



UNIVERSIDAD NACIONAL

“PEDRO RUIZ GALLO”

ESCUELA DE POSTGRADO



Efecto antibacteriano *in vitro* de extractos etanólicos de orégano, tomillo y salvia sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia múltiple

TESIS

**Para optar el Grado Académico de Maestro en Ciencias con
mención en Microbiología**

AUTOR:

Lic. Moreno Mantilla Mario Cecilio

ASESORA:

Dra. Vergara Espinoza Martha A.

LAMBAYEQUE – PERÚ

2020

EFFECTO ANTIBACTERIANO *in vitro* DE EXTRACTOS ETANOLICOS DE OREGANO, TOMILLO Y SALVIA SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* CON RESISTENCIA MULTIPLE

Lic. MARIO CECILIO MORENO MANTILLA

Autor

MARTHA A. VERGARA ESPINOZA

Asesora

T E S I S

Presentada a la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo,
como requisito parcial para optar el Grado Académico de:

MAESTRO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGIA

Aprobado por:

CLARA CUEVA CASTILLO
PRESIDENTE DE JURADO

JUAN LOPEZ CUBAS
SECRETARIO DE JURADO

GIANINA LLONTOP BARANDIARAN
VOCAL DE JURADO

LAMBAYEQUE - 2017

DEDICATORIA

A la memoria de mis queridos padres

Pedro Mario y Zarela Emilia, quienes desde

donde estén verán con beneplácito un logro

mas en mi carrera profesional

A mi querida esposa María del Pilar

y a mis hijos Mario Arturo, Guillermo

Antonio, Carlos Alberto y Sergio Paúl,

por estar siempre a mi lado,

impulsándome a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a la Dra. Martha A. Vergara Espinoza, por su asesoramiento y contribución al presente trabajo. A mi colega y amiga Mblga. María Teresa Silva García por su apoyo desinteresado y a mis colaboradores Lic. Karina O. Vega Mendoza, Lic. Sarhy Villegas Manay, Mag. Fransk Carrasco y al personal del Laboratorio de Microbiología por su constante apoyo.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. Antecedentes bibliográficos	4
2.2. Base Teórica	14
2.2.1. Microorganismos patógenos	14
2.2.2. Plantas en estudio y sus principios activos	15
2.2.3. Aceites esenciales	19
III. MATERIAL Y MÉTODOS	19
3.1. Material	19
3.1.1. Población y Muestra de Estudio.....	19
3.1.2. Material Biológico.....	20
3.2. Métodos.....	21
3.2.1. Variables de Estudio	21
3.2.2. Tipo de Estudio y diseño de Contrastación	21
3.2.3. Reactivación de Cepas	21
3.2.4. Obtención de los extractos etanólicos y preparación de las concentraciones de <i>Origanum vulgare</i> (Orégano), <i>Salvia officinalis</i> (Salvia) y <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo).	23
3.2.5. Efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de hojas de de <i>Origanum vulgare</i> (Orégano), <i>Salvia officinalis</i> (Salvia) y <i>Thymus vulgaris</i> (Tomillo).	26

3.2.6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y	
Concentración Mínima Bactericida.....	27
3.3. Análisis Estadístico	28
IV.RESULTADO	30
V. DISCUSIÓN	46
VI.CONCLUSIONES	51
VII. RECOMENDACIONES	52
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	53
IX.ANEXOS.....	60

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentraciones de los extractos etanólicos de <i>Oryganum vulgare</i> , <i>Salvia officinalis</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	26
Tabla 2: Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los extractos etanólicos de <i>Oryganum vulgare</i> , <i>Salvia officinalis</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	28
Tabla 3: Efecto antibacteriano de del extracto etanólico de <i>Oryganum vulgare</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Tabla 4: Efecto antibacteriano de del extracto etanólico de <i>Oryganum vulgare</i> frente a cepas de <i>Escherichia coli</i>	32
Tabla 5. Efecto antibacteriano de del extracto etanólico de <i>Oryganum vulgare</i> frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
Tabla 6: Efecto antibacteriano de del extracto etanólico de <i>Salvia officinalis</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Tabla 7: Efecto antibacteriano de del extracto etanólico de <i>Salvia officinalis</i> frente a cepas de <i>Escherichia coli</i>	35
Tabla 8: Efecto antibacteriano de del extracto etanólico de <i>Salvia officinalis</i> frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
Tabla 9: Efecto antibacteriano de del extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	37

Tabla 10: Efecto antibacteriano de del extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> frente a cepas de <i>Escherichia coli</i>	38
Tabla 11: Efecto antibacteriano de del extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
Tabla 12: Análisis de Varianza (ANOVA) de los promedios de halos de inhibición (mm) de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a los extractos etanólicos de <i>Oryganum vulgare</i> , <i>Salvia officinalis</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	40
Tabla 13: Prueba de significación de Tukey (0.05) del promedio de halos de inhibición por el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de <i>Oryganum vulgare</i> , <i>Salvia officinalis</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	41
Tabla 14: Prueba de significación de Tukey (0.05) del promedio de halos de inhibición de las tres especies bacterianas <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
Tabla 15: Prueba de significación de Tukey (0.05) del promedio de halos de inhibición por el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de <i>Oryganum vulgare</i> , <i>Salvia officinalis</i> y <i>Thymus vulgaris</i> frente a cada una de las tres cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
Tabla 16: Prueba de significación de Tukey (0.05) del promedio de halos de inhibición de las cuatro concentraciones de los extractos etanólicos de <i>Oryganum vulgare</i> , <i>Salvia officinalis</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	44
Tabla 17: Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los extractos etanólicos de <i>Oryganum vulgare</i> , <i>Salvia officinalis</i> y <i>Thymus vulgaris</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Hojas de <i>Oryganum vulgare</i>	20
Figura 2: Hojas de <i>Salvia officinalis</i>	20
Figura 3: Hojas de <i>Thymus vulgaris</i>	20
Figura 4: Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
Figura 5: Cepa de <i>Escherichioa coli</i>	20
Figura 6: Cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Figura 7: <i>Staphylococcus aureus</i> en placas de agar sangre.....	22
Figura 8: <i>Staphylococcus aureus</i> en agar manitol salado.....	22
Figura 9: Prueba de coagulasa.....	22
Figura 10: Cepa de <i>Escherichia coli</i>	22
Figura 11: Bioquímica de <i>Escherichia coli</i>	23
Figura 12: Cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en agar Cetrimide.....	24
Figura 13. Bioquímica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
Figura 14: Hojas de orégano.....	25
Figura 15: Lavado y desinfectado de las hojas.....	25
Figura 16: Secado de las hojas en estufa.....	25
Figura 17: Macerado de hojas de orégano, salvia y tomillo.....	25
Figura 18: Solución madre de los extractos etanólicos.....	25

Figura 19 ,20 y 21: Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Oryganum vulgare</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Figura 22, 23 y 24: Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Oryganum vulgare</i> frente a cepas de <i>Escherichia coli</i>	32
Figura 25, y 26: Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Oryganum vulgare</i> frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
Figura 27 y 28: Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Salvia officinalis</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
Figura 29, 30 y 31: Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Salvia officinalis</i> frente a cepas de <i>Escherichia coli</i>	35
Figura 32, 33 y 34: Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Salvia officinalis</i> frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
Figura 35, 36 y 37: Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Figura 38, 39 y 40: Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> frente a cepas de <i>Escherichia coli</i>	38
Figura 41, 42 y 43: Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Thymus vulgaris</i> frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :.....	39
Figura 44: Prueba de significación de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición según los extractos etanólicos de <i>Oryganum vulgare</i> , <i>Salvia officinalis</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	41

Figura 45: Prueba de significación de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de las especies de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
Figura 46: Prueba de significación de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de cada una de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
Figura 47: Prueba de significación de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición según las concentraciones empleadas de los extractos de <i>Oryganum vulgare</i> , <i>Salvia officinalis</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	44

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N° A: Clasificación Taxonómica del orégano.....	60
ANEXO N° B: Clasificación taxonómica de la Salvia.....	61
ANEXO N° C: Clasificación taxonómica del tomillo.....	62
ANEXO N° D: Principios activos de la familia Lamiaceae.....	63
ANEXO N° E: Diagrama de obtención del extracto etanólico.....	64
ANEXO N° F: Tabla n° 18. prueba de significación de Tukey de los promedios de halos de inhibición según la interacción extractos y especies estudiadas.....	65
ANEXO G: Tabla n° 19: prueba de significación de Tukey de los promedios de halos de inhibición según la interacción extractos y concentración estudiada.....	66

RESUMEN

El presente trabajo de investigación de tipo experimental, se realizó con el objetivo de determinar el efecto antibacteriano In Vitro de los extractos etanólicos de *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris* a concentraciones de 100, 200, 300 y 400 mg/ml frente a tres cepas de *Staphylococcus aureus*, (SA 01, SA02 y SA 03) *Escherichia coli* (EC 01, EC 02 y EC 03) y *Pseudomonas aeruginosa* (PA 01, PA 02 y PA 03). Los extractos etanólicos se obtuvieron tomando como referencia el método utilizado por Moreno Echeandía (2006). La prueba de susceptibilidad se realizó por el método de difusión en agar (Método de Kirby – Bauer). Los resultados demostraron que el extracto de *Oryganum vulgare* tuvo mejor efecto antibacteriano contra cepas de *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 10.44 mm, le sigue *Escherichia coli* con 9.88 mm y *Pseudomonas aeruginosa* con 9.77mm. *Salvia officinalis*, tuvo mejor efecto inhibitorio sobre cepas de *S. aureus* que con cepas de *E. coli* y *Ps. aeruginosa*, con halos de inhibición de 20.88, 11.33 y 12.99 mm respectivamente. Con *Thymus vulgaris* los halos de inhibición fueron para *S. aureus* de 24.66 mm, *E. coli* de 12.33 mm y *Ps. aeruginosa* de 11.11 mm de diámetro. La Concentracion Inhibitoria Mínima (CIM) del *Oryganum vulgare* para *S. aureus* y *E. coli* estuvo en 80 mg/ml, y para *Ps. aeruginosa* en 100mg/ml; el CIM de *Salvia officinalis* para *S. aureus* estuvo en 50 mg/ml, para *E. coli* y *Ps. aeruginosa* fueron 80 mg/ml; y con *Thymus vulgaris* el CIM estuvo para *S. aureus* con 30 mg/ml y para *E. coli* y *Ps. aeruginosa* con 100 mg/ml. Se determinó que ninguno de los tres extractos etanólicos tuvieron efecto bactericida sobre las cepas en estudio. Se concluyó que los extractos etanólicos de *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris* presentaron actividad antibacteriana frente a las cepas estudiadas, siendo *Staphylococcus aureus* la especie más susceptible, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* resultaron ser menos susceptibles a los tres extractos etanólicos probados.

Palabras clave: Extractos etanólicos de Orégano, Salvia y Tomillo. Cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Concentración Inhibitoria Mínima

ABSTRAC

The present experimental research work carried out with the objective of determining the In Vitro antibacterial effect of *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* ethanol extracts in 100, 200, 300 and 400 mg/ml concentrations against three *Staphylococcus aureus* (SA 01, SA 02, and SA 03), *Escherichia coli* (EC 01, EC 02 and EC 03) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA 01, PA 02 and PA 03) strains. The ethanolic extract were obtained taking as reference the method used by Moreno Echeandia (2006). The susceptibility test was performed by the agar diffusion method (Kirby – Bauer method). The results showed that the extract of *Oryganum vulgare* had a better antibacterial effect against strains *Staphylococcus aureus* with 10.44 mm inhibition halos, followed by *Escherichia coli* with 9.8 mm and *Pseudomonas aeruginosa* with 9.77 mm. *Salvia officinalis* had the best inhibitory effect on *S. aureus* strains and *E. coli* and *Ps. aeruginosa* with 20.88, 11.33, 12.99 mm inhibitions halos respectively. With *Thymus vulgaris* the inhibitions halos were 24.66 mm to *S. aureus*, 12.33 mm to *E. coli* and *Ps. aeruginosa* 11 mm in diameter. Inhibitory Concentration Minimum (ICM) of *Oryganum vulgare* was in 80 mg/ml to *S. aureus* and *E. coli*; and 100 mg/ml to *Ps. aeruginosa*. The *Salvia officinalis* ICM was in 50 mg/ml to *S. aureus*, 80 mg/ml to *E. coli* and *Ps. aeruginosa* and with *Thymus vulgaris* was 30 mg/ml to *S. aureus* and 100 mg/ml to *E. coli* and *Ps. aeruginosa*. It was determined that none of the three ethanol extracts has a bactericidal effect on the strains under study.

It was concluded that ethanol extracts of *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* and *Thymus vulgaris* presented antibacterial activity against studied strains, being *Staphylococcus aureus* the most susceptible species, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* proved to be the least susceptibles to the three ethanolic extracts assayed.

Key Words: Orégano, Salvia and Tomillo ethanol extract. Strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Minimum Inhibitory Concentration.

I. INTRODUCCION

A través de la historia el hombre estuvo siempre preocupado por su estado de salud, previniendo o tratando diversas enfermedades a las que estaban expuestos, por ello los primeros tratamientos a dichas enfermedades fueron a base de plantas con propiedades medicinales.

La primera obra concebida sobre el uso de plantas medicinales se le atribuye a Teofrasto de Eresus (372 – 287 a.c) quién publicó el libro “Historia de las plantas”, describiendo unas 500 especies que tenían propiedades medicinales (Vásquez Nuñez 2010).

Muchas enfermedades que afectan al hombre en la comunidad están localizadas en la piel y son causadas frecuentemente por cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* entre otros; dichos microorganismos afectan la piel, la dermis o el tejido subcutáneo, causando infecciones como el impétigo, la furunculosis, el ectima, infecciones de heridas etc. Así mismo otras infecciones frecuentes en la comunidad son las gastrointestinales y las infecciones urinarias causadas por serotipos de *Escherichia coli*, afectando principalmente a niños, jóvenes y adultos. (García – Picasso 1996, Restrepo 2008).

En pacientes inmunocomprometidos es posible observar infecciones localizadas o sistémicas causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, como ocurre en personas con quemaduras, con fibrosis quísticas o con enfermedad pulmonar obstructiva (EPOC) (Carrol et al 2016, Restrepo 2008).

Muchos microorganismos que afectan al hombre se caracterizan por presentar resistencia a los antibióticos como *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SAMR), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* productoras de Beta – Lactamasas de espectro extendido (BLEE) y de Carbapenemasas, que hacen más difícil el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos, por lo que se recurre a antibióticos más potentes y de mayor costo (Mandell, et al 2003; Cecchini 2008)

En las últimas décadas se está revalorizando a la medicina natural, debido a que las plantas presentan principios activos que son metabolitos secundarios propios de las plantas y que tienen propiedades antibacterianas, antiinflamatorias, anticolinérgicas, antifúngicas, estimuladores del sistema inmune entre otras propiedades (Espinoza P; Moreno, G. Pamplona Roger 2007).

El Orégano (*Oryganum vulgare*), la Salvia (*Salvia officinalis*) y el Tomillo (*Tymus vulgaris*), pertenecen a la familia de las Labiaceae y que son utilizados generalmente en la alimentación humana como condimentos, sin embargo, también se emplean para el tratamiento de enfermedades de la boca, gastrointestinales, como antiespasmódico, para cólicos abdominales, infecciones de las vías respiratorias, gracias a sus principios activos como son el carvacrol, el ácido cafeico, el ácido rosmarinico etc.(Pamplona Roger 2007).

Debido al incremento de la resistencia a los antibióticos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, es necesario buscar alternativas terapéuticas en las plantas medicinales para el bienestar de la población de nuestro país. Frente a esta realidad se planteó el siguiente problema: ¿Tienen efecto antibacteriano los extractos etanólicos de *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Tymus vulgaris* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*? Siendo la hipótesis: Los extractos etanólicos de *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Tymus vulgaris* tienen efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Ante esta situación se plantearon los siguientes objetivos:

- Determinar el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Tymus vulgaris* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

- Determinar la Concentración Inhibitoria Mínima de los extractos etanólicos de *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Tymus vulgaris* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar la Concentración Bactericida Mínima de los extractos de *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Tymus vulgaris* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

II. MARCO TEORICO

2.1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La piel como superficie externa del cuerpo, está en contacto con el medio ambiente y expuesta a la acción de múltiples microorganismos patógenos como bacterias, hongos, virus o parásitos, por lo que es común las infecciones cutáneas en personas susceptibles como los niños y personas de la tercera edad. La mayoría de estas infecciones afectan la epidermis, la dermis y el tejido subcutáneo, desarrollando infecciones como el impétigo, la forunculosis, los abscesos, infecciones de heridas, celulitis etc., y que son causadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* (Cecchini 2008).

El termino diarrea se emplea generalmente para definir aquellas alteraciones del hábito intestinal que conllevan a una frecuencia anormal en el número de deposiciones o un incremento del volumen de heces emitidas. La etiología de esta enfermedad está relacionada con miembros de la familia Enterobacteriaceae como los serotipos de *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Shigella spp*, etc y que son transmitidas por via fecal oral o a través de los alimentos (García & Picasso 1996).

Escherichia coli es el agente causal del 70 al 95% de las infecciones agudas del tracto urinario en pacientes ambulatorios del sexo femenino, seguido por *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter spp*, etc. (Cecchini 2008).

Franco – Soto et al (2014), evaluaron la susceptibilidad de 56 cepas de *Staphylococcus aureus* al cloranfenicol mediante el método de difusión en disco utilizando antibióticos como la penicilina, oxacilina, gentamicina, ciprofloxacino, levofloxacino, tetraciclina, cloranfenicol, linezolid, cloranfenicol y Trimetoprim-sulfametoxazol. El 100% de las cepas de *Staphylococcus aureus* fueron sensibles al cloranfenicol y al linezolid, el 29% a la oxacilina; el 71% a las tetraciclinas, un 81% al trimetoprim-sulfametoxazol; a la gentamicina un 61% y un 71% a las quinolonas.

Oth, Laura; Wilson; Bustamante; Fernández; C. Oth (2008), estudiaron la susceptibilidad antimicrobiana de 60 cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de pacientes hospitalizados (45), pacientes ambulatorios (14) y de portadores (01) frente a la penicilina, ciprofloxacino, lincomicina, eritromicina, oxacilina, gentamicina y vancomicina. Los resultados mostraron que el 33, 28 y 1.1 % de las cepas recuperadas de pacientes internados, ambulatorios y portadores respectivamente fueron resistentes a la oxacilina; la penicilina fue el antibiótico menos activo. No se reportaron cepas resistentes a la vancomicina, pero sí cepas con sensibilidad intermedia. Se identificaron cinco patrones de resistencia diferentes, siendo el más frecuente (81.7%) el patrón frente a la penicilina, gentamicina, ciprofloxacino, lincomicina y eritromicina.

Se reporta un caso de una mujer de 42 años de edad, con historia de automedicación de episodios de infecciones del tracto urinario desde los 20 años de edad. Se le realizó el urocultivo, resultando positivo para *Escherichia coli* resistente al ácido nalidíxico, cloranfenicol, ciprofloxacino, norfloxacino, cefuroxima, neomicina, gentamicina y ampicilina y sensible a la ceftazidima, cefepime y ceftriaxona. La paciente fue sometida con extracto de polvo de *Vaccinium macrocarpon* en la proporción de 5 gr disuelto en 250 ml de agua. A los seis días de tratamiento el examen de orina y el urocultivo fueron negativos. El tratamiento duró 13 semanas permaneciendo asintomática y urocultivos negativos (Aranda y Ventura 2016).

Correa, Bravo, Silva y Montiel (2015), estudiaron la susceptibilidad antibiótica de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de 40 muestras de agua; aislando 22 cepas que fueron sometidas a la prueba de susceptibilidad antibiótica por el método de difusión en disco. El 36.4% de las cepas fueron resistentes al aztreonam, seguido por ceftazidima (22.7%); cefepime (13.6%) y tobramicina (4.5%). El 18% de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* presentaron

Beta lactamasas de espectro extendido (BLEE) y el 9% fueron positivos a carbapenemasas y metalobetalactamasas.

Según Vásquez, Alvarado, Rodriguez, Saldaña, Reyes y Vargas (2014) obtuvo aceite esencial de *Oryganum vulgare* mediante el método de destilación directa por arrastre con vapor de agua y luego determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el método de macrodilución en caldo nutritivo más Tween 80 al 0.1% sobre cepas de *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella paratyphi A* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados demostraron que el aceite de orégano inhibía el crecimiento de *S. typhi* a concentración de 3.0 ul/ml; a *S. enteritidis* 1.7% ul/ml; para *S. paratyphi A* 2.3 ul/ml y para *S. aureus* 1.5 ul/ml.

Bastos, Schuch, De Souza, Almeida, Alves y De Mello (2011), demostraron la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Oryganum vulgare* sobre bacterias aisladas de leche bovina. Realizó diluciones del aceite esencial de 16 % a 0.063 % las cuales fueron enfrentadas en 71 cepas bacterianas aisladas y 3 cepas patrones ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados de la Concentración mínima bactericida (CMB) obtenidos demostraron que las cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativo estuvo en 2%; para las cepas de *Staphylococcus aureus* estuvo en 0.65%; para las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC fueron de 3.17%. Las cepas patrones ATCC de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* su CMB fueron 0.35% y mayor a 16%.

Albado, P Saez, F; 2001, enfrentó el aceite esencial del Carvacrol (Orégano) frente a cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Salm0onella cholerae suis*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*; demostrando que todas las cepas en estudio fueron inhibidas presentando diferentes grados de sensibilidad con halos de 14 mm a 28 mm de diámetro, a excepción de *Pseudomonas aeruginosa* que fue resistente.

En la Universidad Federico Villarreal evaluaron la acción sinérgica entre el aceite esencial del orégano y la gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. Trabajaron dos grupos; el grupo experimental fue tratado con discos de papel de filtro embebidos con Gentamicina y aceite esencial de orégano al 75%, mientras que el grupo control con discos embebidos sólo con gentamicina. Los resultados mostraron en el grupo experimental halos de inhibición de 22,75mm, mayor que el grupo control con 20,75 mm. Se concluyó que existe un efecto sinérgico antibacteriano *in vitro* entre el aceite esencial de orégano y la gentamicina en cepas de *Escherichia coli* (Chávez Torres, Diaz C, Escalante R, Estrada M, 2008).

Ardila Q, Vargas A (2009) ejecutó una investigación con la finalidad de establecer la actividad antibacteriana de extractos hexánico de *Allium sativa*, extractos hexánico-cloroformo para *Coriandrum sativa*, *Oryganum vulgare*, *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* frente a cepas de *Clostridium perfringens*. Encontró el autor que los extractos de Orégano y Tomillo no presentaron efecto inhibitorio frente a este microorganismo. Los extractos obtenidos de las otras plantas estudiadas si presentaron efecto inhibitorio, obteniéndose concentraciones bacteriostáticas mínimas entre 16 y 63 ul/ml.

De Souza, Frascolla R, Ziemann M, Costa R y Alves M, 2008, evaluó actividad antimicrobiana *in vitro* de 3 tipos de productos vegetales (un aceite, una tintura y una decocción) de las plantas *Origanum vulgare* L. (orégano) y *Thymus vulgaris* L. (tomillo) frente a *Malassezia pachydermatis* (hongo), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, y *Staphylococcus aureus* ATCC126000). Se concluyó que CMI de los aceites esenciales de Orégano, de Tomillo frente a *Pseudomonas aeruginosa* fueron de 12 y 5% respectivamente y para *S. aureus* fueron de 1,56 y 1,25% respectivamente; para las tinturas el CMI fue de 18.75 y 100% en *Pseudomonas. aeruginosa* y de 6,25% y 50% para *S. aureus*. Las decocciones de Orégano y de tomillo frente a ambos microorganismos fue de 75% y 100% y de 12,5% y 50% respectivamente. Refieren los autores que tanto el aceite como la tintura pueden ser una

alternativa para el tratamiento de la otitis externa, debido a la presencia de timol y carvacrol en mencionadas plantas.

En la Universidad Autónoma Agraria de México evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* de cuatro extractos vegetales: (perejil ruda, tomillo, y gobernadora) y dos aceites esenciales (Clavo y Orégano), frente a cepas hospitalarias con resistencia múltiple de *Staphylococcus aureus* Gram (+) y una cepa de referencia (ATCC 25923), determinando las concentraciones mínimas inhibitorias mediante el método de macrodilución. En las pruebas de actividad antibacteriana, reportó que no existió diferencia entre las concentraciones mínimas inhibitorias (2.77% v/v) de los extractos etanólicos e hidroalcolicos de las plantas mencionadas frente a las 15 cepas, mientras que los aceites esenciales inhibieron el crecimiento bacteriano a concentraciones mínimas inhibitorias variables 13% y de 0,017% a las de los extractos de clavo de olor y de orégano respectivamente (García Lujan 2006).

En la Universidad de Norbert Wiener de Lima, estudiaron el efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de menta, orégano y hierba luisa sobre cepas de *Streptococcus mutans* y usando concentraciones de 50 y 100%. Los resultados obtenidos indicaron que para *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans* siguiendo el método de difusión del disco. El aceite esencial de *Menta piperita* (Menta) demostró no tener efecto inhibitorio sobre cepas *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC 90028, sin embargo el aceite esencial de Orégano al 50 y 100% fue más efectivo sobre *Streptococcus mutans*, mientras que el aceite esencial de hierba luisa lo fue para *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans*. (Maravi I, 2012).

Lagos La Rosa 2013, determinó la CIM y la CBM de Tomillo siguiendo el método de difusión en disco de Kirby Bauer y utilizando concentraciones de 0.46 a 3.67 mg/ml. Se demostró que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* L. (Tomillo) presentó actividad antibacteriana sobre *Porphyromonas gingivalis* causante de la gingivitis, los resultados indican

mayor promedio de halo de inhibición (30,19 mm) a la concentración de 2.76 mg/ml. La concentración inhibitoria mínima (CIM) realizada por el método de macrodilución en tubo fue de 0,31 mg/ml y la concentración bactericida mínima (CBM) fue de 0,37 mg/ml.

Herrera Arias y García-Rico, 2006, evaluó el efecto bactericida de extractos acuosos de canela, laurel, clavo de olor y tomillo sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* siguiendo el método de difusión en disco de Kirby Bauer. El extracto de canela, mostró un amplio espectro de acción al inhibir todas las cepas en estudio a diluciones de 10^{-3} y 10^{-5} con halos de inhibición de 10 mm para *Staphylococcus aureus* y 6 mm para *Bacillus cereus*. El extracto de laurel presentó mayor poder inhibitorio contra *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición entre 11 mm a 16 mm en las concentraciones antes mencionadas; sin embargo el extracto de tomillo no tuvo efecto inhibitorio sobre cepas de *Staphylococcus aureus* pero sí sobre *Escherichia coli* con halos de inhibición de 5 mm a la concentración de 10^{-3} , también presentó inhibición sobre cepas de *Bacillus cereus* (5 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (3 mm) y *Salmonella spp* (15 mm) a la concentración de 10^{-5} .

Se estudió la actividad antibacteriana de 16 extractos etanólicos de *Eucalyptus globulus*, *Matricaria recutita*, *Borrago officinalis*, *Ficus carica*, *Mentha arvensis*, *Salvia officinalis*, *Lipia alba*, *Thymus vulgaris*, *Buddleia americana*, *Tilia platyphyllos*, *Cirsium mexicanum*, *Verbena litoralis*, y *Lipia dulcis*, frente a *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, mediante la prueba de Kirby Bauer modificada. Se emplearon concentraciones de 5 y 10 mg/ml de extractos etanólicos. Demostró que los extractos etanólicos de *E. globulus*, *M. recutita*, *B. officinalis*, *F. carica*, *M. arvensis*, *S. officinalis* y *L. alba* a concentraciones de 5 y 10 mg/ml inhiben a *Str. pyogenes* con halos de inhibición de 5,21 mm y de 11 mm; para *S. aureus* fueron 7,26 mm y 19,29 mm. Los extractos de *Salvia officinalis* inhibieron a *S. aureus* con halos de inhibición de 8,57 mm y 9 mm y con el extracto de tomillo la inhibición fue de 17,86 mm y

19,29mm. Se concluyó que el extracto etanólico con mayor actividad antibacteriana frente a las dos cepas fue *Eucalyptus globulus* y con menor actividad fueron *Lipia alba*, *Salvia officinalis* y *Mentha arvensis*. (Alvarez V, Cáceres A, 1988).

En la Universidad Santo Tomas de Chile, se estudió el efecto antibacteriano del extracto foliar de Salvia blanca sobre bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*) y Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), mediante la prueba de sensibilidad por difusión en agar según el método de Kirby Bauer. Se evaluaron tres concentraciones de extractos diclorometanólicos de hojas (120, 200 y 300 mg/ml. Los resultados mostraron que la Salvia blanca inhibió el crecimiento de *S. aureus* con halos de 10.69 a 17.32 mm de diámetro; para *B. cereus* a concentraciones de 120 a 300 mg/ml, los halos fueron de 9.61 a 13.74 mm de diámetro; sin embargo en *E. coli* y *Ps. aeruginosa* la inhibición ocurrió a concentraciones de 300 mg/ml con halos de inhibición de 6.00 a 7.31 mm y de 6.00 a 8.31 mm de diámetro respectivamente (Maier, Lineros, Oberpaur, Aracwena y Delano, 2014).

Así mismo se estudió la actividad *in vitro* de aceites esenciales de cinco plantas aromáticas: *Eucalyptus globulus* (Eucalipto), *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa), *Tagetes pusilla* Lag (Anís serrano), *Senecio tephrosioides* (Huamanripa) y *Lepechinia meyenii* (Salvia), obtenidos por arrastre de vapor sobre diez microorganismos: los gramnegativos, *Salmonella typhi* ATCC 6539, *S. typhimurium* ATCC 14028, *S. enteritidis* INS, *Vibrio cholerae* ATCC E-7946 OGAWA, *Pseudomonas aeruginosa* GT 28 y *Shigella flexneri* INS, y los grampositivos *Staphylococcus aureus* INS, *S. aureus* ATCC 6538 y *Cándida albicans* ATCC 10231. Se empleó discos de antibióticos como controles y discos Wathman N° 1 de 6 mm de diámetro impregnados con 5uL de aceite esencial puro y se determinó la inhibición mediante la medición de los halos de inhibición en mm.

El aceite esencial que ejerció mayor efecto sobre los microorganismos evaluados fue el de “Hierba luisa” inhibiendo al 88.8% de las cepas, a las cepas de *S. aureus* INS y *S. aureus* con un halo de inhibición de 20mm y 23 mm de diámetro; a las cepas de *Shigella flexneri* y de *Salmonella sp.* los diámetros fueron de 30 a 32 mm respectivamente; para *Vibrio cholerae* fue de 36 mm. La hierba luisa no tuvo efecto sobre las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. El aceite que presentó menos actividad antibacteriana frente a los microorganismos probados fue el de Eucalipto ya que las cepas evidenciaron una sensibilidad límite entre 12 a 13 mm de diámetro de los halos de inhibición, excepto *V. cholerae* que presentó una sensibilidad media con 17 mm de diámetro de halos de inhibición. Sin embargo, ninguno de los cinco aceites empleados inhibió a *Pseudomonas aeruginosa*. (Alzamora L, Morales, Armas L y Fernández, 2001).

Córdova-Guerrero, Othoniel, Aragón y Diaz-Rubio, 2016, evaluaron el efecto antibacteriano y antifúngico de extractos hexánicos de *Salvia apiana* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* ATCC 25922 y dos levaduras, *Candida albicans* y *C. tropicalis*. Los extractos hexánicos de raíz de *Salvia apiana* a concentraciones de 27; 13,5; 6,8 y 3,4mg/ml fueron depositados en hoyos realizados en el medio de Agar Tripteina de soja en cantidad de 10 ul. Se demostró que el extracto hexánico de *S. apiana* inhibió el crecimiento de *S. aureus* con halos de inhibición entre 10 mm a 24 mm de diámetro; para *Str. pyogenes* fue de 28 a 40 mm y para *E. faecalis* de 9 a 17 mm; sin embargo no tuvo efecto inhibitorio significativo sobre *E. coli*, en tanto que para *C. albicans* y *C. tropicalis*, la inhibición fue discreta con halos de 8 mm a 13 mm de diámetro.

Investigaciones similares ejecutadas con las mismas especies, pero con productos vegetales diferentes fueron realizadas por Yañez C, et al., 2011 quien evaluó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana* Will., por el método de difusión en agar con discos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC

29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhi* CDC 57. Se demostró que los diámetros de los halos de inhibición estuvieron entre 8mm, 11mm, 7mm y 8mm respectivamente, mientras que para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 no tuvo efecto inhibitorio.

Espinoza P, Rodriguez F y Espinoza V, 2014, evaluó el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. Romero, sobre el crecimiento de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* a concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, y 50 mg/ml, mediante el método de difusión en disco de Kirby Bauer. Los resultados mostraron que el extracto etanólico de Romero inhibió las cepas de *Streptococcus . pyogenes* con halos de inhibición de 8.89 mm a 11.11 mm de diámetro según las concentraciones empleadas; para las cepas de *Staphylococcus. aureus* 2 y 3 los halos de inhibición oscilan entre 7,84 mm a 9,84 mm de diámetro. No hubo efecto inhibitorio para la cepa 1 de *S. aureus* y para *Pseudomonas. aeruginosa*.

Alvarado y Vásquez (2012), evaluaron el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Eucalipto globulus* L., “Eucalipto” a concentraciones de 100 a 500 mg/ml. frente a cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de casos de mastitis bovina; el efecto inhibitorio se demostró con el método de difusión de Kirby Bauer. Con los resultados obtenidos se demostró que el extracto hidroalcohólico de *Eucalipto globulus* L., “eucalipto” tiene efecto inhibitorio sobre cepas de *S. aureus* a concentraciones de 500 mg/ml con halos de inhibición promedio de 19.29 mm en todas las cepas.

En la Universidad Nacional de Trujillo, determinaron el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto alcohólico de hojas de *Rosmarinus officinalis* y *Argemone mexicana* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* productora de betalactamasa de espectro extendido; se evaluaron diez concentraciones distintas del extracto (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 mg/mL). Se utilizaron dos métodos, el de difusión en placa con discos de Kirby Bauer y el

método de microdilución en microplaca para determinar el CMI y CMB. Los resultados demostraron que *A. mexicana* (Cardo santo) tiene mejor efecto inhibitorio que *R. officinalis* con halos de inhibición entre 24 mm y 37 mm de diámetro para cada método respectivamente, mientras que con Romero los diámetros fueron de 22 mm a 27 mm. La CMI y CMB para *R. officinalis* y de *A. mexicana* fueron de 10 mg/ml y 10 mg/ml respectivamente (Ruiz B, 2016).

Coy Barrera y Acosta G, (2013), determinó la composición química de los aceites esenciales de Romero (*Rosmarinus officinalis*), Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Cúrcuma (*Curcuma longa*) y su actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC6538 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella tiphymurium* ATCC 14028s. Sus resultados demostraron que el aceite esencial de Romero frente a la cepa de *S. aureus*, se pueden observar porcentajes de inhibición de 60%, y 70% para el caso de los aceites de tomillo y cúrcuma; para *E. faecalis* los porcentajes de inhibición fueron del 40% para el aceite de romero, 20% para el aceite de tomillo y 50% para el aceite de cúrcuma. Los aceites evaluados no presentan porcentajes de inhibición representativos frente a *E. coli* y *S. tiphymurium*.

Estudios realizados con el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* “Romero” demostraron que no tiene efecto antibacteriano contra bacterias gramnegativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* a concentraciones elevadas de 500 mg/ml; sin embargo si tiene efecto inhibitorio sobre cepas de *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 50 a 500 mg/ml, con halos de inhibición entre 7,7 mm hasta 13.23 mm de diámetro respectivamente, observándose que la cepa N° 2 de *S. aureus* presentó mayor resistencia en comparación con las otras dos cepas. (Moreno E, 2006).

Estudios realizados sobre las propiedades antimicrobianas de la Salvia (*Salvia officinalis*) sobre bacterias gram negativas como *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella sp*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, demostraron que el

aceite esencial de Salvia ejerció efecto inhibitorio sobre *E. agglomerans* (24.25 mm), *C. freundii* (20.5 mm) y *E. coli* (19.25 mm), mientras que *Pseudomonas aeruginosa* fue la especie resistente (Luna G, Conde H, Gasca C, Vásquez R, Irvias B y Hernández S, 2018).

2.2. BASE TEORICA

Las bacterias, particularmente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, frecuentemente están asociadas a infecciones intrahospitalarias y comunitarias como infecciones de heridas, del tracto urinario, septicemias y otras que se complican por la adquisición de resistencia antimicrobiana a los antibióticos de uso frecuente lo que conduce a la búsqueda de productos más potentes a los que, posiblemente desarrollen resistencia posteriormente. Dichas bacterias poseen características determinadas que se relacionan con su oportunidad para producir las infecciones, así:

Staphylococcus aureus es una especie cuyo hábitat natural son las fosas nasales, la mucosa nasofaríngea, transmitiéndose a través de contacto directo, por medio de fómites o por vía aerógena, además de ello se transmite por ingestión de alimentos contaminados. Presentan una gran variedad de factores de virulencia relacionados con su estructura celular (Peptidoglicano, ácidos teicoicos, proteína A, cápsula, glicocálix; etc) y con la producción de enzimas y toxinas (Hialuronidasa, leucocidinas, toxinas alfa, beta, gamma y delta; exfoliatina, toxina del síndrome del shock tóxico, enterotoxinas) que contribuyen no solo a desarrollar infecciones piógenas localizadas, sino también infecciones sistémicas, toxemias e intoxicaciones alimenticias (Murray, Rosenthal K, y Pfaller M, 2014; Kenneth y Ray, 2011, Restrepo 2008).

Escherichia coli forma parte de la flora normal intestinal, coexistiendo bacterias comensales y variantes enteropatógenas. Presentan tres antígenos importantes como el antígeno somático (Ag. O), el antígeno flagelar (Ag. H) y el antígeno capsular (Ag.K).

Su patogenicidad radica en sus factores de virulencia como su endotoxina, la presencia de fimbrias (adhesinas) y producción de toxinas. Su transmisión es por la vía fecal – mano – boca. Se le asocia con infecciones del tracto urinario, gastroenteritis, septicemias, infecciones de heridas post-operatorias, infecciones nosocomiales. (Murray 2014, Sherris 2011, Pratts 2006).

Pseudomonas aeruginosa, es un microorganismo ubicuo, se encuentra en el suelo, agua, en la vegetación, contaminando ambientes, soluciones desinfectantes etc. Sus factores de virulencia están relacionados con la producción de su endotoxina, enzimas y exotoxinas; así como la resistencia a los desinfectantes, antibiótico a través de la producción de metalobetalactamasas. Es uno de los principales agentes causales de infecciones intrahospitalarias.

Por otro lado, es frecuente en la comunidad el uso de productos derivados de las plantas en el tratamiento empírico de diferentes afecciones provocadas por los microorganismos lo cual tiene las ventajas de que es económico, se preparan con procedimientos populares y sobre todo que no crea resistencia y en la mayoría de los casos tampoco ejerce efectos colaterales adversos. Muchas plantas son utilizadas en estas prácticas, entre ellas *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* L. (Tomillo) y *Salvia officinalis* L. (Salvia), todas ellas pertenecientes a la Familia de las Labiaceae, sub familia Nepetoideae y tribu Menthaea.

Según Fernández y Rivera, 2006, las labiadas son una familia de plantas aromáticas constituida principalmente por hierbas o arbustos, provistas en todas sus partes de glándulas secretoras de aceites esenciales volátiles (que son muy variados en esta familia). La familia Labiatae tiene importancia económica mundial, ya que en todos los continentes y culturas el hombre ha utilizado numerosas especies de labiadas, bien como medicina, como condimento o, más raramente, como alimento. También han sido

usadas en numerosos casos como plantas ornamentales muy apreciadas por su aroma o por sus flores. En la cocina o en el jardín medicinal nunca suelen faltar plantas como la albahaca (*Ocimum basilicum*), alegrías (*Scutellaria*), hierbabuena (*Mentha spicata*), menta (*Mentha piperita*), orégano (*Origanum vulgare*), salvia (*Salvia officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*), toronjil (*Melissa*) y romero (*Rosmarinus officinalis*) *Origanum vulgare* (orégano).

La composición de sus constituyentes esenciales es muy parecida a la del tomillo. La composición en principios activos es variable según la época de recolección, de las condiciones de cultivo y de cómo la planta sea recogida y conservada. En líneas generales, en todo caso, los principales constituyentes del orégano responsables de sus innumerables virtudes (los aceites esenciales están cerca del 4%) son los fenoles y en particular el timol que constituye el 67.5% del aceite esencial seguido del P-cimeno y gamma terpineno con 11.66% y 5.51% respectivamente, dicho aceite es un antiséptico, antibacteriano, antiespasmódico y vermífugo que se usa en la preparación de los productos a utilizar para uso interno y externo; el otro es el carvacrol, un antiséptico muy utilizado en perfumería. Otros constituyentes de los aceites esenciales son grasas, proteínas, numerosas sales minerales (de calcio, hierro, magnesio, sodio, zinc, potasio) y vitaminas como la tiamina, carbohidratos (Acevedo, Navarro M y Monroy L, 2013).

Las propiedades son: analgésico, antiséptico, antiespasmódico, expectorante, estomacal y tónico, ayuda a la digestión, atenúa los dolores intestinales y el meteorismo y además es un óptimo calmante para la tos con propiedades expectorantes. El timol es un efectivo agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de microbios y bacterias por esta razón, se utiliza en productos tales como enjuagues bucales que tienen como objetivo eliminar las bacterias en la boca y pastas de dientes, además de tener un sabor agradable. Se utiliza por vía oral en el tratamiento de la bronquitis, tos ferina, dolor de

garganta, diarrea, dispepsia, gastritis, desórdenes de la piel, desinfectante urinario y antihelmíntico. Tópicamente se utiliza en colutorios para prevenir las caries y para combatir la halitosis, para el tratamiento de la alopecia areata y también forma parte de muchos productos antiinflamatorios. Por sus propiedades antibacterianas y antifúngicas forma parte de gotas ópticas. El timol es también utilizado en cosmética y perfumería (Acevedo y Navarro 2013).

Salvia officinalis fue descrita por Carl Linnaeus en 1753. Ha sido cultivada por siglos en el Viejo Mundo por sus propiedades culinarias y medicinales y muchas veces ha sido descrita con propiedades curativas milagrosas. Es una planta aromática de origen mediterráneo; es un arbusto perenne cuyas hojas de tamaño variable son lanceoladas, pubescentes de color gris verdoso y con la superficie rugosa. Las flores agrupadas en verticilios son de color azul violáceo. Su composición química es compleja con abundantes metabolitos de origen terpénico presentes en sus aceites esenciales y además de compuestos fenólicos (Hernández et al., 2002). Su aceite esencial cambia su composición de acuerdo a la época del año, la naturaleza del suelo y el estado de estrés de la planta. Muchos componentes, sobre todo monoterpénicos y sesquiterpenos, se encuentran de manera regular tales como canfeno, pinenos y , limoneno, -ocimeno (*E* y *Z*), terpinoleno, -copaeno, -bourboneno, linalol, acetatos de linalilo y bornilo, aromadendreno, terpinen-4-ol, terpinenos y , -humuleno, -cadineno, óxido de cariofileno, manol, sabineno, felandrenos y , alcanfor, humuleno, *p*-cimen-8-ol, cariofileno, acetato de -terpililo, *p*-cimeno, borneol, isoborneol, triciclono, sabinol, acetato de isobornilo, acetato de sabinilo, -gurjuneno, *alo*-aromadendreno, viridiflorol, -tuyeno, tuyonas y , óxido de humuleno, cadinoles y , salvenos *cis* y *trans*, mirceno, -cubeneno, farneseno, carvona, fencona, -malieno, -copaeno y calameneno. Se han identificado diterpenos abietánicos tales como

saficinólido, sageona, ácido carnósico, carnosol, rosmadial, rosmanol y *epi*-rosmanol (Hernández, Carretero y Villar del Fresno, 2002).

Tiene muchas propiedades medicinales como antisudorífica, hipoglucemiante, emenagoga, estimulante, antiespasmódica, astringente y antiséptica. En la medicina tradicional austriaca la *Salvia officinalis* administrada por vía oral, como infusión o masticada, se utiliza para el tratamiento de enfermedades del tracto respiratorio y gastrointestinal, boca y piel. Alivia síntomas de resfriado y gripe, y es indicada en caso de anginas, faringitis, afonía por sus propiedades antisépticas. Alivia infecciones de la boca como la gingivitis. Actúa sobre heridas y úlceras con una cicatrización más rápida. Su efecto relajante ayuda en caso de altos niveles de estrés y es ideal para conciliar el sueño. La investigación científica sugiere cierta eficacia para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Igualmente mejora la memoria en sujetos sanos jóvenes. Alivia los dolores menstruales (Pamplona R, 2014).

Thymus vulgaris (Tomillo), fue descrita por Carlos Linneo y publicado en *Species Plantarum*. Tiene una composición química caracterizada por la presencia de Aceites esenciales: timol (20-55%), p-cimeno (14-45%), carvacrol (1-10%), gamma-terpina (5-10%), borneol (8%) y linalol (8%). Flavonoides: como luteolina, apigenina, naringenina, eriodictol, cirsilineol, salvigenina, cirsimaritina, timonina y timusina. Ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico. Ácido cafeico y rosmarínico (0.15-1.35%). Triterpenos: ácido ursólico (1.9%) y ácido oleanólico (0.6%). Presenta además saponinas y taninos. Se usa como condimento, también como antiséptico sobre úlceras y heridas. La tintura de tomillo es efectiva contra el acné. En infusión se utiliza contra la bronquitis, laringitis y antidiarreico. También posee propiedades antiinflamatorias.

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), es la mínima concentración de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos a una concentración estándar.

Concentración Bactericida Mínima (CBM), es la mínima concentración de un antimicrobiano capaz de matar o destruir a un microorganismo a una concentración estándar (Forbes, Sahm y Weissfield 2004).

Aceites Esenciales

Los aceites esenciales, son mezclas de sustancias orgánicas, químicamente constituidas por terpenos, sesquiterpenos y compuestos aromáticos que se localizan en determinados órganos de la planta como flores, hojas, frutos; se obtienen por destilación dependiendo del método y la condición del vegetal, destacándose entre ellos el de arrastre con vapor de agua. Se les llama aceites por su apariencia física y consistencia que es bastante parecida a los aceites grasos, pero se distinguen de ellos, porque al dejar caer unas gotas de esencia sobre el papel, éstas se volatilizan fácilmente sin dejar ninguna huella ni mancha grasosa. Son líquidos a temperatura ambiente, su densidad es inferior a la del agua. Poseen un índice de refracción elevado y la mayoría desvían la luz polarizada son solubles en solventes orgánicos e insolubles en agua. Actualmente se han identificado alrededor de cuatrocientos componentes químicos constituyentes de los aceites esenciales. La mezcla compleja que integra los aceites esenciales pertenecen de manera casi exclusiva a grupos característicos distintos: el grupo de los terpenos, el grupo de los compuestos derivados del fenilpropano, los terpenos originarios del ácido acético, los terpenos provenientes del ácido shiquímico (aromáticos) y otros como los compuestos procedentes de la degradación de terpenos. Los monoterpenos y sesquiterpenos son terpenos de 10 y 15 átomos de carbonos. Se les clasifica según el número de ciclos como acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, etc. Algunos ejemplos de

monoterpenos y sesquiterpenos son: - Monoterpenos acíclicos: linalol, nerol, geraniol. - Monoterpenos monocíclicos: p-mentano, 1,4- Cineol, 1,8-Cineol, Ascaridol. - Monoterpenoides bicíclicos: carano, cis-carano y trans-carano. - Sesquiterpenos: Farnesol, nerolidol. Siendo los monoterpenos los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales.

III.- MATERIAL Y METODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1.1. Población y muestra de estudio.

La población la conformaron las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas de muestras clínicas a partir de muestras de heridas y de orina, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Microbiología humana de la Facultad de Ciencias Biológicas - UNPRG.

El tamaño de la muestra estuvo constituido por 108 unidades experimentales, las cuales corresponden a 3 especies bacterianas, 3 cepas por especie, 3 tipos de extractos y cuatro concentraciones diferentes.

3.1.1.2. Material Biológico

El material biológico, estuvo constituido por las hojas de orégano (*Origanum vulgare*), Salvia (*Salvia officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*) colectada en la sección de ventas de especias de las instalaciones del Mercado Modelo de Chiclayo departamento de Lambayeque. (Anexo I. Figuras 1, 2 y 3).

El material microbiológico estuvo constituido por cultivos puros de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*,

procedentes del cepario del Laboratorio de Microbiología Humana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNPRG. (Anexo 2. Figuras 4 y 5 y 6)



Fig. 1 Hojas de Orégano



Fig. 2 Hojas de salvia



Fig.3 Hojas de tomillo



Fig.4. *Staphylococcus aureus*



Fig. 5. *Escherichia coli*



Fig. 6. *Pseudomonas aeruginosa*

3.2. METODOS

3.2.1. Variables de Estudio

De acuerdo a este diseño, se trabajaron las siguientes variables:

Variable Independiente:

- Concentraciones de extractos etanólicos de hojas de *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris*.
- Cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*

Variable Dependiente:

- Diámetro de halos de inhibición de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2.2 Tipo de Estudio y diseño de contrastación:

Según el fin que se persigue, el trabajo de investigación se clasifica como una investigación Aplicada; según la técnica de contrastación, como Experimental. El diseño de investigación utilizado fue el de estímulo creciente, descrito por GOODE y HATT (1976). Siendo los grupos experimentales las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*, a los cuales se les aplicó el estímulo creciente consistente en las diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de *Origanum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* (Salvia) y *Tymus vulgaris* (Tomillo).

3.2.3. Reactivación de las Cepas Bacterianas

Los cultivos puros de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, se aislaron a partir de muestras clínicas y fueron cedidos por el Laboratorio de Microbiología Humana de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque.

Para la verificación de las cepas de *Staphylococcus aureus*, se realizó a través de las características morfológicas, culturales como la actividad hemolítica (Figura 7), la fermentación del manitol en aerobiosis y anaerobiosis (Figura 8); y la prueba de coagulasa (Figura 9).

Las cepas de *Escherichia coli* se sembraron en placas de agar Mac Conkey (Figura 10) y se identificaron mediante la prueba de fermentación de carbohidratos en agar TSI (Triple azúcar hierro), la descarboxilación de la lisina (Medio LIA), producción de indol y prueba del citrato. (Figuras 11).

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se cultivaron en placas con Agar Cetrimide para observar la pigmentación de las cepas y se identificaron mediante las pruebas de Oxidasa, producción de pigmento, fermentación de carbohidratos en TSI, la prueba del Citrato. (Figura 12 y 13).



Fig. 7. *Staphylococcus aureus* en agar sangre



Fig. 8. *Staphylococcus aureus* en agar manitol salado



Fig. 9. Prueba de coagulasa



Fig.10. *Escherichia coli* en agar Mac Conkey



Fig. 11. Bioquímica de *Escherichia*



Fig. 12. *Pseudomonas aeruginosa*

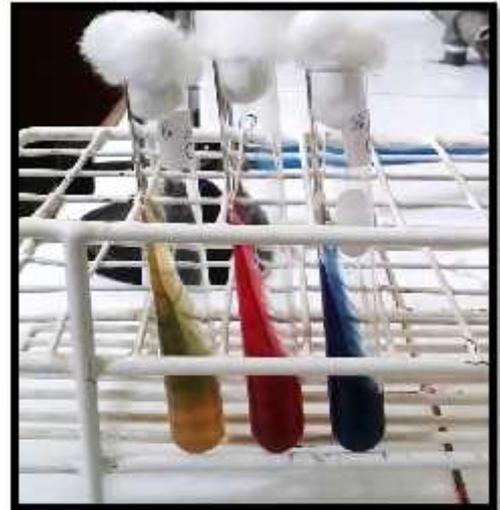


Fig. 13. Bioquímica de *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.4. Obtención de los extractos etanólicos de hojas de *Origanum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* (Salvia) y *Thymus vulgaris* (Tomillo)

Una vez recolectadas las hojas de Orégano, Salvia y Tomillo de los puestos de venta del Mercado Modelo de la ciudad de Chiclayo, departamento de Lambayeque en horas de la tarde, se trasladaron al Laboratorio de Microbiología Humana de la Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo”, procediendo de la siguiente manera:

- Se lavaron las hojas de las plantas con abundante agua hasta quitar toda la tierra e impurezas.
- Se desinfectaron las hojas con bicloruro de mercurio al 1% por espacio de 5 minutos. Enjuagar las hojas con agua destilada estéril
- Colocar las hojas en una fuente de vidrio grande estéril y secar en estufa a 60°C. durante 24 a 48 horas.
- Las hojas secas trituraron en un mortero estéril y se colocaron en un frasco de boca ancha.

- Se le agregó alcohol de 96° para su maceración en una proporción de 1 : 2 por un tiempo de 72 horas.
 - Después de la maceración se realizó el filtrado, el cual se colocó en un crisol estéril y se llevó a estufa a 37°C para su evaporación.
 - Los extractos secos obtenidos se colocaron en frascos de color ámbar debidamente pesados hasta su utilización.
- a) Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de hojas de *Origanum vulgari* (Orégano), *Salvia officinalis* (Salvia) y *Thymus vulgaris* (Tomillo)”

Se pesaron 2.5 gr del extracto etanólico de hojas y se diluyó en 5 ml del solvente (alcohol de 40%) obteniendo una concentración de 500 mg/ml. A partir de esta solución madre se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 100, 200, 300 y 400 mg/ml.



Fig. 14. Hojas de Orégano



Fig. 15. Lavado de hojas



Fig. 16. Secado de hojas



Fig. 17. Macerado de hojas



Fig. 18. Soluciones madre de Extractos etanólicos

Tabla 1. Concentraciones de los extractos etanólicos de hojas de *Origanum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* (Salvia) y *Thymus vulgaris* (Tomillo)”

Solución Madre (ml)	Alcohol de 40% (ml)	Concentración (mg/ml)
2	0	500 (+)
1	1.25	400
1	1.6	300
1	2.5	200
1	5	100

(+): Concentración de la solución madre

3.2.5. Efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de hojas de *Origanum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* (Salvia) y *Thymus vulgaris* (Tomillo)

- a) Preparación del inóculo bacteriano según método descrito por el Instituto Nacional de Salud del Perú

Para la preparación del inóculo bacteriano se utilizó el Manual de procedimientos para pruebas de susceptibilidad del INS (2010), se empleó solución salina fisiológica esterilizada como diluyente para 1 ó 2 colonias del cultivo bacteriano puro del que se

hará la estandarización hasta obtener una densidad poblacional semejante al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland equivalente a 1.5×10^8 UFC/ ml.

b) Preparación de discos de susceptibilidad

Se utilizó el papel Whatman N° 01 del cual se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro con ayuda de un perforador, estos discos se colocaron dentro de tubos de ensayo y se esterilizaron en autoclave (15 Lb. de presión a 121 °C por 15 minutos) para luego secarlos en horno a 80°C por 24 horas.

Una vez esterilizados, los discos, se inocularon con 10ul de cada una de las concentraciones del extracto etanólico de *Origanum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* (Salvia) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) (100mg/ml, 200mg/ml, 300mg/ml, 400 mg/ml), se dejaron reposar por 5 minutos para luego ser utilizados en la prueba de susceptibilidad. Se utilizó como control negativo discos embebidos en etanol al 40°.

c) Prueba de susceptibilidad bacteriana según el método modificado de difusión de Kirby Bauer.

Se prepararon placas Petri, con Agar Müller Hinton (de 10 ml a 15ml. por placa) para cada uno de los microorganismos empleados en la investigación: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las placas de agar M-H (Figura 19), se sembraron con un hisopo estéril por diseminación sobre la superficie del medio, de tal manera que el crecimiento bacteriano cubra la superficie del agar, se dejó secar durante cinco minutos y se colocaron luego los discos embebidos con cada una de las concentraciones de los extractos etanólicos de *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris* y en el centro se colocó el disco de control con de etanol al 40%.

Luego se llevaron las placas a incubación a 37 °C por 24 horas. Trascurrido el tiempo se midió los halos de inhibición (mm) y se registró la medida de cada una de las cepas.

3.2.6. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos de hoja y cáscara de *Oryganum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* “Salvia” y *Tymus vulgaris* “Tomillo”(Método de macrodilución en tubo)

Las cepas que mostraron inhibición en las pruebas de susceptibilidad fueron sometidas a la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria, para lo cual se realizaron diluciones de los extractos etanólicos de *Oryganum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* “Salvia” y *Thymus vulgaris* “Tomillo” tal como se describe a continuación:

Se utilizaron 6 tubos, a todos se le agregó 1 ml de solución madre del extracto, luego se colocaron en forma creciente desde 0.8 a 9 ml de un cultivo de la cepa en caldo BHI a una concentración de 1.5×10^8 células, hasta obtener concentraciones de 80, 50, 40,30, 20, 10 mg/ml (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración Inhibitoria Mínima Inhibitoria (CIM) de los extractos etanólicos de hojas de *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris*

Solución 1/100 (ml)	Cultivo en Caldo Trypticasa Soja (ml)	Concentración (mg/ml)
0.8	0.2	80
0.5	0.5	50
0.4	0.6	40
0.3	0.7	30
0.2	0.8	20
0.1	0.9	10

3.2.7. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos etanólicos de hoja y cáscara de *Oryganum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* “Salvia” y *Tymus vulgaris* “Tomillo”.

Los tubos en los cuales no se observó crecimiento durante la prueba del CIM se sembraron en placas de agar trypticasa soja con un asa calibrada y se incubaron a 37°C durante 48 horas y luego se observaron si hubo crecimiento en dichas placas. La CMB se determinó en aquellas placas en cuyas concentraciones no hubo crecimiento.

3.2.8. Análisis Estadístico de Datos

Para el análisis estadístico de los datos, se aplicó el ANAVA con arreglo factorial con arreglo factorial $3 \times 3 \times 3 \times 4$ siendo el primer factor son las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; el segundo factor número de cepas utilizadas de cada especie; el tercer factor son los 3 extractos plantas utilizadas y el cuarto factor son las concentraciones de los extractos etanólicos de orégano, salvia y tomillo y el quinto las repeticiones. Además se aplicó la Prueba de Tukey (0.05) como complemento de la ANAVA. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el software estadístico: Statistics versión 5 y MS Excel 2010.

IV. RESULTADOS

El presente trabajo de investigación experimental tuvo como objetivo principal demostrar el efecto antibacteriano in vitro de los extractos etanólicos de *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris* sobre las cepas de SA 01, SA 02, SA 03 de *Staphylococcus aureus*, de las cepas de EC 01, EC 02, EC 03 de *Escherichia coli* y de PA 01, PA 02, PA 03, de *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue observado a través de las zonas o halos de inhibición. Los resultados se mostrarán en tablas y gráficas con sus respectivas interpretaciones.

4.1. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Oryganum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* (Salvia) y *Tymus vulgaris* (Tomillo) sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia múltiple.

Los resultados obtenidos de la presente investigación mostraron, que cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, fueron inhibidas por los extractos etanólicos de *Oryganum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* (Salvia) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) a diferentes concentraciones empleadas en el proceso experimental. Además, se observó que, a medida que las concentraciones de los extractos aumentaban, el efecto inhibitorio era mayor.

En la Tabla 3 (Figs. 19, 20, y 21) se puede observar los promedios de halos de inhibición del extracto etanólico de *Origanum vulgare* (Orégano) frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*,. La cepa más sensible fue SA 01 con halos de inhibición de 12.33 mm de diámetro.

Tabla 3. Efecto antibacteriano del Extracto Etanólico de *Oryganum vulgare* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, (SA 01, SA 02, SA 03)

Concentración del Extracto (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	SA01	SA02	SA03	PROM
100	11.66	9	6	8.88
200	11.33	9.66	6.66	9.21
300	12.33	10.66	7	9.99
400	14	10.33	7	10.44
PROMEDIO	12.33	9.91	6.66	



Fig. 19, 20 y 21. Efecto del extracto etanólico de Orégano frente a *Staphylococcus aureus*.

En la Tabla 4. (Figs. 22, 23, y 24) se puede observar los promedios de halos de inhibición del extracto etanólico de *Oryganum vulgare* (*Orégano*) frente a las cepas de *Escherichia coli*. La cepa más sensible fue EC 02 con halos de inhibición de 11.16 mm de diámetro.

Tabla 4. Efecto antibacteriano del Extracto Etanólico de *Oryganum vulgare* frente a cepas de *Escherichia coli* (EC 01, EC 02, EC 03)

Concentración del Extracto (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Escherichia coli</i>			
	EC 01	EC 02	EC 03	PROM
100	6.66	10.66	7.66	8.32
200	8	11	8.66	9.22
300	8	11	9.66	9.55
400	8	12	9.66	9.88
PROMEDIO	7.66	11.165	8.91	



Fig. 22,23 y 24. Efecto antibacteriano de Orégano sobre *Escherichia coli*.

En la Tabla 5. (Figs. 25 y 26) se puede observar los promedios de halos de inhibición del extracto etanólico de *Oryganum vulgare* (Orégano) frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. La cepa más sensible fue PA 01 con halos de inhibición de 9.58 mm de diámetro.

Tabla 5. Efecto antibacteriano del Extracto Etanólico de *Oryganum vulgare* frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (PA 01, PA 02, PA 03)

Concentración del Extracto (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	PA 01	PA 02	PA 03	PROM
100	8	6.33	6	6.77
200	9.66	8	7.66	8.44
300	10	8.66	8.66	9.1
400	10.66	8.66	10	9.77
PROMEDIO	9.58	7.91	8.08	



Fig. 25 y 26. Efecto antibacteriano de Orégano sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

En la Tabla 6. (Figs. 27 y 28,) se puede observar los promedios de halos de inhibición del extracto etanólico de *Salvia officinalis* (*Salvia*) frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*. La cepa más sensible fue *SA 01*. con halos de inhibición de 20.58 mm de diámetro.

Tabla 6. Efecto antibacteriano del Extracto Etanólico de *Salvia officinalis* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, (SA 01, SA 02, SA 03)

Concentración del Extracto (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	SA 01	SA 02	SA 03	PROM
100	17	14.66	15.33	15.66
200	20.66	17	16.66	18.1
300	22.33	16	17.33	18.55
400	22.33	16.33	24	20.88
PROMEDIO	20.58	15.9975	18.33	



Fig. 27, 28. Efecto del extracto etanólico de la Salvia frente a *Staphylococcus aureus*.

En la Tabla 7. (Figs. 29, 30, y 31) se puede observar los promedios de halos de inhibición del extracto etanólico de *Salvia officinalis* (*Salvia*) frente a las cepas de *Escherichia coli*. La cepa más sensible fue EC 01 con halos de inhibición de 11.66 mm de diámetro.

Tabla 7. Efecto antibacteriano del Extracto Etanólico de *Salvia officinalis* frente a cepas de *Escherichia coli*(EC 01, EC 02, EC 03)

Concentración del Extracto (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Escherichia coli</i>			
	EC 01	EC 02	EC 03	PROM
100	11.33	11	8.66	10.33
200	11.33	10.66	9.33	10.44
300	11.66	10.66	9.66	10.66
400	12.33	11.33	10.33	11.33
PROMEDIO	11.66	10.91	9.49	



Fig. 29, 30 y 31. Efecto antibacteriano de Salvia sobre cepas de *Escherichia coli*.

En la Tabla 8. (Figs. 32, 33, y 34) se puede observar los promedios de halos de inhibición del extracto etanólico de *Salvia officinalis* (*Salvia*) frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. La cepa más sensible fue PA 02 con halos de inhibición de 13.41 mm de diámetro.

Tabla 8. Efecto antibacteriano del Extracto Etanólico de *Salvia officinalis* frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (PA 01, PA 02, PA 03)

Concentración del Extracto (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	PA 01	PA 02	PA 03	PROM
100	9	12.33	9.66	10.33
200	10.66	12.66	10.66	11.32
300	11.33	13.66	12	12.33
400	11.66	15	12.33	12.99
PROMEDIO	10.66	13.41	11.165	



Fig. 32, 33 y 34. Efecto antibacteriano de Salvia sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

En la Tabla 9. (Figs. 35, 36, y 37) se puede observar los promedios de halos de inhibición del extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo-) frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*. La cepa más sensible fue SA 01 con halos de inhibición de 23.33 mm de diámetro.

Tabla 9. Efecto antibacteriano del Extracto Etanólico de *Thymus vulgaris* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, (SA 01, SA 02, SA 03)

Concentración del Extracto (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	SA 01	SA 02	SA 03	PROM
100	20.66	18	17.66	18.77
200	22.33	21.66	20	21.33
300	23.33	22.66	21	22.33
400	27	24	23	24.66
PROMEDIO	23.33	21.58	20.415	



Fig. 35,36 y 37. Efecto del extracto etanólico de Tomillo frente a *Staphylococcus aureus*

En la Tabla 10. (Figs. 38, 39, y 40) se puede observar los promedios de halos de inhibición del extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo) frente a las cepas de *Escherichia coli*. La cepa más sensible fue EC 02 con halos de inhibición de 10.24 mm de diámetro.

Tabla 10. Efecto antibacteriano del Extracto Etanólico de *Thymus vulgaris* frente a cepas de *Escherichia coli* (EC 01, EC 02, EC 03)

Concentración del Extracto (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Escherichia coli</i>			
	EC 01	EC 02	EC 03	PROM
100	6.66	8.00	6.00	6.88
200	7.66	9.66	9.66	8.99
300	10.33	11.00	11.66	10.99
400	12	12.33	12.66	12.33
PROMEDIO	9.16	10.24	9.99	



Fig. 38,39 y 40. Efecto antibacteriano del Tomillo frente a *Escherichia coli*.

En la Tabla 11. (Figs. 41, 42 y 43) se puede observar los promedios de halos de inhibición del extracto etanólico de *Thymus vulgaris* (Tomillo) frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. La cepa más sensible fue PA 01 con halos de inhibición de 9.91 mm de diámetro.

Tabla 11. Efecto antibacteriano del Extracto Etanólico de *Thymus vulgaris* frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (PA 01, PA 02, PA 03)

Concentración del Extracto (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	PA 01	PA 02	PA 03	PROM
100	8.33	7.66	8	7.99
200	8.66	8.33	8.66	8.55
300	11	10.33	9.66	10.33
400	11.66	11	10.66	11.11
PROMEDIO	9.91	9.33	9.24	



Fig. 41, 42 y 43. Efecto antibacteriano de Tomillo frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2 Análisis de Varianza de los Promedios de Halos de Inhibición de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* por el Efecto antibacteriano de los Extractos etanólicos de *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Tymus vulgaris*.

Según el análisis de varianza, el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de *Origanum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* (Salvia) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* es dependiente del tipo de planta, de la especie bacteriana, de la cepa y de las concentraciones utilizadas (Tabla 12).

Hipòtesis

H₀₁: No existen diferencias significativas en la actividad de los extractos etanólicos de *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris*.

H₀₂: No existen diferencias significativas entre las especies de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

H₀₃: No existen diferencias significativas entre las cepas bacterianas.

H₀₄: No existen diferencias significativas entre las concentraciones de los extractos de *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Tymus vulgaris*.

H₀₅: No existen diferencias significativas en las interacciones extractos – especies – cepas y concentraciones.

Tabla 12. Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición (mm) de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, por efecto antibacteriano de las diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de *Origanum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* (Salvia) y *Thymus vulgaris* (Tomillo).

F.V	SC	GL	CM	Fc	P	Decisión
Extracto	1413.72	2	706.86	403.92	0.000000	Rechazar Ho
Especie	3240.13	2	1620.06	925.75	0.000000	Rechazar Ho
Cepa	96.35	2	48.18	27.53	0.000000	Rechazar Ho
CC	467.91	3	155.97	89.13	0.000000	Rechazar Ho
Extracto*Especie	1518.59	4	379.65	216.94	0.000000	Rechazar Ho
Extracto*cepa	18.04	4	4.51	2.58	0.038537	Rechazar Ho
Especie*cepa	203.35	4	50.84	29.05	0.000000	Rechazar Ho
Extracto*CC	68.10	6	11.35	6.49	0.000003	Rechazar Ho
Especie*CC	21.48	6	3.58	2.05	0.060965	Aceptar Ho
Cepa*CC	13.99	6	2.33	1.33	0.243704	Aceptar Ho
Extracto*Especie*Cepa	203.31	8	25.41	14.52	0.000000	Rechazar Ho
Extracto*Especie*CC	50.62	12	4.22	2.41	0.005990	Rechazar Ho
Extracto*Cepa*CC	30.43	12	2.54	1.45	0.145586	Aceptar Ho
Especie*Cepa*CC	17.12	12	1.43	0.82	0.634749	Aceptar Ho
Extracto*Especie*Cepa*CC	63.85	24	2.66	1.52	0.062846	Aceptar Ho
Error	378.00	216	1.75			

K: Extracto. E: Especie. CC: Concentración. SS: Suma de cuadrados. GL: Grados de Libertad. CM: Cuadrados Medios

Al aplicar la prueba de Tukey sobre el factor Extractos, se observó que el extracto etanólico de *Oryganum vulgare* (Orégano) tiene menor efecto antibacteriano que los extractos de *Salvia officinalis* (Salvia) y *Tymus vulgaris* (Tomillo) Tabla 14).

Tabla 13. Prueba de significación de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de halos de inhibición por el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de Orégano, Salvia y Tomillo

Extractos	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia ($\alpha=0.05$)
Orégano	9.2196	a
Salvia	13.60185	b
Tomillo	13.68519	b

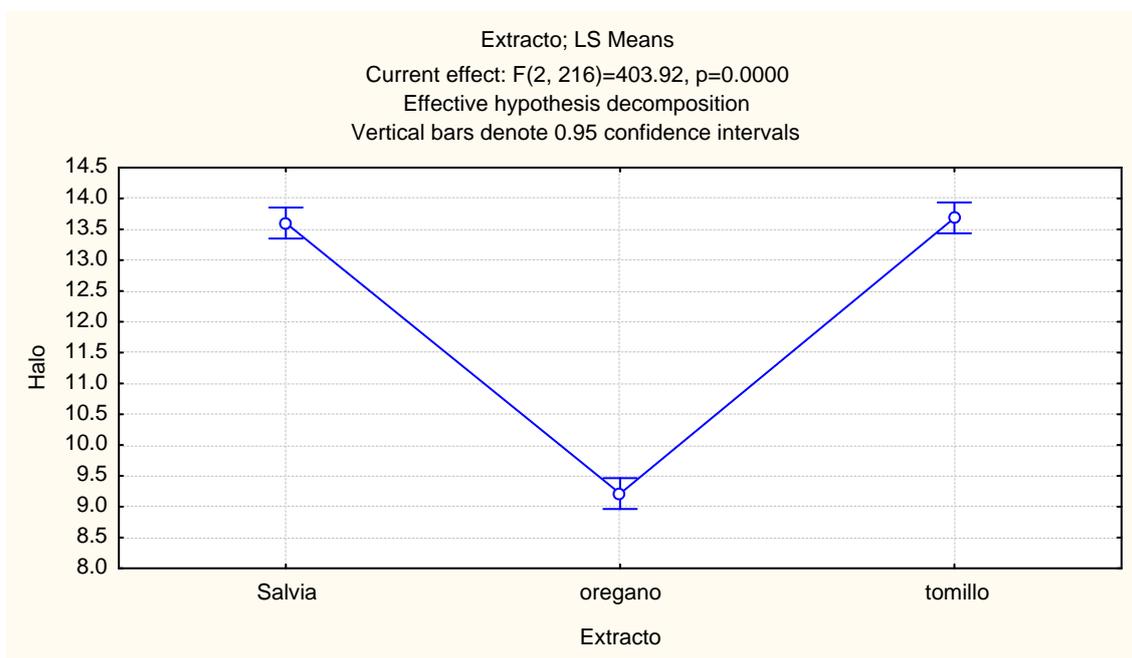


Fig. 44. Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición según los Extractos etanólicos de Orégano, Salvia y Tomillo.

Según la prueba de significación de Tukey (0.05) con respecto a las especies, indica que *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* responden de manera similar a los extractos etanólicos y son poco sensibles, con halos de inhibición de 9.9 mm; pero la especie de *Staphylococcus aureus* presenta mayor sensibilidad con halos de 16.6 mm. (Tabla 14 y Fig. 45)

Tabla 14. Prueba de significancia de Tukey del promedio de halo de inhibición (mm) de las tres especies bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*

Especies	Promedios de halos de inhibición (mm)	Significancia ($\alpha=0.05$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9.92593	a
<i>Escherichia coli</i>	9.93519	a
<i>Staphylococcus aureus</i>	16.63889	B

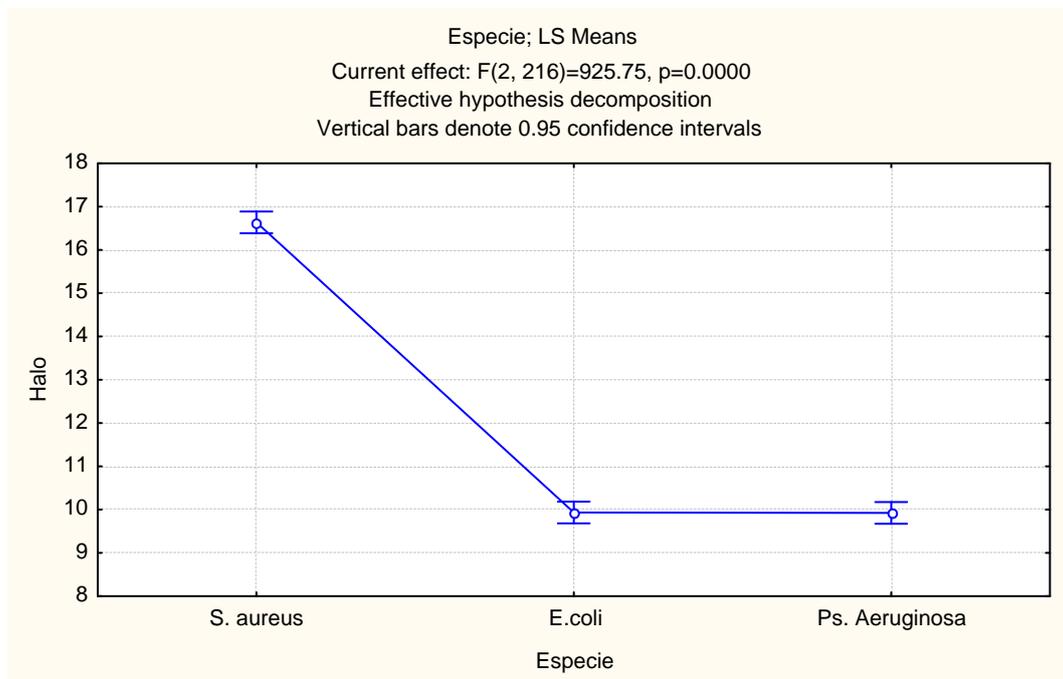


Figura 45. Prueba de significación de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición según las especies *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* frente a los extractos etanólicos de Orégano, Salvia y Tomillo.

Realizada la prueba de Tukey (0.05) con respecto a la respuesta de las cepas bacterianas frente a los extractos etanólicos, observamos que las cepas 01 de las tres especies son más susceptible que las cepas 02, sin embargo, las cepas 03 de cada especie son las que presentan menores halos de inhibición (Tabla 15)

Tabla 15. Prueba de significancia de Tukey del promedio de halo de inhibición (mm) de las tres cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Especies	Promedios de halos de inhibición (mm)	Significancia ($\alpha=0.05$)
C 1	12.778	a
C 2	12.269	a
C 3	11.454	B

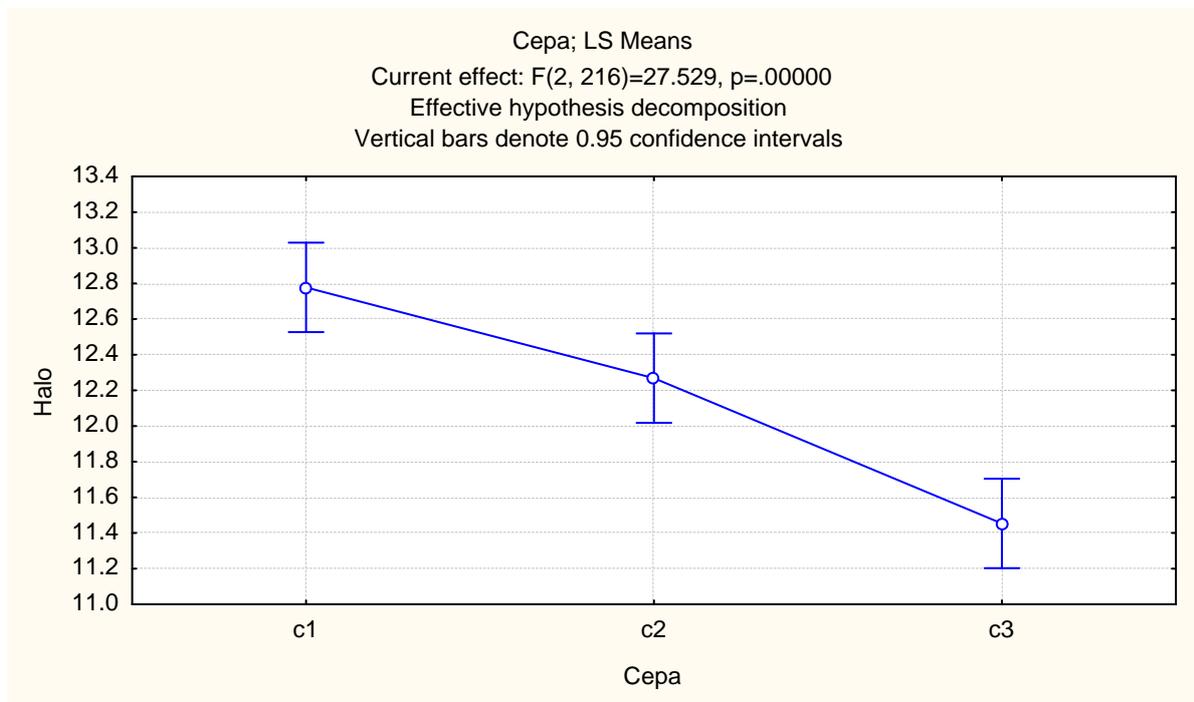


Figura. 46. Prueba de significación de Tukey (0.09) de los promedios de halos de inhibición según las 3 cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, frente a los extractos etanólicos de Orégano, Salvia y Tomillo.

Realizada la prueba de Tukey (0.05) para el factor concentración, (Tabla 16) se observó que la mejor concentración con actividad antibacteriana fue la de 400 mg/ml con un promedio de halo de inhibición de 13.7 mm; y que conforme va disminuyendo la concentración el efecto fue menor.

Tabla 16. Prueba de significancia de Tukey del promedio de halo de inhibición de las cuatro concentraciones de los extractos etanólicos de *Origanum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* (Salvia) y *Thymus vulgaris* (Tomillo).

Concentración	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia ($\alpha=0.05$)
100	10.44444	a
200	11.83951	b
300	12.64198	c
400	13.74074	d

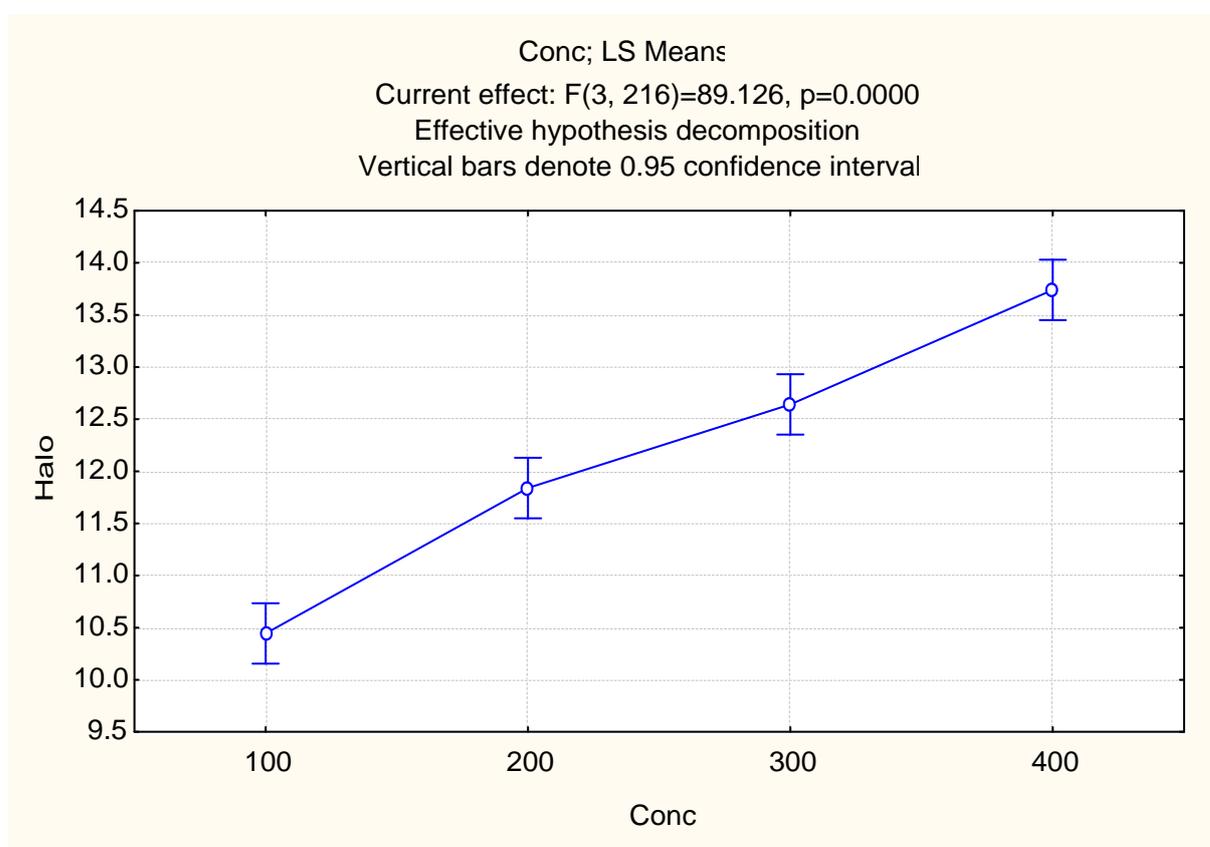


Fig. 47. Prueba de significación de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición

de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* según las concentraciones de los extractos etanólicos de Orégano, Salvia y Tomillo.

Tabla 17. Resultados de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los Extractos etanólicos de *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Extracto etanólico	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>
Orégano	80 mg/ml	80 mg/ml	100 mg/ml
Salvia	50 mg/ml	80 mg/ml	80 mg/ml
Tomillo	30 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml

V. DISCUSION

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto antibacteriano in vitro de los Extractos Etanólicos de *Oryganum vulgare* (Orégano), *Salvia officinalis* (Salvia) y *Thymus vulgaris* (Tomillo) sobre el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia múltiple a los antibióticos.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, demostraron que el extracto etanólico de *Oryganum vulgare* (Orégano), ejercen efecto antibacteriano sobre las cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*; siendo las cepas de *S. aureus* las que

presentaron mayor susceptibilidad con halos de inhibición de 10.44 mm a la máxima concentración del extracto, le siguen las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* (Tabla 3, 4 y 5). Estos resultados concuerdan con Alvado (2011), en cuyo trabajo se demostró que el Carvacrol extraído del Orégano inhibía el crecimiento de *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella tiphymurium*, *Salmonella cholerae suis* y *Vibrio cholerae*, con halos de inhibición entre 14 a 28 mm de diámetro, sin embargo, *P. aeruginosa* fue la única especie resistente; aun cuando existen diferencias en los diámetros de halos de inhibición esto puede atribuirse a la procedencia de las cepas. Garcia-García (2008), observaron que el timol, el eugenol y el carvacrol presentaron propiedades antibacterianas sobre cepas de *S. aureus*, *Salmonella tiphymurium*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, provocando desorden en la membrana citoplasmática, rompiendo la fuerza motriz protónica (FMP) y alterando el flujo de electrones, ocasionando la coagulación del contenido celular. Mencionan además que el Carvacrol desintegra la membrana externa de las bacterias Gram negativas, permitiendo la salida de los lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática provocando la salida del ATP, inhibición de la actividad de las ATPasas y disminución de la FMP. Así mismo Maravi (2012) demostraron que el aceite de menta y orégano tienen propiedades antibacterianas sobre bacterias gram positivas como *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophylus*.

Al evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Salvia officinalis* sobre las cepas en estudio se observó que las cepas de *Staphylococcus aureus* mostraron una mayor sensibilidad con relación a *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Tabla 6, 7 y 8). Resultados similares reportaron Guevara (2018), que observó el efecto antibacteriano en bacterias gram negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans* y *Citrobacter freundii* con halos de inhibición de 19.25 mm, 24.25 mm y 20.5 mm respectivamente; sin embargo, señala que *Pseudomonas aeruginosa* fue la

especie resistente que no fue inhibida por el aceite esencial de *Salvia officinalis*. También López de Avila (2012) observó que el aceite esencial de Salvia tenía efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Los resultados obtenidos con el extracto etanólico de *Thymus vulgaris* sobre las cepas en estudio fueron muy alentadores al observar un mayor efecto antibacteriano; siendo las cepas de *Staphylococcus aureus* las más susceptibles, le siguen las cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 9, 10 y 11). Es probable los principios activos del timol y carvacrol se concentren mayormente cuando son extraídos con alcohol, que arrastra no solo compuestos fenólicos, terpenos, fenoles sino también aceites y que según Lambert et al, citado por García-García (2008) el carvacrol se concentra en un 45% y el timol en un 50% en los aceites esenciales. Así mismo Coy Barrera (2013) demostraron que el aceite esencial de Tomillo y Romero inhibieron cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, sin embargo no tuvieron efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*, esto probablemente se deba a la procedencia de las cepas, si estas han sido sometidas a tratamientos antibióticos.

Las variables en estudio dependientes e independientes fueron evaluadas a través del análisis de varianza (ANOVA), observando de que existen diferencias significativas entre los extractos probados, siendo los extractos etanólicos de Tomillo y Salvia los que presentaron mejor actividad antibacteriana sobre las cepas en estudio y con menor actividad el extracto de Orégano (Tabla 12 y 13). Esto se debe probablemente a que las concentraciones de estos metabolitos de las plantas estén influenciadas por el tipo de suelo, el pH; los nutrientes, la hora de recolección y la temperatura de secado (Moreno E. 2006). Así mismo Cowan citado por Borboa-Flores (2010) mencionan que los mecanismos de acción de los diversos compuestos orgánicos de las plantas son

variables así por ejemplo la toxicidad de los fenoles se atribuye a la oxidación de compuestos; los terpenos están involucrados en la ruptura de las membranas a través de compuestos lipofílicos, mientras que las lectinas y los polipéptidos pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana; así mismo mencionan que la concentración de los principios activos como el carvacrol el timol y eugenol es variable en plantas de la misma especie (Lambert et al citado por Garcia-Garcia 2008).

El ANOVA también nos indicó que existen diferencias significativas entre las especies de microorganismos evaluados, en donde *Staphylococcus aureus* presentó mayor susceptibilidad a los extractos etanólicos probados, le siguen *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con menor susceptibilidad (Tabla 12 y 14). Estas diferencias se deben a que los gram positivos presentan una pared celular constituido por peptidoglicano que los hace más permeable a los extractos etanólicos, mientras que *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, presentan una pared celular más compleja, cuya membrana externa es una barrera primaria selectiva lo que probablemente lo haga menos susceptible a diversos compuestos antibacterianos; así mismo desarrollan diferentes mecanismos de resistencia como el cambio conformacional de sus porinas y por medio de sus bombas de expulsión que presentan (Kenneth, y Ray 2011, Tortora 2016). Sin embargo *E. coli* y *P. aeruginosa* Reaccionaron de manera similar frente a los extractos etanólicos de Orégano, Salvia y Tomillo.

Al evaluar cada una de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, se observaron que las tres cepas de SA 01, EC 01 Y PA 01 fueron más susceptibles a los extractos etanólicos de Orégano, Salvia y Tomillo, en comparación con las cepas 2 y 3 de cada especie de *E. coli* y *P. aeruginosa* (Tabla 12 y 15). Estas diferencias estarían relacionadas con la procedencia de las cepas de origen intrahospitalarios que han estado sometidas a la acción de diferentes antibióticos.

El Análisis de Varianza realizado para la variable concentración demostraron de que existen diferencias significativas, observándose de que a medida que las concentraciones aumentan, los diámetros de halos de inhibición también se incrementan (Tabla 12 y 16).

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para el extracto etanólico de Orégano frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* fueron de 80 mg/ml y para *Pseudomonas aeruginosa* estuvo en 100 mg/ml. Los resultados fueron mayores a los reportados por Bastos (2011) donde el CIM para las cepas de *S. aureus* estuvo en 3.17% y para *E. coli* y *P. aeruginosa* el CIM estuvo en 0.35% y 16% respectivamente.

Para el extracto etanólico de salvia, el CIM para *Staphylococcus aureus* estuvo en 50 mg/ml y de 80 mg/ml para *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estos resultados no coinciden con los de Lina De Avila et al 2012, quienes reportaron un CIM para el aceite esencias de Salvia de 40 mg/ml para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7, diferencia que estaría ligada a la procedencia de las cepas que fueron de origen alimentario.

Para el extracto etanólico de Tomillo el CIM estuvo en 30 mg/ml para *Staphylococcus aureus* y 100 mg/ml para *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. (Tabla 17)

Ninguno de los extractos etanólicos de *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris* probados tuvieron actividad bactericida.

VI. CONCLUSIONES

- Los extractos etanólicos de Orégano, Salvia y Tomillo presentan actividad antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Los extractos etanólicos de Salvia y Tomillo fueron los que tuvieron mejor actividad antibacteriana frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Las cepas de *Staphylococcus aureus* fueron más susceptibles a los extractos etanólicos de Orégano, Salvia y Tomillo. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fueron las menos susceptibles.
- La CIM para el extracto etanólico de Orégano fue para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* fue de 80 mg/ml y *Pseudomonas aeruginosa* fue de 100 mg/ml; para el extracto de Salvia fue de 50 mg/ml para *S. aureus* y de 80 mg/ml para *E. coli* y *Ps. aeruginosa*; y para el extracto etanólico de Tomillo la CIM para *S. aureus* fue de 30 mg/ml y para *E. coli* y *Ps. aeruginosa* fue de 100 mg/ml.
- Ninguno de los extractos etanólicos evaluados frente a *S. aureus*, *E. coli* y *Ps. aeruginosa* presentaron efecto bactericida.

VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con el trabajo de investigación, enfatizando en el estudio de los principios activos que poseen de *Oryganum vulgare* “Orégano”, *Salvia officinalis* “Salvia” y *Thymus vulgaris* “Tomillo”, sobre otros microorganismos de importancia clínica.
2. Probar sí los aceites esenciales de estas especies de plantas su actividad antibacteriana con bacterias y hongos patógenos de nuestra localidad.
3. Investigar si los extractos etanólicos de Orégano, Salvia y Tomillo son tóxicos para los animales o el hombre y promover su industrialización.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo, D., Navarro, M., y Monroy, L. Composición Química del aceite esencial de hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). Información Tecnológica (24), 43-48. La Serena (2013). Cartagena. Colombia.
- Ardila, Q Martha; Vargas A, Perez C, Mejía G. 2009. Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Oryganum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. Biosalud, Vol 8. Enero-Diciembre. Pag. 45-57.
- Albado,P; Saez F, 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Oryganum vulgare*. Rev. Médica Herediana. Lima – Perú.
- Alvarado A, Vásquez M, 2012. Efecto inhibitorio *In vitro* del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. “Eucalipto” a diferentes concentraciones en *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis. Tesis para obtener el Título de Licenciado en Biología – Microbiología-Parasitología FCCBB. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
- Alvarez, V, Cáceres A. 1988. Inhibición de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* por extractos vegetales usados en el tratamiento de afecciones respiratorias. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Centro de Estudios Mesoamericanos para la Tecnología Apropriada CEMAT. Vol 5 N° 1.

- Alzamora L, Morales, Armas L, Fernández G. 2001 Actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. Anales de la Fac. de Medicina. 62 (2): 156-161. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
- Aranda – Ventura, José. Infección del Tracto Urinario por *Escherichia coli* resistente a antibióticos tratados con *Vaccinium macrocarpon* (arándano rojo). 2016. Revista Peruana de Medicina Integrativa, 1 (2); 46-9.
- Bastos O, 2011. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Orégano ante aisladas en leche de bovino. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Streptococcus, Staphylococcus y Corynebacterium, Federal de Petrobras. Rio Grande Du Soul. Brasil.
- Borboa-Flores, J; Rueda-Puente, E.; Acevedo-Felix, E; Ponce, J. F; Cruz-Villegas, M; García-Hernández, J. L; Ortega-Nieblas, M. M. Evaluación de la actividad Antibacteriana In vitro de Aceites Esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie michiganensis. Tropical and Subtropical Agrosystems. Vol. 12, núm. 3, setiembre-diciembre, 2010, pp. 539-547 Universidad Autónoma de Yucatan. Mérida, Yucatán
- Chávez Torres, L; Díaz Castañeda, F; Escalante R,G; Estrada Montañez, E. Efecto sinérgico del aceite esencial de *Oryganum vulgare* a la Gentamicina, en cultivos de *Escherichia coli*. Facultad de Medicina Hipólito Unanue. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima - Perú.
- Cecchini, E; Gonzales Ayala, S. Infectología y Enfermedades Infecciosas. 2011. Ediciones Journal S.A. Buenos Aires.
- Córdova – Guerrero; Othoniel, H; Aragon Martinez; Laura Diaz-Rubio. Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana*, frente a microorganismos de importancia clínica. 2016. Universidad Autónoma de Baja

- California, Tijuana, B.C. México. Rev. Argentina de Microbiología 2016. Vol.48 N°3. Pag. 217-221.
- Correa Rivas K, A; Bravo Torrealba, M.V; Silva Alvarado R.A; Marynes Montiel. Susceptibilidad a antibióticos de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de agua de consumo humano de la comunidad Santa Rosa de Agua. Maracaibo. Estado de Zulia. Venezuela. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología. 2015; 35:83-88.
- Coy Barrera, C.A; Eunice Acosta, G. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y cúrcuma (*Curcuma longa*) de Colombia. 2013. Rev. Cubana Plant. Med vol.18 n° 2 Ciudad de la Habana. Abr-jun.2013.
- De Souza I, Frascolla R, Santin R, Ziemann M, Costa R, Alves M. 2008. Actividad de extractos de Orégano y Tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. Rev. Cubana. Plantas Medicinales. 13 (4).
- Espinoza P, Rodriguez F, Espinoza V, 2007. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” sobre el crecimiento de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología-Microbiología –Parasitología. FCCBB. Lambayeque.
- Forbes, B;Sahm, D; Weissfield, A. 2004. Diagnóstico Microbiológico de Bayley Scott. 11ava Edición. Edit. Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Franco – Soto, J; Evelyn Zerpa, Roselynn Moreno, Rucely Colmenares, Mariangel Pérez, Claudia Leal, Katherine Parra. 2014. Susceptibilidad In vitro del *Staphylococcus aureus* al cloranfenicol, aislado en muestras de secreciones. Hospital “Dr. Patrocinio Peñuela Ruiz IVSS. San Cristóbal. Edo. Táchira. Venezuela.

- García, R; J. Picazo. 1996. Microbiología Médica. Tomo I y II; 1era Edición. Edit. Mosby/Doyma. España.
- García Lujan, C. Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. Tesis para optar el título de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México 2006.
- García-García, R.M., Palou-García, E. Mecanismo de Acción Antimicrobiana de Timol y Carvacrol sobre microorganismos de interés en Alimentos. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos (2008): 41-51. Universidad de las Américas. Puebla. México.
- Hernández Aguero, T.O; Carretero Accame, E; Villar del Fresno, A. Salvia, Fitoquímica, Farmacología y Terapéutica. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. 2002. U.C.M
- Herrera Arias, F; García – Rico, O. Evaluación in vitro del Efecto bactericida de extractos acuosos de Laurel, Canela, Clavo y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario. Facultad de Ciencias Básicas. Departamento de Microbiología. Universidad de Pamplona. Grupo de Investigación en Ciencias Aplicadas. Octubre 2006.
- Jawetz, E. Melnick & Adelberg. Microbiología Médica. 2016. Editorial Mc Graw Hill. Interamericana. 27ª. Edición. México D.F.
- Kenneth J, Ryan; C. George Ray. Microbiología Médica de Sherris. 2011. Editorial Mac Graw Hill. Interamericana. 5ta Edición. México D.F.
- Lagos La Rosa, R. Determinación de la Actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Thymus vulgaris*,L. Tomillo, frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causante de gingivitis. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna.

- Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. 2013.
- López De Ávila, L; Castaños Peláez, H; Mejía Gómez, C. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Salvia officinalis* L. sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. 2012. Acta Biol vol.35.nº 98 Medellín Jan./June 2013.
- Luna Guevara, M.L; Conde Hernández, L.A; Gasca Corona, J; Vcasquez Rosas, J; Irvias B; Hernández S.A. Propiedades antimicrobianas de la salvia (*Salvia officinalis*) sobre bacterias Gram negativas. 2018. Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México.
- Maier, L. A; Lineros, T. A; Oberpaur, Ch; Aracwena, D.A; Delano, G.A. Efecto antimicrobiano del extracto foliar de Salvia blanca (*Sphacele salviae* Lindle) sobre bacterias gram positivas y gram negativas. Facultad de Medicina Veterinaria y Recursos Naturales. Universidad San to Tomas, Ejercito 146, Santiago de Chile 2014.
- Mandell, Douglas y Bennet. Enfermedades Infecciosas. 2003. 6ava. Edic.. Edit. Mosby/Doyma. España.
- Maraví Inga; Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *Menta piperita* (Menta), *Origanum vulgare* (Orégano) y *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Candida albicans* ATCC. Tesis para obtener el Título de Cirujano Dentista. Universidad Privada Nolbert Wiener. Facultad de Ciencias de la Salud 2012. Lima.
- Moreno E, Gustavo. 2006. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* “Romero” frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

- aeruginosa* y *Escherichia coli*. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología-Microbiología-Parasitología. FCCBB.43pp.
- Murray, Patrick; Rosenthal, Ken; Pfaller Michael. Microbiología Médica. 2014. Editorial ELSEVIER. 7ma. Edición. Barcelona. España.
- Oth R, Laura; Myra Wilson Sch; Natalia Bustamante H; Heriberto Fernández, J; Carola Oth, L. Susceptibilidad antimicrobiana y Patrones de Resistencia de *Staphylococcus aureus* aislados de pacientes y portadores en la ciudad de Valdivia. Chile. Universidad Austral de Chile. Instituto de Microbiología Clínica. Revista de Infectología. V.25 n.3. Santiago. Junio 2008.
- Pamplona Roger, J. El Poder Medicinal de las Plantas. La Naturaleza y su Fuerza Curativa. 2014. Asociación Casa Editora Sudamericana. 1ª. Edición. Buenos Aires. Argentina.
- Prats Guillermo. Microbiología Clínica. 2006. Editorial Medica Panamericana. Madrid. España.
- Restrepo M. A. Fundamentos Básicos de Medicina. Microbiología de las Infecciones Humanas 2008. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín. Colombia.
- Ruiz Barrueto, M.A; Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* y *Argemone mexicana* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* productora de betalactamasa de espectro extendido. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Trujillo. Perú 2016.
- Tortora Gerard; Funke Berdell; Case Christine. Introducción a la Microbiología. 2007. Editorial Medica Panamericana. 9ª. Edición. Buenos Aires. Argentina.
- Vásquez Nuñez L.; Ecurra Puicon, R; Aguirre Tocas, R; Vásquez Salazar, G; Vásquez Arca L. Plantas Medicinales del Norte 2010. Innovación Ciencia y Tecnología (FINCyT). Auspiciado por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Vásquez Valles, M; Alvarado Salinas, P; Rodriguez, Haro, I; Saldaña Sevilla W; Reyes Lázaro, W; Vargas Huamán, A. Efecto del Aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* y *Salmonella enteritidis*, en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada. Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 2014.

Yañez C, Carlos; Nurby Rios; Flor Mora; Luis Rojas; Tulia Diaz; Judith Velasco; Nahile Rios y Pablo Melendes. Composición Química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana*. Willf. De los llanos Venezolanos. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela. 2011. Rev. Peru.biol. 18(2):142-151. FCCBB. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

VII. ANEXOS

ANEXO A



REINO	: Plantae
DIVISION	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
ORDEN	: Lamiales
FAMILIA	: Lamiaceae
SUBFAMILIA	: Nepetoideae
TRIBU	: Mentheae
GENERO	: Origanum
ESPECIE	: <i>Origanum vulgare</i> <i>l. 1753</i>

Fig. 51. Clasificación Taxonómica de *Origanum vulgare* “Orégano”.

ANEXO B



REINO	: Plantae
DIVISION	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
ORDEN	: Lamiales
FAMILIA	: Lamiaceae
SUBFAMILIA	: Nepetoideae
TRIBU	: Mentheae
GENERO	: Salvia
ESPECIE	: <i>Salvia officinalis</i>

Fig. 52. Clasificación Taxonómica de *Salvia officinalis* “Salvia”

ANEXO C



REINO	: Plantae
DIVISION	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
ORDEN	: Lamiales
FAMILIA	: Lamiaceae
SUBFAMILIA	: Nepetoideae
TRIBU	: Mentheae
GENERO	: Thymus
ESPECIE	: <i>Thymus vulgaris</i>

Fig.53. Clasificación Taxonómica del Tomillo (*Thymus vulgaris*).

ANEXO E

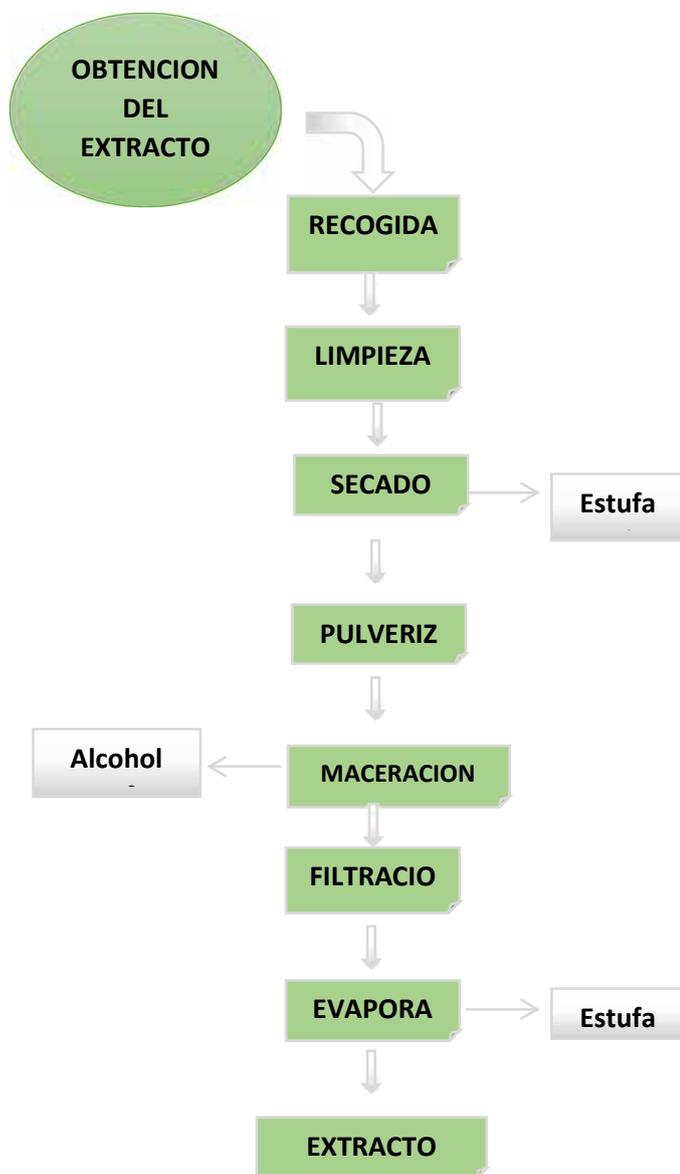
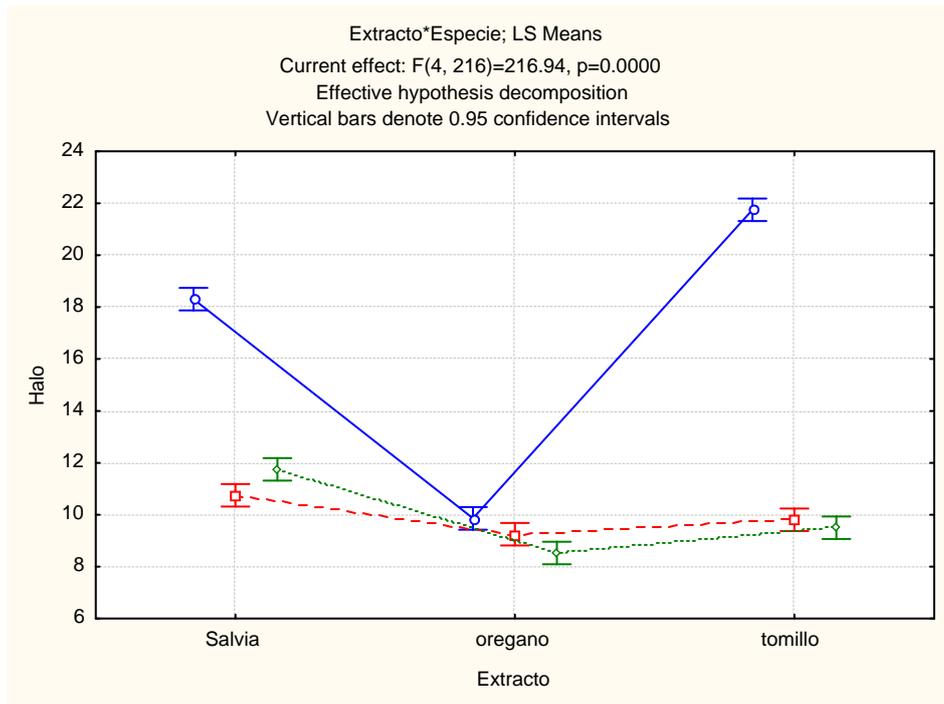


DIAGRAMA DE OBTENCION DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Oryganum vulgare*, *Salvia officinalis* y *Thymus vulgaris*.

ANEXO F

Tabla N°18. Prueba de significación de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de halos de inhibición según la interacción extractos y especies estudiadas.

Extracto /Especie	Promedio de halos de Inhibición (mm)	Significancia (=0.05)
Orégano/ <i>Ps. aeruginosa</i>	8.52778	a
Orégano/ <i>E. coli</i>	9.25	a b
Tomillo/ <i>Ps.aeruginosa</i>	9.5	b
Tomillo/ <i>E.coli</i>	9.80556	b c
Oregano/ <i>S.aureus</i>	9.86111	b c
Salvia/ <i>E. coli</i>	10.75	c
Salvia/ <i>Ps.aeruginosa</i>	11.75	d
Salvia/ <i>S.aureus</i>	18.3556	e
Tomillo/ <i>S.aureus</i>	21.75	f



ANEXO G

Tabla N°19. Prueba de significación de Tukey (0.05) de los promedios de los diámetros de halos de inhibición según la interacción extractos y concentración estudiadas.

Extracto	cc	Promedio de halo (mm)	Significancia ($\alpha=0.05$)
orégano	100	8.00000	a
orégano	200	9.25926	b
orégano	300	9.55556	b
orégano	400	10.03704	b
tomillo	100	11.22222	c
Salvia	100	12.11111	c d
tomillo	200	12.96296	d E
Salvia	200	13.29630	E
Salvia	300	13.85185	E f
tomillo	300	14.51852	f g
Salvia	400	15.14815	g h

