	Prueba Cualitativa	+++
Taninos	Rvo. Gelatina	++
Flavonoides	Rvo. Shinoda	+++
Antraquinona	NaOH	++
Aminoácidos	Rvo. Ninhidrina	+
Alcaloides	Rvo. Mayer	++
	Rvo. Dragendorff	++
Esteroides	Rvo. Lieberman – Burchard	+
Triterpenos		++
Saponinas	Reacción de espuma	++

Leyenda

Reacción muy evidente: +++

Reacción evidente: ++

Reacción poco evidente: +

No hubo reacción: -

DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD DE LAS HOJAS DE *Origanum vulgare* L (orégano)

Determinación de la solubilidad

SOLVENTES	RESULTADOS
Etanol 96%	++
Etanol 70%	+
Metanol	+
Benceno	-
Butanol	+++

Leyenda:

Muy soluble: +++

Soluble: ++

Poco soluble: +

Insoluble:

ANEXO B: Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
Problema General	Objetivo General	Hipótesis General
¿Presentara efecto inhibitorio el aceite esencial de <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) en cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro?	Comprobar el efecto inhibitorio del aceite esencial del <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) en cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro.	En el aceite esencial de <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) posee efecto inhibitorio en bacterias de <i>Escherichia coli</i> in vitro.
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas
1 ¿Qué metabolitos secundarios se encuentra presentes en mayor concentración en el aceite esencial del <i>Origanum vulgare L</i> (orégano)?	Determinar los metabolitos secundarios de mayor concentración en el aceite esencial del <i>Origanum vulgare L</i> (orégano).	Tendrá metabolitos secundarios en el aceite esencial del <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) que posee actividad en cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro
2 - ¿En qué concentración a base de metabolitos secundarios del aceite esencial de <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) posee efecto inhibitorio en cepas <i>Escherichia coli</i> ?	¿Determinar la concentración a base de metabolitos secundarios del aceite esencial del <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) que posee mayor efecto inhibitorio en cepas de <i>Escherichia coli</i> in vitro?	¿tendrá una concentración a base de metabolitos secundarios del aceite esencial de <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) que posee mayor efecto inhibitorio en bacterias <i>Escherichia coli</i> in vitro?
3.- ¿Cuál será el efecto inhibitorio del aceite esencial de <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) en comparación con la cefuroxima?	Determinar el efecto inhibitorio del aceite esencial del <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) en comparación con la cefuroxima.	Existe efecto inhibitorio del aceite esencial del <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) en comparación con la cefuroxima
PROCEDIMIENTO PARA COLECTA DE DATOS USANDO LA FICHA.		
<p>Recolección de la planta <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) Preparación de la Muestra: Limpieza, secado, selección, maceración. Obtención del aceite esencial de las hojas del <i>Origanum vulgare L</i> (orégano), método de arrastre con vapor de agua. Análisis de calidad del aceite: aspecto, color, olor. Actividad antibacteriana: obtención del microorganismo, Reactivación de la cepa bacteriana, preparación del Inóculo bacteriano. Método de suspensión directa de preparación vegetal, Preparación de los discos de sensibilidad. Evaluación antimicrobiana método de difusión en disco en cinco conjuntos de estudio. La Sensibilidad bacteriana se evaluará por el Método de placa de difusión. Métodos de Kirby-Bauer. (Método disco-cultivo). Agar Müeller Hinton. Sembrado del inóculo bacteriano: Incubación, Identificar y rotular las placas. Lectura del efecto Inhibitorio del aceite esencial de las hojas del <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) La lectura del efecto se realizará a las 24, 48 y 72 horas, Preparación del aceite esencial del vegetal para el estudio.</p>		

ANEXO C: Operacionalización de las variables

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	VALOR
V.I Aceite esencial de <i>Origanum vulgare L</i> (orégano)	Extraído a partir de las hojas de <i>Origanum vulgare L</i> (orégano) por el método de arrastre de vapor de agua	Producto obtenido de las hojas del <i>Origanum vulgare L</i> (orégano)	Marcha fitoquímica sensoriales	Metabolitos Secundarios	Concentración del aceite esencial	50% 75% 100%
V.D Efecto inhibitorio	Acción del aceite esencial de inhibir el crecimiento de la bacteria.	Producto obtenido del estudio de la bacteria gram negativa: cepas de <i>Escherichia coli</i> (ATCC 29522)	Microbiológico	Mediciones de halos	Diámetro de halo de inhibición	-Nula: (-) 8mm -Sensible:(+)9-14 mm -Muy sensible:(++)15 -19 mm -ss. (+++) 20 mm

ANEXO D: Consentimiento informado No aplica

ANEXO E: Documentos obtenidos para desarrollo de la investigación

Identificación taxonómica de *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO)



"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

CONSTANCIA N°010-USM-MHN-2022

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama con hojas), recibida de **Anthony Visitación Andrade y Mary Cruz Hualpa Quispe**, de la Universidad María Auxiliadora; ha sido estudiada y clasificada como: ***Origanum vulgare* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de APG IV (2016).

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: *Origanum*

ESPECIE: *Origanum vulgare* L.

Nombre vulgar: "Orégano"
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 09 de marzo de 2022


Dra. Joaquina Alán Castilla
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)


JAC/ddb

Vida Natural Constancia

EL JEFE DE CONTROL DE CALIDAD DEL LABORATORIO FARMACÉUTICO M&G VIDA NATURAL E.I.R.L Q. F LEONOV ASTULLA ROSALES CQFP:09781, DEJA CONSTANCIA QUE:

El análisis microbiológico del trabajo de tesis "EFECTO INHIBITORIO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L (orégano) FRENTE A CEPAS DE BACTERIA GRAM NEGATIVA IN VITRO", se realizó en las instalaciones del área de control de la calidad por **Anthony André Visitacion Andrade y Mary Cruz Hualpa Quispe**, estudiantes de la facultad de ciencias de la salud escuela profesional de farmacia y bioquímica de la Universidad Maria Auxiliadora.

Vida Natural

LABORATORIOS M&G VIDA NATURAL E.I.R.L.
Q.F. LEONOV ASTULLA ROSALES
C. Q. F. P. N° 09781
JEFE DE CONTROL DE CALIDAD

Jefe de control de la calidad

Certificado de UNMSM de Solubilidad



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



Legenda:

+++ : muy soluble
++ : soluble
+ : poco soluble
- : insoluble

SOLUBILIDAD			
ETANOL	--	PROPIA	++
METANOL	--	PROPIA	+
AGUA	-	PROPIA	-
BUTANOL	--	PROPIA	+++
CLOROFORMO	--	PROPIA	-
BENCENO	-	PROPIA	-


Dr. Eduardo Flores Juárez
Gerente General de CENPROFARMA



"ORGANISMO DE LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Av. Pisco Nº 1022, Jesús Bolognesi, Lima 1 - Perú
 T: (011) 476-7000 ext. 4024 F: Ap. Postal 4599 - Lima 1
 E-mail: cenprofarma@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe



Certificado de UNMSM Marcha Fitoquímica



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA

PROTOCOLO DE ANALISIS N° 00621-CPF-2022

ORDEN DE ANALISIS : 08024/2022
 SOLICITADO POR : ANTHONY ANDRE VISITACION ANDRADE
 MARY CRUZ HUALPA QUESPE
 MUESTRA : Aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano)
 FECHA DE RECEPCION : 26 de Abril del 2022

MARCHA FITOQUÍMICA			
METABOLITOS	ENSAYO	MÉTODOS	RESULTADOS
ANTRAQUINONAS	Reacción de Borntrager	Cualitativa	++
ALCALOIDES	Reacción de Dragendorff	Cualitativa	++
	Reacción de Mayer	Cualitativa	++
	Reacción de Wagner	Cualitativa	++
GLICOSIDOS	Reacción de Vanilla - ac. Sulfúrico	Cualitativa	++
FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	Cualitativa	+++
AMINOACIDOS	Reacción de Ninhedrina	Cualitativa	+
CARBOHIDRATOS	Reacción de Molish	Cualitativa	++
ESTEROIDES	Reacción de Liebermann-Burchard	Cualitativa	++
SAPONINAS	Reacción de espuma	Cualitativa	+++
TANINOS	Reacción de cloruro férrico	Cualitativa	++
TRITERPENOS	Reacción de Liebermann-Burchard	Cualitativa	++
AZUCARES REDUCTORES	Reacción de Fehling	Cualitativa	++
FENÓLES	Reacción de Cloruro férrico	Cualitativa	+++

Dr. Eduardo Flores Juárez
Gerente General de CENPROFARMA



"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

Av. Pisco N° 1002, Jardín Botánico, Lima 1 - Perú
 T: (011) 420-7000 ext. 4824 E: Ap. Postal 4599 - Lima 1
 E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe http://farmacia.unmsm.edu.pe





ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS INFORME N° 825-2022

1. IDENTIFICACION DEL SOLICITANTE

Nombre: Anthony André Visitación Andrade
DNI: 46113108
Nombre: Mary Cruz Hualpa Quispe
DNI: 70433260
Universidad: María Auxiliadora
Facultad: Ciencias de la Salud
Escuela Profesional: Farmacia y Bioquímica

2. IDENTIFICACION DE LA MUESTRA

Ingrediente activo: Aceite esencial de *origanum vulgare* L. (oregano)
Cantidad recibida: 01 frasco de vidrio x 38ml de Aceite esencial de *origanum vulgare* L. (oregano)
Diluyente: Agua desionizada
Control positivo: Cefuroxima (30 ug)
Lote CIP28 Vence: marzo 2024
Dimetilsulfóxido (DMSO)
Control negativo:
Cepas bacterianas
Utilizadas para enfrentamiento: *Escherichia Coli* ATCC 25922
Fecha de análisis: 19 de abril del 2022
Fecha de reporte: 22 de abril del 2022

3. METODO DE ANALISIS:

Evaluación microbiológica *in vitro*. Método de difusión en agar por discos

3.1 Medio de cultivo: Agar Mueller Hinton (AMH)
3.2 Inoculo: 0.5 Mc Farland (1×10^8 UFC/mL)
3.3 Discos: Por excavación en agar
3.4 Repeticiones: Tres
3.3 Tiempo de incubación: 24 ± 2 horas a 35 ± 13 C, en aerobiosis.

4. DATOS DEL ENSAYO

4.1. Concentraciones de Aceite esencial de *origanum vulgare* L. (oregano). Según protocolo recibido, volumen final 1000 uL.

CONCENTRACION (%)	ACEITE ESENCIAL (uL)	DILUYENTE (uL)
100	1000	0
75	750	375
50	500	250

Bigo. Néil Azabache V.
C.B.P. 4001



5. CONTROLES

Muestra	Medio de cultivo	Resultado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	APC	Crecimiento
Sin sembrar (control del medio)	APC	No hubo crecimiento
Excavación con DMSO	APC + <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ausencia de halo
Excavación de Cefuroxima	APC + <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Presencia de halo

6. RESULTADOS

6.1. Evaluación microbiológica *in vitro* de Aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (oregano).

Método excavación en agar. Halos de inhibición en milímetros (mm)

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 n	100 %	75 %	50 %
1	10,22	4,55	0,0
2	10,33	4,66	0,0
3	10,44	4,77	0,0

n= número de repeticiones

Método utilizado: Kirby Bauer y col. Modificado

6.2. Evaluación microbiológica *in vitro* de discos de cefuroxima (control positivo). Método excavación en agar. Halos de inhibición en milímetros (mm).

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 n	30 µg
1	13,5
2	13,6
3	13,7

n= número de repeticiones.

Método utilizado: Kirby Bauer y col. Modificado


Bigo. Néil Azabache V.
C.B.P. 4001



BIOEN LAB S.A.C.

6.3. Evaluación microbiológica *in vitro* de DMSO (control negativo). Metodo excavación en agar. Halos de inhibición en milímetros (mm).

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>n</i>	100 %
1	0,0
2	0.0
3	0,0

n= número de repeticiones.

Método utilizado: Kirby Bauer y col. modificado.


Bigo. Néil Azabache V.
C.B.P. 4001

Av. Guardia Civil 1041.Los Inkas E-302. Santiago de Surco. Tf: 309-1514. E-mail: neilazabache@gmail.com
Celular:944-986145

Certificado de Análisis de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-535** Reference Number: ATCC® 25922™* Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2023/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Kassandra L Hall Release Date: 2021/11/24
---	---

Performance	
Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic: one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough Microscopic Features: Gram negative straight rod	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 15 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE </div>

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.



Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2021-11-10T14:54:01.452 CMC

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
F4 (+++) (A)	335-535	Escherichia coli	2.51

Comments:

closely related to Shigella / Escherichia fergusonii and not definitely distinguishable at the moment

ANEXO F: Evidencias fotográficas del trabajo de campo

Obtención de la muestra de las hojas de *Origanum vulgare* L. (Orégano)

Fotografía N° 1 Trituración y el pesado de la muestra de las hojas de *Origanum vulgare* L. (Orégano)



Fotografía N° 2 y 3 Destilación, filtrado de la solución oleosa. (obtención del aceite esencial).



Fotografía N° 4 y 5 Separación de la solución en pera de bromo y obtención del aceite esencial de orégano



Fotografía N° 6 y 7 Preparación de las concentraciones del aceite *origanum vulgare L* (orégano) al 50 %, 75 % y 100 %

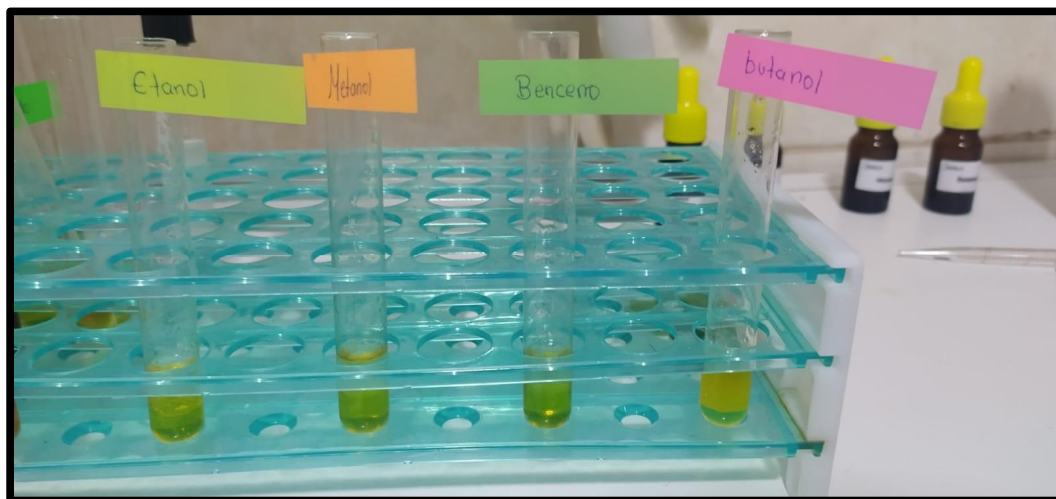


Materiales y reacciones del proceso de la solubilidad del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare L.* (Orégano)

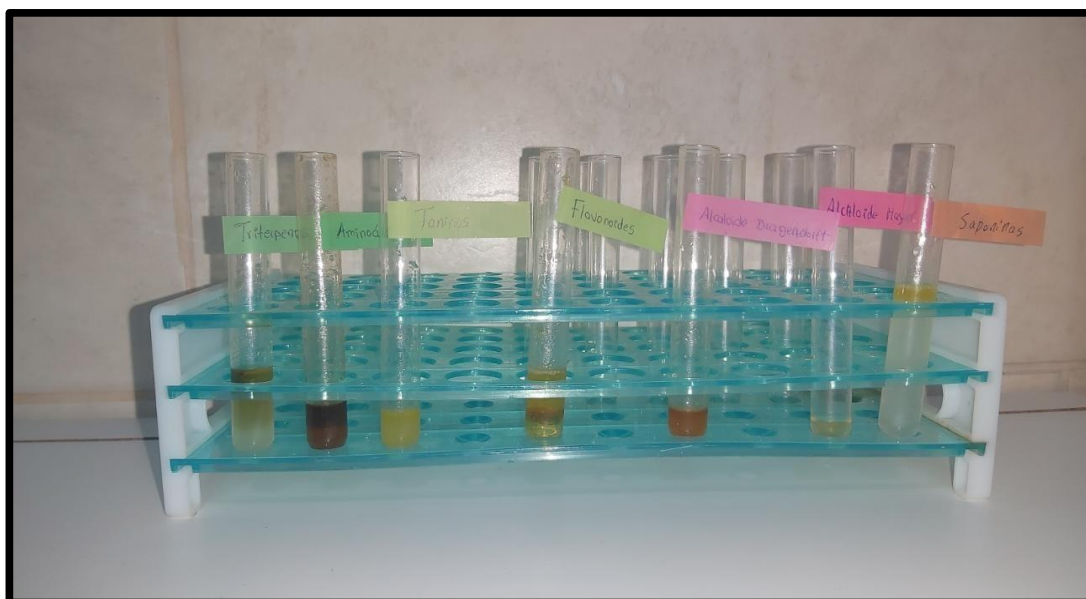
Fotografía N° 8 Reactivos para la prueba de solubilidad



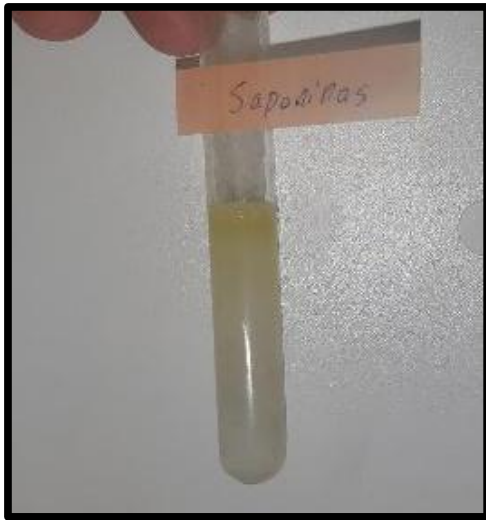
Fotografía N° 9 Resultados obtenidos del proceso de solubilidad del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. (Orégano)



Fotografía N° 10 Resultados del Tamizaje fitoquímico del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. (Orégano)



Fotografía N° 11 Saponinas-RX. Espuma (++)



Fotografía n°12 Alcaloides

- Rvo. Mayer (++)
- Rvo. Dragendorff (++)



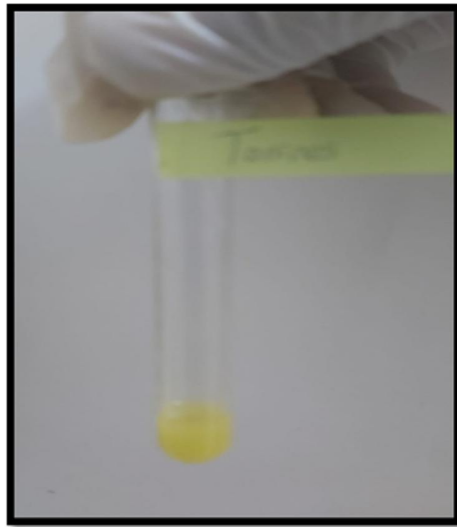
Fotografía N° 13 Flavonoides-Rvo. Shinoda (+++)



Fotografía n° 14 Saponinas- Rvo. Lieberman – Burchard (+++)



Fotografía N° 15 Saponinas- Rvo. Gelatina – (++)



Fotografía n° 16 Aminoácidos- Rvo. Ninhidrina – (+++)



Proceso de ensayo microbiológico, análisis de sensibilidad sobre los cultivos para determinar el Efecto Inhibitorio.

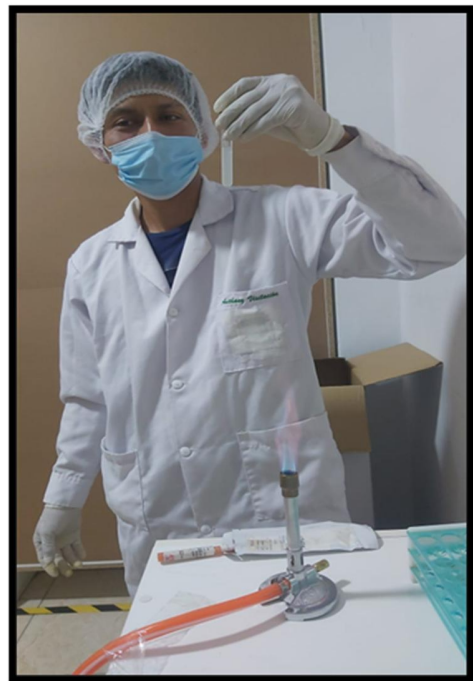
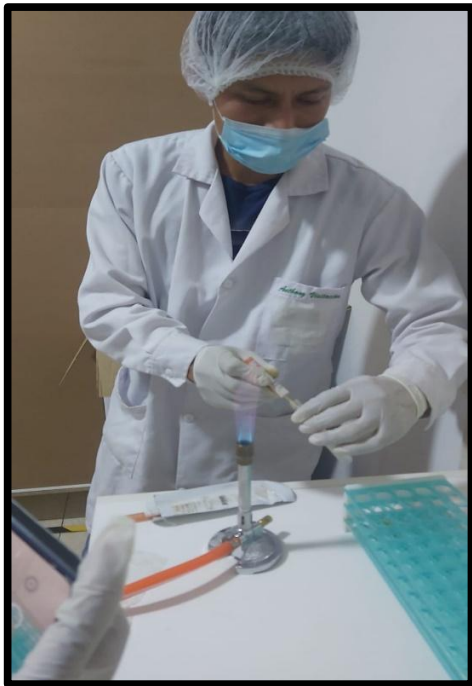
Fotografía N° 17 Material requerido disponible en mesa de trabajo previamente desinfectado



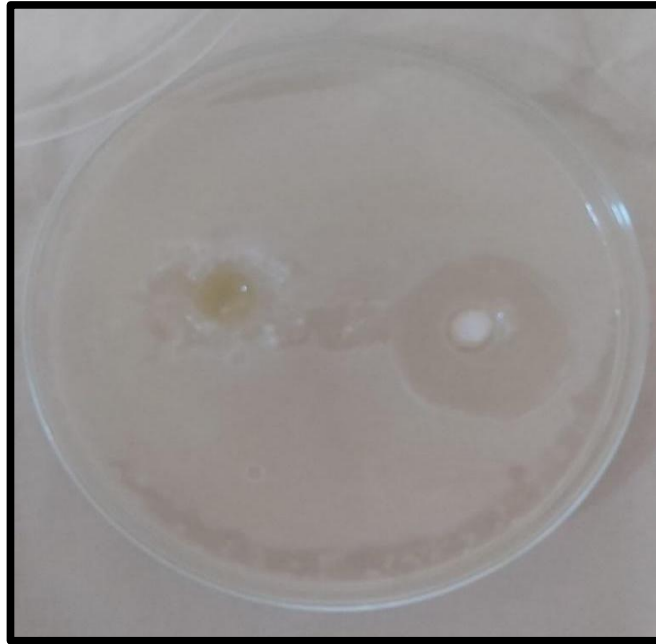
Fotografía n° 18 y 19 kwik-Stik contenidos con los pallets de cepas liofilizadas



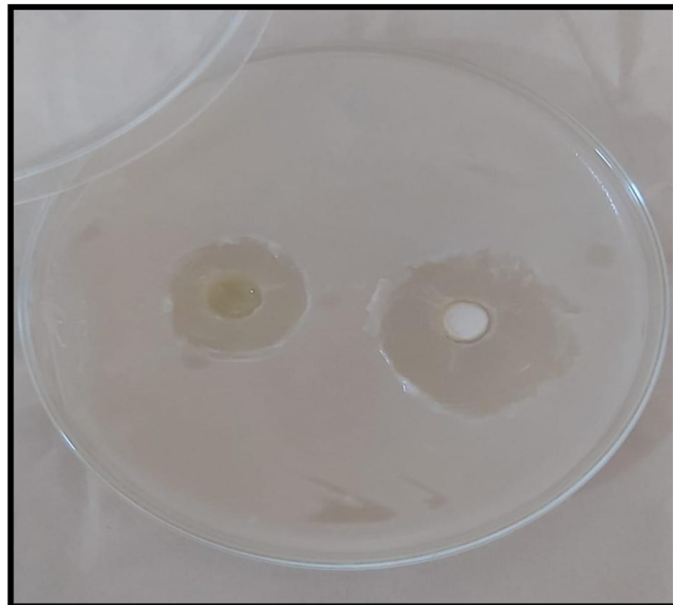
Fotografía N° 20 y 21 Activación de la cepa *Escherichia coli* ATTC 25922



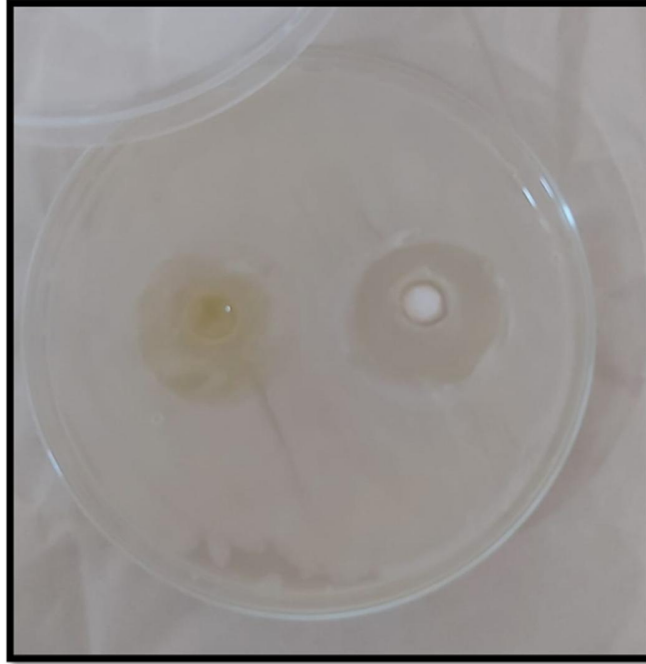
Antibiograma, aceite esencial al 50 %



Antibiograma, aceite esencial al 75 %



Antibiograma, aceite esencial al 100 %



Antibiograma Múltiple, con aceite esencial al 50%, 75%, 100 %

