

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA



Efecto in vitro del aceite de *Origanum vulgare*
sobre *Salmonella Typhi*

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO CIRUJANO

AUTOR:

Ivania Lorena Morillas Terrones

ASESORA:

Dra. Elva Mejía Delgado

TRUJILLO - PERU

2015

DEDICATORIA

A Dios por mostrarme día a día que con humildad, paciencia y sabiduría toda es posible, A la virgen Maria que siempre guio mis pasos fue mi guia y fortaleza.

A mis padres por ser mis ejemplo a seguir por estar siempre pendientes de mi bienestar ,por amarme y brindarme, apoyo y comprensión incondicional, siempre tuvieron una palabra de aliento en los momentos difíciles siempre me demostraron el sacrificio que en algun momento todos debemos hacer para seguir el camino correcto. por inculcarme el deseo de salir adelante y de ser mejor cada día.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, Dra. Elva Mejia Delgado por su apoyo incondicional y por guiarme y acompañarme en la realización de este trabajo.

A mis padres por su amor y apoyo moral que siempre me han transmitido, el cual me permitió lograr y culminar mi carrera profesional, que es para mí la mejor de las herencias.

A mis hermanas por ayudarme cada día a cruzar con firmeza el camino de la superación.

A mis abuelos por su constantes consejos que me ayudaron a no rendirme a lo largo de mi carrera.

A mis maestros universitarios por brindarme enseñanzas y conocimientos día a día que me ayudara como profesional.

INDICE

	Pag.
RESUMEN	1
ABSTRACT	2

I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	9
III. RESULTADOS.....	21
IV. DISCUSIÓN.....	26
V. CONCLUSIONES.....	29
VI. RECOMENDACIONES.....	29
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXOS.....	34

RESUMEN

Objetivo: Comparar el efecto antimicrobiano *in vitro* de cuatro concentraciones de aceite de *Origanum vulgare* (orégano) frente a *Salmonella typhi*.

Material y Métodos: Se llevó a cabo un estudio de tipo comparativo, longitudinal, prospectivo, experimental. La población de estudio estuvo conformada por el conjunto de placas inoculadas con las cepas de *Salmonella*, aplicándoseles aceite de *Origanum vulgare* (orégano) observando su efecto antibacteriano para dichas cepas.

Resultados: En el presente trabajo se observó que el aceite etanólico de *Origanum vulgare* (orégano) tuvo efecto inhibitorio *in vitro* frente a *Salmonella typhi* al comparar los halos de inhibición según escala de Duraffourd para las 4 concentraciones utilizadas obteniendo valores por encima de 20 mm con 0 UFC, teniendo como CMI 25%; además se observó que hubo una diferencia dosis dependiente debido a que los grupos mostraron tener diferencia estadística no significativa ($p < 0,05$). Comprobándose tener una eficacia del 100% sobre esta medida de la cepa frente al aceite etanólico de *Origanum vulgare* (orégano).

Conclusiones: Demostramos que el aceite de *Origanum vulgare* (orégano) tiene efecto sobre *Salmonella typhi*, siendo la concentración inhibitoria mínima del 25%.

Palabras Clave: *Origanum vulgare*, *Salmonella Typhi*, concentración mínima inhibitoria, unidades formadoras de colonias.

ABSTRACT

Objective: To compare the antimicrobial effect in vitro of four concentrations of oil *Origanum vulgare* (oregano) against *Salmonella typhi*.

Material and Methods: A comparative, longitudinal, prospective, experimental type was conducted. The study population consisted of whole inoculated with strains of *Salmonella* and generally apply oil of *Origanum vulgare* (oregano) observing its antibacterial effect for these strains plates.

Results: In this study we observed that the ethanol oil *Origanum vulgare* (oregano) had inhibitory effect in vitro against *Salmonella typhi* by comparing the inhibition halos according scale Duraffourd 4 concentrations used for obtaining values above 20 mm 0 UFC, with the CMI 25%; it was observed that there was a dose-dependent difference because the groups were shown to have no statistically significant difference ($p < 0.05$). This project has an efficiency of 100% on this measure strain against the ethanolic oil *Origanum vulgare* (oregano)

Conclusions: In the present work demonstrates that oil *Origanum vulgare* (oregano) has effect on *Salmonella typhi*, with a minimum of 25% inhibitory concentration.

Keywords: *Origanum vulgare*, *Salmonella Typhi*, minimum inhibitory concentration, colony forming units

I. INTRODUCCIÓN

Los cambios y adaptaciones microbianas han generado el fenómeno de resistencia a los antibióticos en cepas patógenas bacterianas, que es un problema de salud a nivel mundial. Las cepas patógenas resistentes han surgido principalmente en los hospitales a consecuencia de varios factores como son el amplio uso de antibióticos, las dosis utilizadas, el tiempo de tratamiento, y la eliminación de la mitad de la droga que no se alcanza a metabolizar en su totalidad, las altas posibilidades de transmisión o contagio y el estado inmunocomprometido de los pacientes que los hacen susceptibles a infecciones con patógenos oportunistas. Existen otros dos elementos que favorecen el surgimiento de este fenómeno: el uso inadecuado de antibióticos y la adaptación bacteriana a los diferentes ambientes (1).

La actividad antimicrobiana de aceite de orégano se atribuye principalmente a la acción de sus principales componentes fenólicos, el carvacrol y el timol, que muestran gran actividad bactericida. (2, 3) Debido a su carácter hidrofóbico, el carvacrol y el timol interactúan con los lípidos de la membrana citoplásmica causando la pérdida de la integridad y la pérdida de material celular tales como los iones, ATP y ácidos nucleicos (4) Por lo tanto, el carvacrol y el timol, solos o en aceite de orégano, podría difundirse a través de la matriz de polisacáridos del biofilm y desestabilizarlo debido a sus fuertes propiedades antimicrobianas intrínsecas. En algunos estudios, los efectos in vitro del aceite esencial *O. vulgare*, el carvacrol y el timol son evaluados en las biopelículas de *Staphylococcus* y sorprendentemente la actividad in vitro de los aceites en las biopelícula fue sólo ligeramente inferior a la de cultivo plancton; concluyendo que la concentración inhibitoria de biofilm es de 0.125-0.500%, v/v y la concentración de erradicación de biofilmesta entre 0.25-1.0%, v/v, para orégano (5,6,7).Es indudable la importancia de la medicina natural para la medicina moderna, durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que disponía el médico; todas las culturas, a lo largo y ancho del planeta y en todos los tiempos, han usado las plantas medicinales como base de su propia medicina. (8)

La humanidad ha utilizado las plantas para curarse durante toda su historia, la incidencia de los productos de origen vegetal en la terapéutica ha variado a lo largo de los tiempos, de acuerdo con los avances del conocimiento científico tanto sobre estos productos como sobre las demás herramientas terapéuticas. (9)

De las 250.000 especies de plantas con flores en el mundo, más de 20.000 - casi el 10% del total - se clasifican como hierbas. Hierbas escogidas por la gente de la naturaleza han sido un elemento esencial factor en la atención de salud en todo el mundo a través del tiempo y en todas las culturas. Hoy en día, alrededor del 80% de la población del mundo confían sobre medicamentos tradicionales a base de plantas, para cuidar su salud primaria. (10)

El conocimiento de las plantas medicinales fue durante mucho tiempo el único recurso terapéutico de muchas comunidades y grupos étnicos. El uso de plantas como tratamiento para curar enfermedades ha sido desde los primeros tiempos (11)

Con respecto a la actividad antimicrobiana, las plantas de la familia *Lamiaceae* son de interés debido a su potencial efecto antimicrobiano. Muchas especies de esta familia, son plantas medicinales que producen aceites esenciales y también se utilizan como condimento o como flores ornamentales. Entre ellos destaca el *Origanum vulgare*. (11)

El orégano juega un papel primordial en el comercio mundial, se cultiva en los países europeos y es una de las hierbas más populares en el Mediterráneo, se comercializa en forma de hojas secas, así como su aceite esencial que se utiliza medicinalmente, El aceite volátil del orégano se ha utilizado tradicionalmente para las vías respiratorias trastornos de digestión, la caries dental, la artritis reumatoide y trastornos del tracto urinario. (12)

Además, en los últimos años, gracias a la presencia del timol y el carvacrol entre sus aceites esenciales, se han desarrollado aplicaciones medicinales para esta hierba como sedante, antiespasmódica, carminativa y antioxidante, entre otras (13).

Las plantas de uso tradicional ofrecen posibilidades para la búsqueda de principios bioactivos o Etnomedicina siendo una alternativa de uso de antisépticos estándar (14).

Las cepas de *Salmonella* son una de las principales causas de infecciones de origen alimentario en los países industrializados. Las aves y sus productos derivados, así como la

carne y los huevos, son conocidos desde hace tiempo como una fuente de infección de *Salmonella* entérica. (15)

Las especies de *Salmonella* son bacterias Gram-negativas intracelulares que se distribuyen a nivel mundial. Los serotipos de la *Salmonella* entérica, *typhimurium*, *enteritidis* y *typhi* causan la gran mayoría de las infecciones de humanos a escala mundial. (16)

Salmonella typhi es el agente etiológico de fiebre tifoidea, enfermedad que se caracteriza por fiebre alta, cefalea, compromiso del estado general, anorexia. El estreñimiento es frecuente en adolescentes y adultos, la diarrea puede ocurrir en niños. La bacteria se adquiere a través del consumo de alimentos o aguas contaminadas, contacto directo con heces contaminadas, el periodo de incubación es de una a 3 semanas. Aproximadamente el 10% de las personas no tratadas pueden permanecer como portadoras por 2 a 3 meses (17).

La fiebre tifoidea en raras ocasiones es producida por *Salmonella paratyphi* A, *paratyphi* B (*Salmonella schottmuelleri*) y *Salmonella paratyphica* C (*Salmonella hirschfeldii*) pueden producir un cuadro clínico similar, aunque de menor gravedad. Estas salmonellas sólo afectan al ser humano. (18)

Aunque la infección intestinal, que se transmite al hombre a través de alimentos contaminados, es la forma clínica más importante, *Salmonella sp* también puede causar otros procesos tales como bacteriemias, artritis, meningitis, y abscesos de órganos y tejidos, entre otros. (19)

El efecto antimicrobiano ha sido demostrado in vitro frente a decenas de microorganismos y se ha vuelto a confirmar recientemente a través de la investigación in vitro de cuatro bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans* y *S. viridans*, cuatro bacterias Gram negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *E. cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*. (20)

Antecedentes:

Ortega M., en México (2010) tuvo como materiales: hojas del orégano y los microorganismos cuyas cepas se utilizaron fueron: Bacterias Gram–positivo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria ivanovii* y *Listeria monocytogenes*; y bacterias Gram–negativo *Salmonella Senftemberg*, *Salmonella Choleraesuis*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* K88, *Escherichiacoli* O157:H7 y *Escherichia coli* ATCC25922. Como resultado el estudio in vitro demostrando actividad antibacteriana de especias y aceites esenciales *Lippia* contra algunas bacterias Gram–negativas y Gram–positivas excepto para *S. epidermidis*. La fuerte actividad antimicrobiana podría estar vinculada a su mayor contenido de monoterpenicos fenólico, acetato de timol, eugenol y concentración de metileugenol. (21)

Chávez L, Perú (2008) realizó un estudio tipo prospectivo, transversal y experimental y tuvo como materiales: aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) y bacteria *E.coli* ATCC 25922. Comprobándose el efecto antibacteriano del aceite esencial de Orégano contra *E. coli*, en una concentración del 75%. Este resultado coincide con un gran número de estudios, en los cuales además de demostrar su efecto antibacteriano se ha determinado que los componentes más importantes que brindan la propiedad antibacteriana al orégano son Carvacrol y Timol. (22)

De la Cruz A. México (2007) tuvo como materiales: plantas de orégano mexicano (*Lippia berlandieri Schauer*) y los microorganismos cuyas cepas de *Vibrio* se utilizaron fueron *V. alginolyticus* 516, *V. mimicus* 602, *V. parahaemolyticus* 320 y *V. vulnificus* 610. Los resultados de CMI y CMB indican que el efecto antimicrobiano del orégano mexicano y de sus aceites esenciales, fue bactericida más que inhibitorio sobre las cinco especies de *Vibrio* analizadas en este estudio. A 35 °C los aceites de orégano presentaron una mejor efectividad antimicrobiana, ya que lograron reducir hasta siete ciclos logarítmicos en 30 min, efectividad que también se logró a 5 °C pero con tiempos mayores. (23)

Albado E. Perú (2001) tuvo como materiales muestras desecadas de hojas y tallos del "orégano" y los microorganismos cuyas cepas se utilizaron fueron las bacterias gram-negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis* y *Vibrio cholerae* y las bacterias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Dando como resultados de los microorganismos evaluados solo *Pseudomonas aeruginosa* mostró resistencia, esto confirma que el aceite esencial del orégano posee efecto antimicrobiano frente a bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias Gram negativas. (24)

En la actualidad no se reportan estudios a nivel local sobre el efecto bactericida del aceite de *Orégano vulgare* sobre *Salmonella typhi*

Justificación:

Desde la antigüedad se sabe los beneficios del orégano y el impacto de este sabiendo que este de Vegetal perteneciente a la familia *Lamiaceae* de hasta 80 cm. Tallos erectos, filosos y aromáticos. Hojas ovales, pecioladas, dentadas o enteras. Flores rosadas, vioáceas o blancas de hasta 7 mm, reunidas en inflorescencias redondeadas terminales. Estambres sobresalientes. En herbazales secos y al lado de los bosques.

Su nombre botánico *Origanum vulgare*, que deriva del griego, significa, "esplendor de la montaña". La mayoría de las plantas medicinales presentan efectos fisiológicos múltiples, debido a que poseen más de un principio activo que actúan inhibiendo el crecimiento de microorganismos generando así un gran interés por parte de los investigadores en estudiar las sustancias naturales que posean propiedades antimicrobianas, no sólo porque en el Perú existe una gran variedad de productos naturales tal como *Origanum vulgare* (orégano) que es de fácil acceso a la población, también debido a que actualmente los microorganismos patógenos están siendo resistentes a los antibióticos de uso común dentro de estos microorganismos se encuentra *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Salmonella typhi* por eso se dirige los estudios a utilizar productos naturales como métodos alternativos frente a

microorganismos. Por otro lado es relevante mencionar el aumento de pacientes inmunocomprometidos a los cuales los antibióticos les afecta., en tal sentido se plantea evaluar el efecto antimicrobiano in vitro del *Origanum vulgare* frente a *Salmonella typhi*.

1. Formulación del problema científico:

¿Cuál es el efecto in vitro de cuatro concentraciones de aceite de *Origanum vulgare* (orégano) sobre *Salmonella Typhi*?

2. Objetivos

2.1. Objetivo general:

Comparar el efecto antimicrobiano *in vitro* de cuatro concentraciones de aceite de *Origanum vulgare* (orégano) frente a *Salmonella typhi*.

2.2. Objetivos específicos:

Determinar la concentración inhibitoria mínima de cuatro concentraciones del *Origanum vulgare* frente a *Salmonella typhi*.

Determinar la susceptibilidad de *Salmonella typhi* frente a cuatro concentraciones de aceite de *Origanum vulgare* (orégano)

3. Hipótesis

Hipótesis nula (H₀):

No existe efecto bactericida in vitro de las cuatro concentraciones del aceite de *Origanum vulgare* sobre *Salmonella typhi*.

Hipótesis alterna (H_a):

Existe efecto bactericida in vitro del aceite de *Origanum vulgare* sobre *Salmonella typhi* y el efecto es proporcional a la concentración utilizada.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Población Diana o Universo:

La población estará conformada por el conjunto de placas inoculadas con las cepas de *Salmonella* ATCC19430

2. Poblaciones de Estudio:

La población estará conformada por el conjunto de placas inoculadas con las cepas de *Salmonella*

3. Muestra:

3.1. Unidad de Muestreo

Unidades formadoras de colonias de *Salmonella tiphy* y producto del efecto antibacteriano del aceite de orégano.

3.2. Tamaño muestral:

Para calcular en número de halos, se consideró que los antibióticos de uso común presentan 80% de alta efectividad frente al 28% del aceite de orégano.

$$n = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 (p1.q1 + p2.q2)}{(p1 - p2)^2}$$

Donde:

n = Número de elementos necesitados en cada uno de los dos grupos

p1= Proporción estimada con el atributo del grupo 1

p2 = Proporción estimada con el atributo del grupo 2

q1 = 1 - p1

q2 = 1 - p2

$p_2 - p_1$ = Mínimo nivel de diferencia que desea detectar entre los dos grupos (En estudio y contraste)

Z_α = Desviación normal para error alfa. Para 0,05 y dos colas $Z_\alpha = 1.96$

Z_β = Desviación normal para error beta. Para 0,2 y una cola $Z_\beta = 0.84$

Reemplazando valores:

$p_1 = 0,80$

$p_2 = 0,28$

$q_1 = 0,20$

$q_2 = 0,72$

$Z_\alpha = 1,96$

$Z_\beta = 0,84$

$$(1,96 + 0,84)^2 ((0,80)(0,20) + (0,28)(0,72))$$

$$n = \frac{\quad}{\quad}$$

$$(0,28 - 0,80)^2$$

$$n = 10$$

La muestra estará conformada por 10 aplicaciones (repeticiones) de cada concentración y de los controles, haciendo un total de 100 aplicaciones (repeticiones) para cada microorganismo, distribuidas de la siguiente manera:

- o Para determinar la susceptibilidad:

Origanum vulgare.al 25%: 10 aplicaciones (repeticiones)

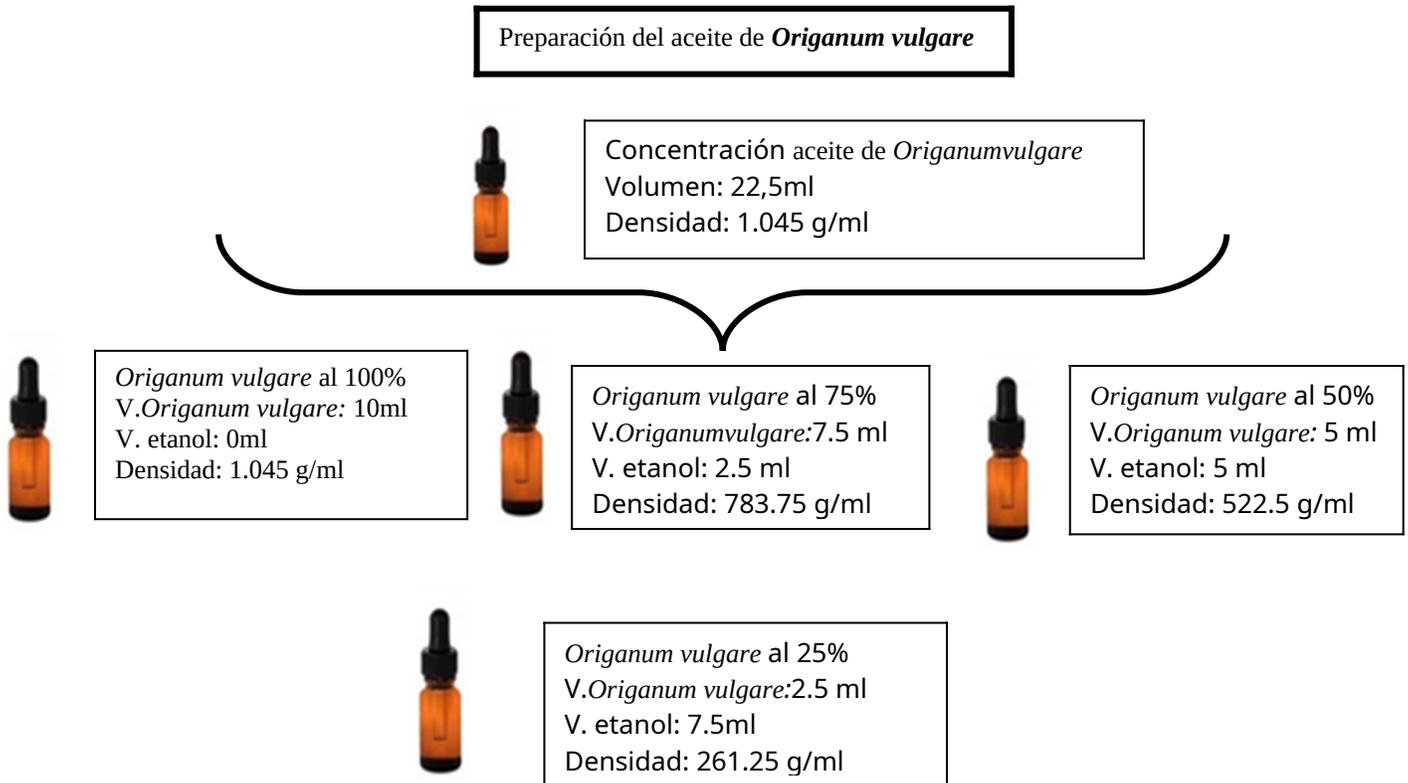
Origanum vulgare.al 50%: 10 aplicaciones (repeticiones)

Origanum vulgare.al 75%: 10 aplicaciones (repeticiones)

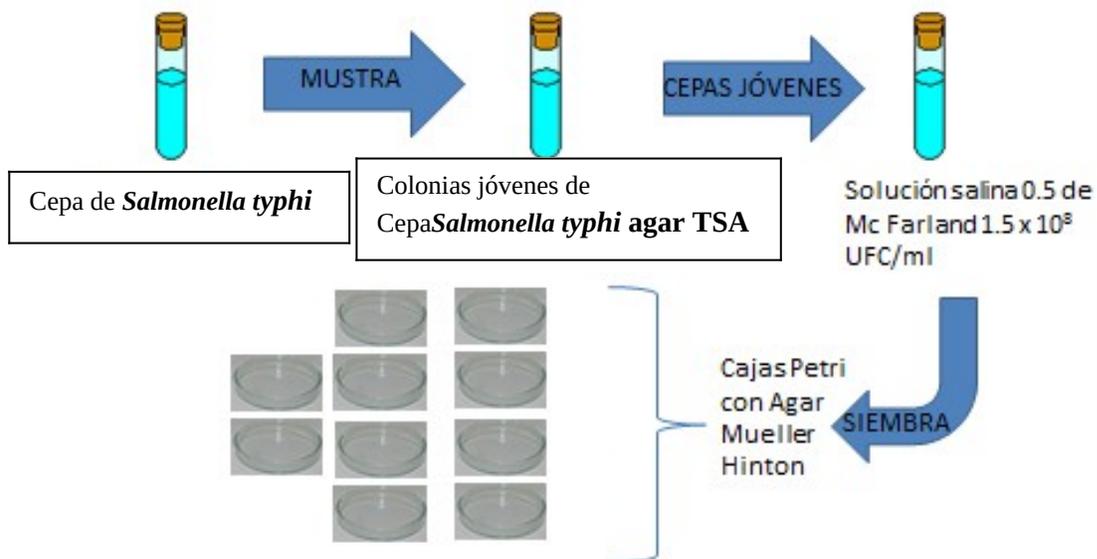
Origanum vulgare.al 100%: 10 aplicaciones (repeticiones)

- o Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM):
 - Origanumvulgare*.al 25%: 10 aplicaciones (repeticiones)
 - Origanumvulgare*.al 50%: 10 aplicaciones (repeticiones)
 - Origanumvulgare*.al 75%: 10 aplicaciones (repeticiones)
 - Origanumvulgare*.al 100%: 10 aplicaciones (repeticiones)

4. Diseño de Estudio



**EFECTO DEL *Origanum vulgare*
SOBRE *Salmonella typhi***



Operacionalización de Variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALAS DE MEDICIÓN
DEPENDIENTE: EFECTO BACTERICIDA	Impedimento del desarrollo de un microorganismo, llámese <i>Salmonella</i> <i>Salmonella typhi</i>	(Indicadores) EFECTO BACTERICIDA: Se medirá mediante mm a través de los halos de inhibición antimicrobiana. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM): Se medirá el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), mediante el uso del contador de colonias	CUANTITATIVA Mediante escala de Durafford. UFC: bact/mL	DE RAZÓN
<u>INDEPENDIENTE</u> <u>ORIGANUM</u> <u>VULGARE</u>	Es una especie aromática oriunda del Oriente Medio, en los últimos años, gracias a la presencia del timol y el carvacrol entre	NOMINAL Se medirá mediante su aplicación en diversas concentraciones: 25%.50%,75% y	CUALITATIVA	ORDINAL

	<p>sus aceites esenciales, se han desarrollado aplicaciones medicinales.</p>	100%		
--	--	------	--	--

5. Procedimientos:

A) De la aprobación del proyecto:

El primer paso para la realización del presente estudio de investigación fue la obtención del permiso para la ejecución mediante la aprobación del proyecto por el Comité Permanente de Investigación Científica de la Escuela de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego con la correspondiente Resolución Decanal.

B) De la autorización para la ejecución:

Una vez aprobado el proyecto se procedió a solicitar el permiso para poder trabajar en el Laboratorio de Investigación de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego.

C) De la obtención del orégano:

Se utilizó *Origanum vulgare* (orégano) procedente de Huamachuco una vez obtenido se llevó una muestra al director del Museo de Historia Natural de la Universidad Privada Antenor Orrego para su evaluación.

D) Obtención del Aceite Esencial de Orégano:

Con la ayuda de un químico farmacéutico especialista en Farmacognosia de la Universidad Nacional de Trujillo, se realizó la selección manualmente y se eliminaron las hojas que no se muestren aptas para su procesamiento.

El aceite esencial de *Origanum vulgare* se obtuvo de las hojas secas (10Kg) mediante el proceso de destilación por arrastre de vapor de agua, hasta obtener 6 ml de aceite esencial. Para ello se colocó 1,5 Kg de *Origanum vulgare* en cada canastilla de una autoclave, asegurando que no esté en contacto directo con el agua; luego, se calentó hasta el desprendimiento de vapor de agua conteniendo el aceite esencial a través de los refrigerantes de vidrio, siendo recolectados en una pera de decantación; se dejó en reposo hasta observar la separación del agua y del aceite, procediéndose luego a su decantación. El aceite obtenido fue sometido a desecación con sulfato de sodio anhidro; luego fue filtrado con ayuda de una bomba de vacío, finalmente el aceite se depositó en frasco herméticamente cerrado el cual fue almacenado en refrigeración hasta su uso.

E) Obtención de las diluciones:

El aceite de orégano obtenido de destilación por arrastre de vapor, fue diluido al 100%, 75%, 50%, 25%. Dichas diluciones fueron guardadas a 4°C para el estudio microbiológico.

F) Obtención de la cepa:

En este estudio se utilizaron cultivos puros de la *Salmonella typhi* ATCC 19430 las cuales se mantuvieron en el cepario del laboratorio de la Sección de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo.

G) Preparación del inóculo:

Obtenidas las cepas, éstas se cultivaron en tubos de ensayo cerrados herméticamente conteniendo el medio agar Soya tripticasa para *Salmonella typhi*.

Se incubaron a 37°C con el fin de obtener colonias jóvenes. Luego de 24 horas se prepararon los inóculos diluyendo las cepas en solución salina estéril, hasta obtener una turbidez semejante al tubo número 0,5 de la escala de Mac Farland. Los tubos fueron girados entre las manos durante 30 segundos antes de proceder al sembrado para distribuir los microorganismos uniformemente.

H) Prueba del efecto antimicrobiano: susceptibilidad de *Salmonella typhi* frente a cuatro concentraciones de *Origanum vulgare* (orégano).

Un hisopo estéril fue embebido con la cepa preparada y a una distancia de 10 cm de la llama del mechero se procedió al sembrado en camada en placas petri conteniendo Agar Mueller Hinton para las cepas de *Salmonella typhi*, se sembró uniformemente sobre toda la superficie del agar, girando cada placa 30 grados 10 veces aproximadamente. Las placas recién sembradas fueron incubadas a 37° C por 24 horas.

Para determinar la susceptibilidad se utilizó el método de difusión de discos Kirby y Bauer, el cual consistió en preparar discos de papel de filtro estériles, los cuales fueron sumergidos dentro de cada concentración del aceite esencial por el periodo de 1 hora.

Luego con una aguja estéril se colocó sobre el cultivo de *Salmonella typhi* en las placas petri previamente preparados; las placas se mantuvieron en la misma posición por un periodo de 10 minutos.

Posteriormente, las placas se voltearon de posición y se incubaron, a una temperatura de 37° C durante 24 horas.

Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm de la llama de un mechero.

La lectura se llevó a cabo a las 24 horas mediante la inspección visual de cada placa. Se efectuó tomando el registro en milímetro de los halos de inhibición del crecimiento de *Salmonella typhi*. Se evaluaron los resultados mediante la escala de Durafford:

Escala de Durafford: Escala que se utilizó para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición.

Nula (-) para un diámetro inferior a 8 mm.

Sensibilidad límite (sensible = +) para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.

Medio (muy sensible = ++) para un diámetro entre 14 y 20 mm.

Sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20 mm.

H.2) Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM):

Para determinar la concentración inhibitoria mínima del *Origanum vulgare* (orégano) se realizaron los siguientes pasos: Se prepararon diluciones en tubos de ensayo conteniendo solución salina más las concentraciones de *Origanum vulgare* (orégano) 25%, 50%, 75% y 100%.

Después del proceso de dilución se colocó un inóculo de 0.2 ml de los cultivos preparados en los tubos correspondientes (incluyendo los tubos de controles y se llevaron a incubación a 37° C por un lapso de 24 horas.

La determinación de la CIM, se realizó luego de 24 horas con Agar Mueller Hinton para *Salmonella typhi* tomando 0,1 ml de cada cultivo y dispersándolo en toda la placa para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC).

Después del sembrado los cultivos fueron llevados a incubación a 37°C por 24 horas.

Todos los ensayos fueron realizados bajo condiciones asépticas y se efectuaron 10 repeticiones por concentración. Después de las 24 horas se realizó el conteo de las colonias en cada una de las placas. La concentración inhibitoria fue aquella en la que se inhiba completamente el desarrollo de los gérmenes.

I) Controles:

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM):

El control fue solución salina más el cultivo de *Salmonella*,

5.5. Instrumento de Recolección de Datos

Los datos obtenidos fueron registrados en una Ficha (ANEXO N°1 y N°2).

6. Recolección y Análisis de Datos

El procesamiento de la información fue automático y se utilizó una computadora Pentium IV con Windows SEVEN y el Paquete estadístico SPSS 18.0

Estadística Descriptiva:

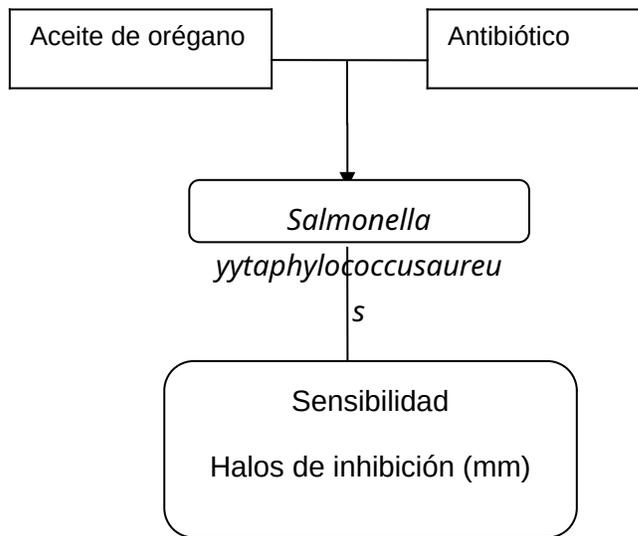
Para analizar la información se construyeron tablas de distribución de frecuencias de una entrada con sus valores absolutos. Se calculó su media y su desviación estándar.

Estadística Analítica

Para determinar el efecto in vitro del aceite de orégano sobre *Salmonella*, se utilizó un análisis de varianza de un diseño completamente aleatorizado para el efecto bactericida analizado por el halo de inhibición, luego se hizo una prueba de comparaciones múltiples: Prueba Duncan, ambas con un nivel de significancia del 5%.

Todos estos datos fueron procesados de manera automatizada con el soporte del paquete estadístico SPSS- 18.0. (20).

Estadígrafo propio del estudio:



7. Aspectos éticos:

El proyecto de investigación se presentó para consideración, comentario, consejo y aprobación a los comités designados por la Facultad de Medicina de la UPAO.

Al realizar la investigación se tuvo en cuenta principios de bioseguridad, prestando atención adecuada a los factores que puedan dañar el medio ambiente. Declaración de Helsinki. (2)

III.RESULTADOS

Tabla N° 1

Efecto Bactericida in vitro de concentraciones de aceite de *Origanum vulgare* sobre *Salmonella Typhi* a través de halos de inhibición.

Indicador del diámetro del halo(mm)	Concentración de aceite esencial			
	25%	50%	75%	100%
- Media	23.8	23.2	20.2	24.8
- Desviación estándar	7.18	6.41	3.43	6.09
Prueba F	F=1.01	p=0.36	p>0.05	

100% de datos ubicados como Sumamente Sensible (+++) según escala DURAFFOURD

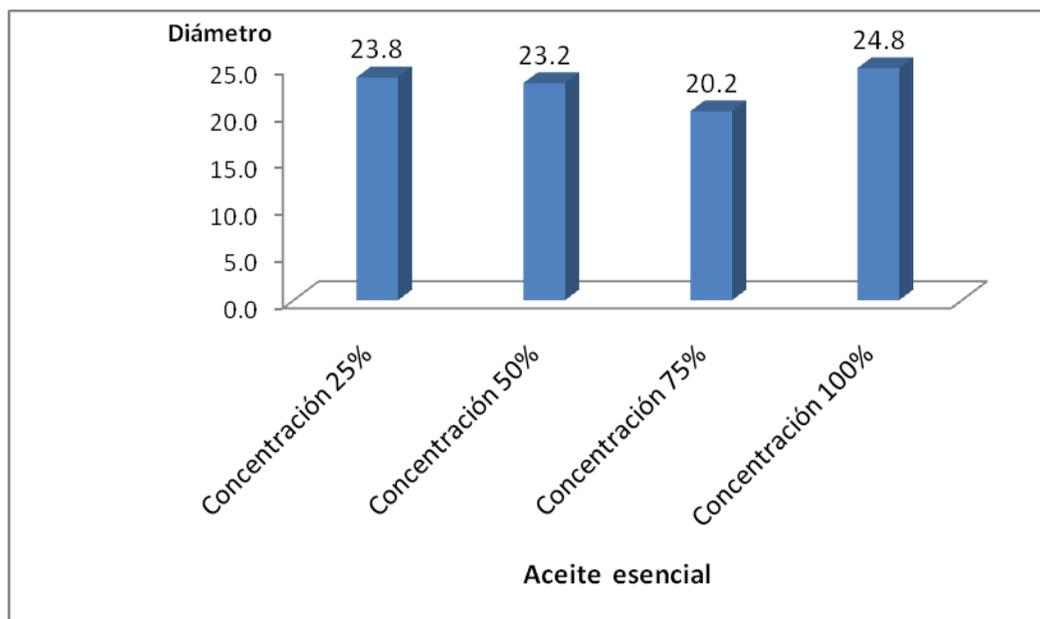


Figura 1.- Efecto bactericida in vitro de concentraciones de aceite de *Origanum vulgare* sobre *Salmonella Typhi* a través de halos de inhibición.

Tabla N° 1A

Comparación por parejas de grupos del efecto bactericida in vitro de concentraciones de aceite de *Origanum vulgare* sobre *Salmonella Typhi* a través de halos de inhibición. Prueba de Duncan

Indicador del diámetro del halo(mm)	Concentración de aceite esencial			
	75%	50%	25%	100%
- Media	20.2	23.2	23.8	24.8
- Comparación: Duncan*	A	a	a	a

- Comparación entre parejas de grupos con la misma letra no difieren estadísticamente($p>0.05$)

En la tabla 1 se aprecia el efecto bactericida a través de los halos de inhibición, con una concentración del aceite del 25% se obtiene una media de 23.8 mm y una desviación estándar de 7.18; para la concentración de 50% de aceite de *Origanum vulgare* (orégano) el valor reportado para la media es de 23.3 mm con una desviación estándar de 6.41 mm; así mismo para la concentración de 75% la media y la desviación estándar fueron respectivamente de 20.2 mm y 3.43 mm. Finalmente para una concentración del 100% se obtiene 24.8 mm y 6.09 mm para la media y desviación estándar.

La prueba F del análisis de varianza para el diseño completamente al azar arroja un valor de 1.01, valor asociado a una significación de $p=0.33$, valor considerado no significativo ($p>0.05$) lo cual permite señalar que las 4 concentraciones de aceite tiene un efecto similar sobre el diámetro del halo de inhibición y que estadísticamente

tienen el mismo efecto medio. Los valores medios obtenidos alcanzan valores por encima de los 20 mm y que al evaluar el conjunto de datos individuales observados el 100% están ubicados en el nivel +++ (severamente sensible).

Al someterse estos niveles medios a la prueba de comparación múltiples Duncan, no se detecta diferencia estadística significativa entre cualquier pareja de grupos de estudio. Situación que corrobora el resultado de la prueba F del análisis de varianza. Al desagregarse estas comparaciones se pueden expresar estas comparaciones de la siguiente forma, donde compara cada pareja de grupos $p > 0.05$

$$\mu_{75\%} = \mu_{50\%}$$

$$\mu_{50\%} = \mu_{25\%}$$

$$\mu_{75\%} = \mu_{25\%}$$

$$\mu_{50\%} = \mu_{100\%}$$

$$\mu_{75\%} = \mu_{100\%}$$

$$\mu_{25\%} = \mu_{100\%}$$

Tabla N° 2

Efecto bactericida in vitro de concentraciones de aceite de *Origanum vulgare* sobre *Salmonella Typhi* a través de la concentración inhibitoria mínima.

Indicador del N° de UFC	Concentración de aceite esencial			
	25%	50%	75%	100%
- Media	0.0	0.0	0.0	0.0
- Desviación estándar	0.00	0.00	0.00	0.00
Prueba F	F=0.00	p=1.00	p>0.05	

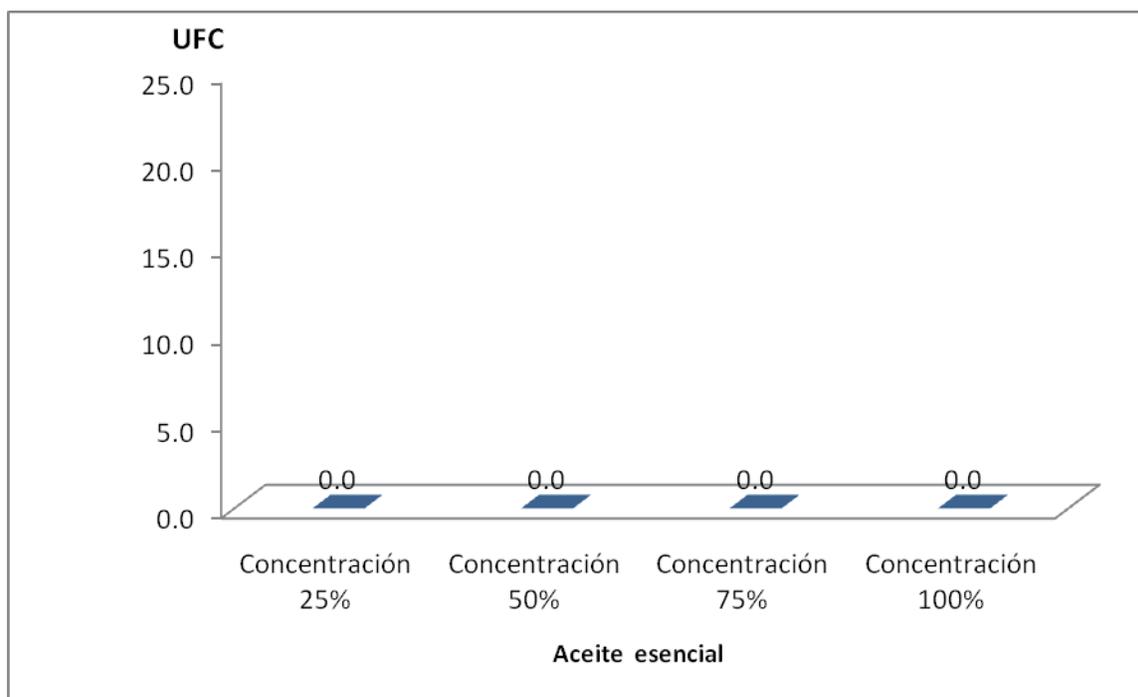


Figura 2.- Efecto bactericida in vitro de concentraciones de aceite de *Origanum vulgare* sobre *Salmonella Typhi* a través de la concentración inhibitoria mínima.

En la tabla 2:

En lo que se refiere al efecto bactericida in vitro de cuatro concentraciones de aceite de *Origanum vulgare* (orégano) sobre *Salmonella Typhi* a través de la concentración inhibitoria mínima en UFC, se puede distinguir que las cuatro concentraciones no reportan presencia de UFC en las placas de ensayo, es decir una media de 0.0 UFC y una desviación estándar de 0.0 para todas las concentraciones. Esta situación debe conllevar a que la prueba F arroja una diferencia estadística no significativa con $p=1.00$ ($p>0.05$); todas las concentraciones en prueba tienen una eficacia del 100% sobre esta medida.

A partir de los resultados mostrados en las tablas de esta investigación, es suficiente una concentración del 25% de aceite de *Origanum vulgare* (orégano) para obtener resultados muy satisfactorios.

IV.DISCUSIÓN

En los últimos años un 80% de la población mundial ha recurrido a las plantas medicinales para tratar diversas enfermedades o afecciones, porque son accesibles y más baratos que los productos farmacéuticos (UICN et al. 1993). En el Perú la riqueza de las plantas medicinales es muy amplia y está enmarcada dentro de más de 4400 especies de usos conocidos por las poblaciones locales, de las cuales un gran porcentaje se presenta en la región andina (Brack 1999).(26)

Los fármacos están ligados a un sistema de salud “ moderno”, que por sus características tiende a la sofisticación tecnológica, a la deshumanización, a una visión restringida del concepto de salud y enfermedad y al menosprecio de muchos valores culturales, mientras que las plantas medicinales, en el contexto tradicional, están ligadas a una concepción distinta del ser humano y de la naturaleza; no es sólo que ellas sean menos tóxicas, o más baratas, o más fáciles de conseguir, o incluso sean más eficaces, sino que las plantas medicinales nos devuelven la mirada a la naturaleza, a la armonía del ser humano con su entorno y a una cultura donde lo vegetal, en términos de salud, también tiene algo que ofrecernos. Además, la popularidad de las plantas medicinales va en aumento, hoy en día existe más gente que descubre en la fitoterapia una vía muy eficaz y barata de cuidar su salud. (27)

La presente investigación demostró el Efecto in vitro del aceite de *Origanum vulgare* sobre *Salmonella Typhi*, utilizando el método de Kirby y Bauer (difusión en disco) y determinando la concentración mínima inhibitoria.

Origanum vulgare se utiliza en la preparación de alimentos. Las hojas y sumidades floridas se aplican en el campo farmacéutico debido a las propiedades tónicas, antisépticas, diuréticas y antiespasmódicas, Sobre el poder antiséptico de los aceites esenciales de plantas pertenecientes especialmente a las familias Labiadas hay amplia información. Todas contienen un compuesto o principio activo propio pero varios

compuestos son comunes a numerosas especies. Las plantas de uso tradicional ofrecen posibilidades para la búsqueda de principios bioactivos o Etnomedicina siendo una alternativa de uso de antiséptico estándar. Mediante el presente trabajo se intenta fundamentar el uso artesanal del aceite esencial del orégano en la conservación de alimentos; para ello se determina la composición química del mismo y su efecto antibacteriano sobre algunas bacterias infectocontagiosas relacionadas con la contaminación de los alimentos y de esta manera contribuir a validar su uso vulnerable. (14)

El orégano es un aceite esencial de origen terpenoide que además de utilizarse como condimento tiene propiedades antimicrobianas, sus compuestos mayoritarios son el timol y carvacrol, a los cuales se les ha atribuido la actividad antimicrobiana. Existen varios trabajos sobre el microencapsulado de aceites esenciales utilizando diferentes matrices como suero de leche, maltodextrinas y diferentes almidones modificados, además se ha evaluado la actividad antimicrobiana después del proceso de encapsulamiento de estos compuestos. (28)

En el presente trabajo se observó que el aceite etanólico de *Oreganum vulgare* tuvo efecto inhibitorio in vitro frente a *Salmonella Typhi* al comparar los halos de inhibición según la escala de Duraffourd, para las 4 concentraciones utilizadas, además se observó que hubo una diferencia dosis dependiente debido que los grupos mostraron tener diferencia estadística no significativa ($p < 0,05$); todo esto concuerda con los resultados encontrados por Hernández y Col. (2009) que hallaron actividad antimicrobiana frente a *Salmonella Typhi* en las concentraciones de 10 %, 15 % y 20 % del aceite etanólico de *Origanum vulgare*, consiguiendo llegar las UFC a 0, lo cual se logró con concentraciones de 15% y 20% en las primeras 48 horas y con la concentración de 10% a las 72 horas por lo que se consideró la concentración menos efectiva. Esto concuerda con el presente trabajo el cual se consiguió con las 4 concentraciones de aceite etanólico de *Oreganum vulgare* obtener 0 de UFC de *Salmonella typhi*, teniendo como concentración mínima inhibitoria 25%. (29)

Con respecto a los halos de inhibición se logró obtener con las 4 concentraciones de aceite etanólico de *Oreganum vulgare* valores por encima de los 20 mm, esto es

comprueba la alta sensibilidad del dicho aceite. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Albado E. y Col. (2011) y Solis (2011) los cuales obtienen un halo de inhibición de 15mm y 10 mm respectivamente con una concentración de aceite etanólico de *Origanum vulgare* al 100%; estas discrepancias encontradas posiblemente se deban a factores intrínsecos y externos tales como la variedad vegetal, el tipo de suelo, la temperatura ambiental, su cultivo, su cosecha y el método de extracción, los cuales pueden afectar la composición química de los aceites esenciales. (30, 31)

Es así que el presente estudio abre nuevas posibilidades en el campo de la investigación clínica como farmacológica, constituyendo así una alternativa natural, eficiente y de bajo costo, para el tratamiento de las múltiples infecciones que se producen en la comunidad.

V. CONCLUSIONES

1. El aceite de *Origanum vulgare* si tiene efecto sobre *Salmonella Typhi*.
2. La concentración inhibitoria mínima del aceite de *Origanum vulgare* sobre una cepa de *Salmonella Typhi* fue del 25%.
3. El aceite de *Origanum vulgare* en las concentraciones de: 25%, 50%, 75% y 100%, utilizando el método de difusión en disco tuvieron efecto inhibitorio sobre una cepa de *Salmonella Typhi*.

VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar otros estudios para ampliar el espectro de actividad antimicrobiana del aceite de *Origanum vulgare* en concentraciones menores.
- Se recomienda aislar los principios activos causantes de la actividad antimicrobiana del aceite *Origanum vulgare*
- Se recomienda realizar pruebas in vivo para valorar la efectividad y la toxicidad que podrían proporcionar los componentes activos del aceite *Origanum vulgare*.
- Se recomienda realizar estudios sobre la forma de administración del aceite del *Origanum vulgare* con el fin de preservar la concentración de los compuestos bioactivos de dicho aceite en el organismo.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Braunwald E., Fauci A., Hauser S., Principios de Medicina Interna. 16° Ed. Edit Mc Graw Hill Interamericana. 2006.
2. Lambert R., Skandamis P., Coote P. and Nychas G. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91:453-462.
3. Friedman M., Henika P. and Mandrell R. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *J Food Prot.* 2002; 65: 1545–1560
4. Trombetta D., Castelli F., Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 2474–2478.
5. Blanco A., Sudano A., Spoto G., Nostro A., Rusciano, D. Epigallocatechin gallate inhibits biofilm formation by ocular staphylococcal isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 4339–4343.
6. Knowles J., Roller S., Murray D., Naidu A. Antimicrobial action of carvacrol at different stages of dual-species biofilm development by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Febrero; 71(2): 797–803.
7. Nostro A., Sudano A., Bisignano S., Marino A, Cannatelli M., Pizzimenti F. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology.* 2007; 56: 519–523
8. Quesada A. Las plantas medicinales. *Revista Biocenosis / Vol. 21 (1-2) 2008.*
9. Salvador C., Eduardo D., Arnaldo L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo?. *Lat. Am. J. Pharm.* Marzo 2008; 22 (3): 265-78.

10. Benavides V., D'Arrigo G., Pino J. Effects of aqueous extract of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) on the preimplantational mouse embryos. *Revista peruana de biología* Diciembre 2010; 17(3): 381 – 384. URL. Disponible en:
<http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/biologiaNEW.htm>
11. Brum M., Madrid I., Meinerz A., Araújo M., Braga J., Rodrigues M., et al. Essential oils against *Candida* spp: in vitro antifungal activity of *Origanum vulgare*. *African Journal of Microbiology Research*. Vol. 7(20), pp. 2245-2250, 14 May, 2013.
12. Sabahat S., Perween T. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. *Pak. J. Pharm. Sci.*, Vol.22, No.4, October 2009, pp.421-424
13. Chirinos O., McBride E., Abarca J., Coaquira J., García L., León D. “Exportación de orégano de Tacna al mercado de Brasil”; 2009, pag 11 URL:
<http://www.esan.edu.pe/publicaciones/Descargue%20el%20documento%20completo.pdf>
14. Albado E., Saenz G., Ataucusi S. (2001); “Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano)” pag 17. URL:
<http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v12n1/v12n1ao3.pdf>
15. Barroso P., Méndez L., Parrón T., Gullón A. Toxiinfección alimentaria por *Salmonella typhimurium* serotipo 4,5,12:I:1,2 en un establecimiento público. *Medicina familiar Andal* Vol. 9, Nº. 1, mayo 2008; 1: 18-25.
16. Özkaya H., Baris A., Aydemir G., Seçil Y., Gammon S., McKinney J. *Salmonella typhimurium* infections in balb/c mice: a comparison of tissue bioluminescence, tissue cultures and mice clinical scores. *New Microbiológica* 2012; 35: 53-59.
17. Instituto de Salud Pública, disponible en:
[URL:http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2011/10/Reporte_salmonella_tphi_sem_38_30%209%2011V1.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2011/10/Reporte_salmonella_tphi_sem_38_30%209%2011V1.pdf)
18. Jurado R., Arenas C., Doblaz A., Delgado B., Riveroa A. y Torre J. Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas, *Enfermedades Infecciosas (IV) Medicine*. 2010; 10(52):3497-501

19. Tirado D., Moreno R., Celades E., Bellido J. y Pardo F. “Evolución de los serotipos, fagotipos y resistencia a antimicrobianos de *Salmonella* sp en el departamento de salud 02 de la provincia de Castellón, España (2000-2006)”, 2009, pag. 520. Disponible en: URL. <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v26n6/art06.pdf>
20. Ultee, A., Gorris, L. y Smid, E. (1998). Actividad bactericida del carvacrol hacia el patógeno, transmitido en los alimentos, URL: [http://www.naturafoundation.es/monografie/Aceite de or%C3%A9gano silvestre.html](http://www.naturafoundation.es/monografie/Aceite_de_or%C3%A9gano_silvestre.html)
21. Ortega M., Robles R., Acedo E., González A., Morales A., Vázquez L. Chemical composition and antimicrobial activity of oregano (*Lippia palmeri* S. Wats) essential oil. Rev. fitotec. mex [revista en la Internet]. 2011 Mar [citado 2013 Nov 13] ; 34(1): 11-17. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802011000100004&lng=es.
22. Chávez L., Díaz F. (2008). Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*, Vol. 13, Nº 2: 45-47.
23. De la Cruz M., Guadalupe M., Silva R. y. Nevárez G. (2007). Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*lippiaberlandieri* Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *vibrio*. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 30 (3): 261 – 267
24. Albado E., Saez G., Grabiell S. (2001). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Rev Med Hered 12 (1).
25. Manzini J. Declaración de Helsinki: Principios Éticos para la Investigación Médica Sobre Sujetos Humanos. *acta bioeth.* [online]. 2000, vol.6, n.2 [citado 2013-10-24], pp. 321-334. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1726-569x2000000200010&lng=es&nrm=iso. issn 1726-569x. <http://dx.doi.org/10.4067/s1726-569x2000000200010>.
26. Huamantupa I., Cuba M., Urrunaga R., Paz E., Ananya N., Callali M., et al. (Diciembre 2011). Riqueza, uso y origen de plantas medicinales expendidas en los mercados de la ciudad del Cusco. *Rev. peru. biol.* 18(3): 283 - 291.
27. Quesada A. (2008). Las Plantas Medicinales. Revista Biocenosis / Vol. 21 (1-2) 2008.

28. Arana A., Padilla E., Obledo N., Estarron M. y Lugo E. (2008). Actividad antimicrobiana de aceite de orégano fraccionado y microencapsulado. Revista Latinoamericana de Química. 2008 pag. 128.
29. Hernandez M., Diaz N., Hernandez F. y Silva R. (2009). Aplicación de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlanderi* Schauer) contra mesófilos aerobios y patógenos en carne de pavo. NACAMEH Vol. 3, No.2, pp. 48-56, 2009.
30. Albado E., Saez G. y Gabriel Sandra. (2011). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). Rev Med Hered 12 (1), 2011.
31. Solis P. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo. Directora: Dra. Yolanda Díaz, Escuela Superior Politécnica Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia. 2011.

Ficha de Recolección de datos

Efecto in vitro del aceite de *Origanum vulgare* sobre *Salmonella Typhi*.

SUSCEPTIBILIDAD DE <i>Salmonella Typhi</i> FRENTE Aceite de <i>Origanum vulgare</i>				
Diámetro del Halo (mm)	CONCENTRACIÓN			
	25%	50%	75%	100%
Halo 1				
Halo 2				
Halo 3				
Halo 4				
Halo 5				
Halo 6				
Halo 7				
Halo 8				
Halo 9				
Halo 10				
Fecha				

Ficha de Recolección de datos

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Efecto in vitro del aceite de <i>Origanum vulgare</i> sobre <i>Salmonella Typhi</i>.					
Unidades Formadoras de Colonias(UFC)	CONCENTRACIÓN				CONTROL
	25%	50%.	75%	100%	Cultivo de <i>S.Typhi</i> sin Tratamiento
m1					
m 2					
m 3					
m 4					
m 5					
m 6					
m 7					
m 8					
m 9					
m10					
Fecha					

FOTOS



FOTO 1: Obtención del Origanum vulgare (orégano)



FOTO 2: Obtención del Aceite Esencial de Orégano



FOTO 3: Obtención del Aceite Esencial de Orégano



FOTO 4: Obtención del Aceite Esencial de Orégano



FOTO 5: Obtención del Aceite Esencial de Orégano



FOTO 6: Obtención del Aceite Esencial de Orégano



FOTO 7: Obtención del Aceite Esencial de Orégano



FOTO 8: Obtención de las diluciones



FOTO 9: Obtención de las diluciones



FOTO 10: Obtención de la cepa



FOTO 11: Obtención de la cepa



FOTO 12: Preparación del inóculo



FOTO 13: Preparación del inóculo



FOTO 14: Preparación del inóculo

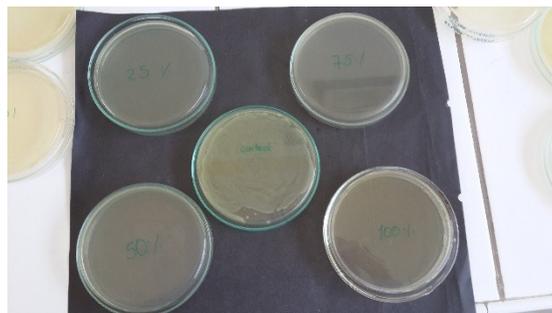


FOTO 15: Preparación del inóculo



FOTO 16: Preparación del inóculo

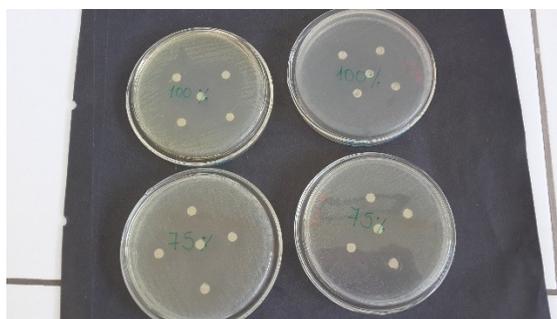


FOTO17: Prueba del efecto antimicrobiano