

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO



FACULTAD DE INGENIERÍA

CARRERA DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

Trabajo de grado previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial

TRABAJO DE TITULACIÓN

“ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL Y
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*) SOBRE
Escherichia coli y *Salmonella Sp.*”

AUTOR:

Jairo Leonel Espinoza Castro

TUTOR:

MsC. Julio Andrés Palmay Paredes

Riobamba - Ecuador

2019

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

REVISIÓN DEL TRIBUNAL

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: "Análisis de la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extracto hidroalcohólico de Orégano (*Origanum vulgare L.*) Sobre *Escherichia coli* y *Salmonella Sp.*" presentado por Jairo Leonel Espinoza Castro y dirigida por el MsC. Julio Andrés Palmay Paredes.

Una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en la cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Chimborazo.

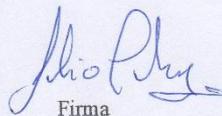
Para constancia de lo expuesto firman:

Msc Byron Herrera
Presidente del Tribunal



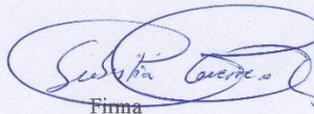
Firma

MsC. Julio Palmay
Director del proyecto de Investigación



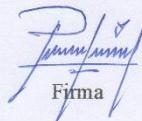
Firma

MsC. Sebastián Guerrero
Miembro del Tribunal



Firma

MsC. Paul Ricaurte
Miembro del Tribunal



Firma

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

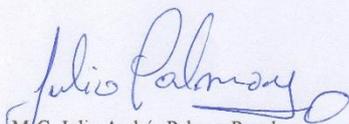
La responsabilidad del contenido de este proyecto de Graduación, nos corresponde exclusivamente a Jairo Leonel Espinoza Castro y al Director del Proyecto MsC. Julio Andres Palmay Paredes, incluyendo todas las tablas y figuras que se encuentran en este trabajo, excepto las que contienen su propia fuente, y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Nacional de Chimborazo.



Jairo Leonel Espinoza Castro.

C.I. 060392311-1

Autor del proyecto.



MsC. Julio Andrés Palmay Paredes.

C.I. 060377948-9

Director del Proyecto de Investigación

DEDICATORIA

Al lograr una meta más de crecimiento y formación personal en mi vida, el cual tiene un valor de importancia muy grande, porque con el mismo se abrirán muchas puertas para mí y mi familia, quiero dedicar este trabajo a todos los que de una u otra manera han sido partícipes del cumplimiento de este sueño.

A Dios.

Por haberme permitido cumplir uno de mis sueños y guiar el camino, acompañándome y siempre levantándome de mis continuos tropiezos, llenando mi vida de bendiciones y protegiendo a las personas que más amo.

A mi hermano Edwin Espinoza Castro que desde el cielo guía, cuida y protege cada paso de mi andar así cada meta, llenando de bendiciones a toda nuestra familia que siempre recordaremos tu sonrisa y pequeñas locuras que llenaban de felicidad nuestros corazones.

A mis padres.

Personas de gran sabiduría que siempre me han brindado su apoyo incondicional en cada momento de mi formación, por sus consejos, valores y la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, muchos de mis logros se los debo a ustedes por creer en mí, ayudándome a crecer como persona y a luchar por lo que quiero alcanzando grandes metas planteadas en mi vida.

A mi mujer e hija: Victoria y Leonella

Mis personas favoritas y más importantes hoy por hoy en mi vida, que día a día han estado con su apoyo constante con una sonrisa en su rostro y sintiéndose orgullosas de mí, llegando a ser mis grandes motivaciones para seguir adelante. Gracias por decidir sus vidas junto a mí. Las Amo.

Jairo Leonel Espinoza Castro

AGRADECIMIENTO

De manera especial al MsC. Julio Andrés Palmay Paredes por el tiempo dedicado para dirigir este trabajo de investigación y transmitir sus conocimientos, por su gran apoyo y motivación para la culminación de mis estudios profesionales y para la elaboración de esta tesis.

A los docentes y en especial a la MsC. Maria Fernanda Rojas miembro encargada del laboratorio de control de calidad de la carrera de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional de Chimborazo; al Ing. Byron Herrera por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional; al MsC. Sebastian Guerrero y MsC. Paul Ricaurte por su apoyo ofrecido en este trabajo; a mi amigos que ha contribuido para con su apoyo para la realización de este trabajo de investigación y que hasta ahora, seguimos siendo amigos.

Jairo Leonel Espinoza Castro.

ÍNDICE

REVISIÓN DEL TRIBUNAL	ii
AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
Índice de Tablas	ix
Índice de Ilustraciones.....	ix
Resumen	xi
Abstract	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo General.....	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. ESTADO DEL ARTE RELACIONADO AL TEMA DE INVESTIGACIÓN ...	4
3.1. Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	4
3.1.1. Descripción.....	4
3.1.2. Hábitat	4
3.1.3. Propiedades terapéuticos del orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	5
3.1.4. Composición Química del Orégano.....	5
3.2. Antecedentes.....	7
3.3. Enfermedades transmitidas por alimentos.....	7

3.3.1. Clasificación de las ETA	8
3.4. Bacterias	8
3.4.1. Definición	8
3.4.2. Escherichia coli.....	8
3.4.3. Forma de Propagación	9
3.4.4. Salmonella	9
3.5. Efecto de microorganismos en la salud por ingesta de alimentos	10
3.6. Aceite Esencial De Orégano.....	11
3.7. Extractos Hidroalcohólicos	11
3.8. Actividad Antimicrobiana	11
3.9. Potencial Antibacteriano Del Orégano	12
3.10. Método de evaluación de actividad antimicrobiano	13
3.11. Método de difusión en agar.....	13
4. METODOLOGÍA	14
4.1. Tipo de estudio	14
4.2. Población y Muestra.....	14
4.3. Procedimiento	15
4.3.1. Obtención del aceite esencial de Orégano	15
4.3.2. Extracto Hidroalcohólico.....	19
4.3.3. Antibiograma	22
4.3.3.10. Interpretación del efecto antibacteriano.....	23

5. RESULTADOS	24
5.1 Antibiograma	24
5.2. Diferenciación Escala Duraffourd	25
5.2.1. Escala Duraffourd del aceite esencial en Escherichia coli y Salmonella	25
5.2.2. Escala Duraffourd del extracto hidroalcohólico en Escherichia coli y Salmonella	28
5.2.3. Escala Duraffourd del extracto hidroalcohólico y aceite esencial frente Escherichia coli.....	31
5.2.4. Escala Duraffourd del extracto hidroalcohólico y aceite esencial frente Salmonella	33
6. DISCUSIONES	36
7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	38
7.1. CONCLUSIONES	38
7.2. RECOMENDACIONES	39
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
9. ANEXOS	44

Índice de Tablas

Tabla 1: Taxonomía de <i>Origanum vulgare</i> L. (Orégano).....	4
Tabla 2: Disposición de Muestras	15
Tabla 3: Diagrama de operaciones del Aceite esencial del Orégano	18
Tabla 4: Diagrama de Operaciones del Extracto Hidroalcohólico del Orégano	21
Tabla 5: Valores medios de la distancia del Halo de inhibición en <i>Escherichia coli.</i> y <i>Salmonella.</i>	24
Tabla 7: Efectividad antibacteriana en la escala Duraffourd de aceite esencial por número de pruebas <i>Escherichia coli.</i> vs <i>Salmonella Sp.</i>	27
Tabla 8: Efectividad Antibacteriana Escala Duraffourd “Extracto Hidroalcohólico” <i>Escherichia coli.</i> vs <i>Salmonella Sp.</i>	30
Tabla 9: Efectividad Antibacteriana Escala Duraffourd por tipo de cepa (<i>Escherichia coli.</i>).....	32
Tabla 10: Efectividad Antibacteriana Escala Duraffourd por tipo de cepa (<i>Salmonella</i>)	34

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1: Estructura Química Principales compuestos encontrados en el Orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.).....	6
Ilustración 2: Principales Flavonoides del Orégano	6
Ilustración 3: Bacteria <i>Escherichia coli.</i>	8
Ilustración 4: Bacteria <i>Salmonella</i>	9
Ilustración 5: Muestras posicionamiento triangular (Blanco-Extracto Hidroalcohólico-Aceite Esencial) Comparativo	15
Ilustración 6: Esquema de Destilación por arrastre de vapor.....	17

Ilustración 7: Media de halos más diferenciación Duraffourd	25
Ilustración 8: Media de halos más diferenciación Duraffourd (Extracto hidroalcohólico Origanum vulgare L)	28
Ilustración 9: Media de halos más diferenciación Duraffourd (Aceite esencial y Extracto hidroalcohólico de Origanum vulgare L) cepa Escherichia coli	31
Ilustración 10: Media de halos más diferenciación Duraffourd (Aceite esencial y Extracto hidroalcohólico de Origanum vulgare L) cepa Salmonella	33
Ilustración 11: Oreo del orégano	44
Ilustración 12: Separación de las hojas y los tallos de la planta de orégano	44
Ilustración 13: Colocar las hojas de orégano en las bandejas del secador.....	44
Ilustración 14: Autoclavado de material de trabajo	44
Ilustración 15: Preparación por Pureza de “Extracto Hidroalcohólico” y “Aceite Esencial”	44
Ilustración 16: Cabina de flujo laminar para trabajar en siembras de microorganismos	44
Ilustración 17: Análisis microbiológico.....	44

Resumen

La investigación determina la actividad antimicrobiana del *Origanum vulgare L.* (TIPO) mediante dos técnicas de extracción de compuestos activos del material vegetal (hojas), tales como Aceite esencial y extracto hidroalcohólico frente a cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Salmonella*, principales bacterias patógenas transportadas por alimentos en mal estado o por mal manejo en la producción. Se elaboró un aceite esencial (técnica de destilación por arrastre de vapor), obteniendo 22 ml luego del procedimiento, mismo que fue diluido con suero fisiológico, para obtener cuatro concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100%, caso similar realizado para el extracto hidroalcohólico dilución a cantidades iguales de alcohol potable al 96% y agua, con hojas de Orégano, previamente deshidratadas, cantidad total de extracto igual a 45 ml concentrado, sujeto a cuatro concentraciones similares al aceite esencial de comparación. Mediante pruebas de sensibilidad *in vitro* se obtuvo que: el tratamiento más eficaz en cepas de *Escherichia coli* del aceite esencial, es al 100% (totalmente puro) con un halo medido de 16,33 mm, calificado en la escala Duraffourd como muy sensible (++)), mismo caso para el Extracto hidroalcohólico la concentración al 100% (totalmente puro) es la de mayor eficacia con un halo de inhibición medido igual a 20,33 mm encasillándolo en la escala como sumamente sensible (+++). La cepa *Salmonella sp.* determina mayor efectividad del aceite esencial al nivel de pureza de 25% con un halo medido igual a 13,5 mm, encasillándose en la escala como sensible (+), de igual manera para la misma cepa la efectividad del extracto hidroalcohólico son al 75 y 100% calificando su rendimiento en la escala Duraffourd como sumamente sensible (+++) con halos calculados en mm iguales a 29,5 y 31,16 correspondientemente.

Abstract

ABSTRACT

This research determines the antimicrobial activity of *Origanum vulgare* L. (TYPE) by means of two techniques for extracting active compounds from the plant material (leaves), such as essential oil and hydroalcoholic extract against bacterial strains of *Escherichia coli* and *Salmonella*, main pathogenic bacteria transported for food in poor condition or for poor handling in production. The essential oil was elaborated (steam distillation technique), obtaining 22 ml after the procedure, which was diluted with physiological saline, to obtain four concentrations at 25%, 50%, 75%, and 100%. Similar case carried out for the hydroalcoholic extract dilution to equal quantities of 96% pure alcohol and water, with oregano leaves, previously dehydrated, the total amount of extract equal to 45 ml concentrated, subject to four concentrations similar to the essential oil of comparison. In vitro sensitivity tests demonstrated that: the most effective treatment in strains of *Escherichia coli* essential oil, is 100% (entirely pure) with a measured halo of 16.33 mm, qualified in the Duraffourd scale as very sensitive (++) . The same case for the hydroalcoholic extract, the 100% concentration (entirely pure) is the most effective with a halo of inhibition measured equal to 20.33 mm, encasing it on the scale as highly sensitive (+++). The strain *Salmonella* sp. determines the effectiveness of the essential oil at the purity level of 25% with a measured halo equal to 13.5 mm, being classified on the scale as sensitive (+). In the same way for the same strain, the effectiveness of the hydroalcoholic extract is at 75 and 100% rating their performance on the Duraffourd scale as highly sensitive (+++) with halos calculated in mm equal to 29.5 and 31.16 correspondingly.

Reviewed by: Solís, Lorena

LANGUAGE CENTER TEACHER



1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias son organismos microscópicos, unicelulares los hay en diferentes tipos, viviendo en todos los medios y ambientes imaginables. Teniendo como medio el 100% de lugares habitables por el ser humano; suelo, agua, aire, mar, teniendo espacio en las profundidades de la corteza terrestre e incluso se ha demostrado resistencia en desechos radioactivos (Varela Z. , 2015).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA's) se remontan desde los inicios del hombre. Causando brotes mínimos de enfermedad, pero el cambio de vida ha tomado un rol importante para está, llegando a ser una enfermedad de preocupación mundial. Los microorganismos, habitualmente, se propagan en los alimentos en mínimas cantidades, encontrando en estos las condiciones apropiadas que les permitan subsistir y multiplicarse hasta alcanzar niveles necesarios para ser infectantes u originar la toxina causante de la enfermedad. Viviendo en un mundo microbiano, hasta el momento se han citado más de 200 enfermedades transmitidas por agentes infecciosos alimentarios (Osorio, 2011).

Para ello la medicina natural, mediante procesos agroindustriales de extracción, ha llamado la atención para combatir a los agentes patógenos a partir de las propiedades benéficas que poseen las plantas, en la industria alimentaria la reducción de bacterias o la posible pérdida total son de vital importancia en cada uno de los escalones productivos de un proceso agroindustrial, ya que en un futuro los inhibidores de crecimiento bacteriano de procedencia artificial sintetizado en laboratorio producirá daño en nuestro organismo.

En los últimos años se ha tomado especial énfasis el estudio de plantas medicinales, entre ellos estudios antisépticos, anestésicos, antifúngico, analgésico y antimicrobiano, siendo este último el que se comprobará mediante un estudio in vitro sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella Sp.*, cuyo efecto se atribuye a los compuestos fenólicos del Orégano (*Origanum Vulgare L.*) mediante dos técnicas de extracción, aceite esencia y extracto hidroalcohólico, desnaturalizando ciertos componentes de la membrana celular de la bacteria(Ortiz, 2016).

Este estudio presenta el *Origanum vulgareL.* (Orégano) como alternativa antimicrobiana, en esta planta aromática se destacan acciones digestivas, bacteriostáticas y antioxidantes, evidenciada recalcada en distintos trabajos de

investigación. El orégano es una planta aromática originaria del mediterráneo, con una adaptación óptima sobre los 2600 m.s.n.m, por debajo de esta altitud la concentración del aceite esencial (Carvacrol y timol) disminuye. (Rumiche, 2012). Los principios activos carvacrol y el timol presentes en el Orégano, son agentes antimicrobianos, presentando algunos sitios de acción en la célula en donde ocurre daño a la membrana citoplasmática, degradación de la pared celular, daño a las proteínas, coagulación del citoplasma y disminución de la fuerza motriz bacteriana. (Paluo, 2014).

La *Escherichia coli*, usualmente conocida como *E. coli*, es un microorganismo que comúnmente se encuentra en el sistema digestivo de seres humanos y animales de sangre caliente. Cientos de miles de personas se enferman cada año a causa de la *Escherichia coli*. Produciendo cientos de muertos, en los últimos años, ha habido un aumento de los brotes, con un impacto significativo en los sistemas de salud y la producción agrícola. Entre las fuentes más comunes de infección transmitidas por alimentos (ETA), se presenta los lácteos y jugos no pasteurizados, carne elaborada y cocida de manera insuficiente, frutas y hortalizas, además de un manejo y almacenamiento insalubre de los alimentos preparados. (FAO, 2015).

Por otro lado la *Salmonella* es una bacteria perteneciente a la Familia Enterobacteriaceae, siendo estas patógenas provocando cuadros que afectan especialmente al intestino tanto de hombres como de animales. El conocimiento patológico de este microorganismo se remonta al año de 1885, bacteria aislada por los Smith y Salmon en cerdos muertos, por dicho gesto al primer representante de este género individualizado se le denominó *Salmonella cholera-suis*. Los mecanismos de transmisión son variados, animal al hombre por carnes infectadas o alimentos contaminados con despojo animal, hombre a hombre por alimentos contaminados con degradación humana y mediante la contaminación cruzada (Prado, 2011).

Por tal razón el Objeto de esta investigación será la determinación de la actividad antimicrobiana mediante dos técnicas de extracción de orégano (*Origanum vulgare L.*), con respecto a dos cepas Gram negativas (-), como lo son: *Escherichia coli* y *Salmonella sp*, causantes de las “ETA’s” enfermedades transmitidas por alimentos.

2. OBJETIVOS

2.1.Objetivo General

- Analizar el efecto antimicrobiano “*in vitro*” del aceite esencial y extracto hidroalcohólico de *Orégano (Origanum vulgare L.)* frente a dos cepas de bacterias Gram negativas, tales como *Escherichia coli* y *Salmonella* causantes de las enfermedades transmitidas por alimentos.

2.2.Objetivos Específicos

- Extraer el aceite esencial y extracto hidroalcohólico del Orégano (*Origanum vulgare L*)
- Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico del Orégano (*Origanum vulgare L*) con diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%).
- Comparar el efecto antimicrobiano del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de Orégano (*Origanum vulgare L*).
- Establecer el mejor tratamiento con efecto antimicrobiano entre las dos técnicas de extracción

3. ESTADO DEL ARTE RELACIONADO AL TEMA DE INVESTIGACIÓN

3.1. Orégano (*Origanum vulgare*)

Origanum vulgare comúnmente conocido como “Orégano”, comprende varias especies de plantas, utilizados con fines culinarios, siendo uno de los más comunes el originario de Europa el *Origanum vulgare*, presenta en su composición el limoneno, el b-cariofileno, el -cimeno, el canfor, el linalol, el -pineno, el carvacrol y el timol. Su contenido depende de la especie, el clima, la altitud, la época de recolección y el estado de crecimiento (Arcila, 2012).

Tabla 1: Taxonomía de *Origanum vulgare* L. (Oregano)

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Subfamilia	Nepetoidea
Genero	<i>Origanum</i>
Especie	<i>Origanum vulgare</i> L.

Fuente: (Limachi, 2012)

3.1.1. Descripción

Planta Aromática. Presenta una base leñosa, con un tallo de carácter herbáceo de alcance hasta 1 m de altura, hojas pecioladas, ovadas, con presencia de vellosidad en su parte baja y de superficie puntada. Glándulas esferoidales que contienen las esencias. Con florecimiento en la época de verano (Tellez L. , 2014).

3.1.2. Hábitat

En todo tipo de sustratos, en general en claros de bosques, pastizales, matorrales, pedregales, en zonas secas y soleadas, generalmente en características calizas localizadas cerca de donde se acumulan sustancias nitrogenadas. Con una altitud desde el nivel del mar a los 800 m (Morales, 2012).

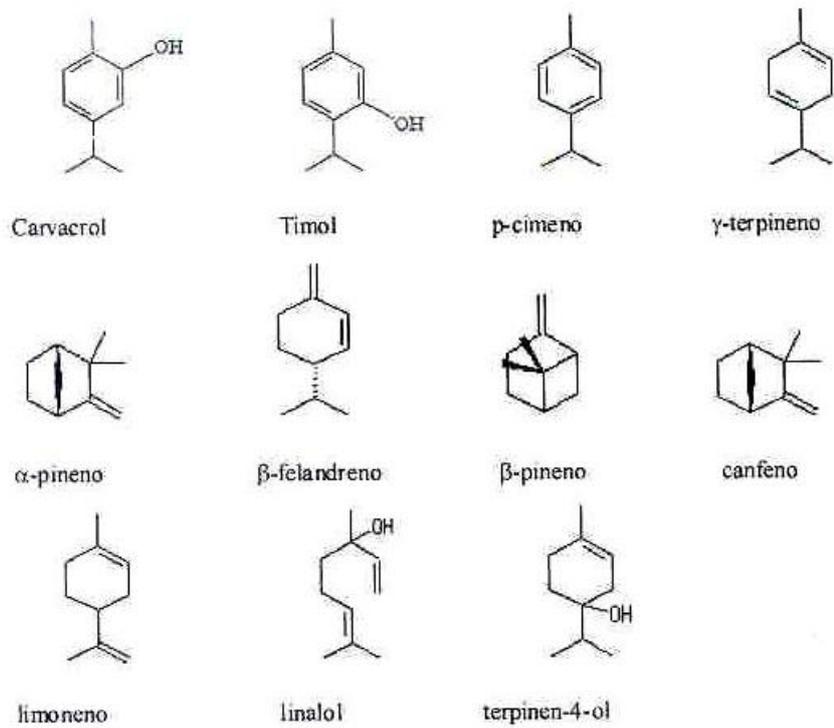
3.1.3. Propiedades terapéuticas del orégano (*Origanum vulgare* L.)

- El Orégano es utilizado para trastornos digestivos, como flatulencia, espasmos o cólicos de los órganos digestivos. Por su acción antibiótica y aromática es un buen condimento.
- Afecciones respiratorias, como laringitis. Presentando también una acción expectorante y de uso tanto interno como externo.
- Se le atribuye también el control y calma de las dolencias musculares, torticolis y lumbago, aplicando externamente tanto en cataplasma como en fricciones sobre la piel (Pascal, 2015).

3.1.4. Composición Química del Orégano

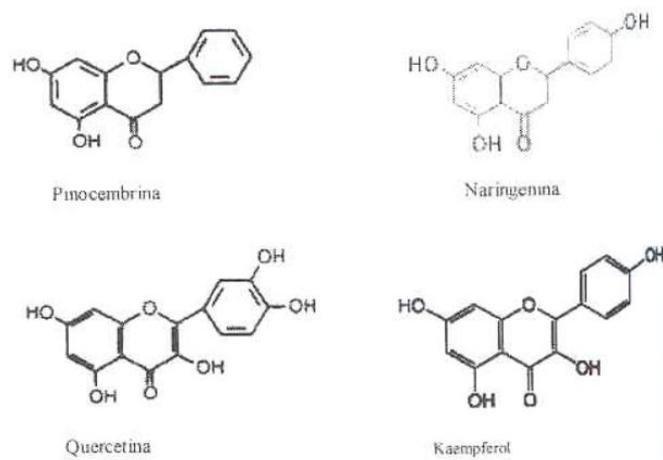
Existen diversas bibliografías sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales. Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. En *Origanum vulgare* mediante hallazgos de laboratorio se han encontrado ácidos coumérico, ferúlico, caféico, r - hidroxibenzóico y vainillínico. Los ácidos ferúlico, caféico, r -hidroxibenzóico y vainillínico están presentes en *O. onites*. Los aceites esenciales de especies de *Lippia* contienen limoneno, b -cariofileno, r -cimeno, canfor, linalol, a -pineno y timol, los cuáles pueden variar de acuerdo al quimiotipo. En extractos metanólicos de hojas de *L. graveolens* se han encontrado siete iridoides minoritarios conocidos como loganina, secologanina, secoxiloganina, dimetilsecologanosido, ácido logánico, ácido 8-epi- logánico y carioptosido; y tres iridoides mayoritarios como el ácido carioptosídico y sus derivados 6'-O-p-coumaroil y 6'-O-cafeoil. También contiene flavonoides como naringenina y pinocembrina, lapachenol e icterogenina. Las siguientes figuras representan las estructuras químicas de algunos de los compuestos principales presentes en el orégano (Cynithia & Guadalupe, 2011).

Ilustración 1: Estructura Química Principales compuestos encontrados en el Orégano
(*Origanum vulgare L.*)



Fuente: (Arsila, 2011)

Ilustración 2: Principales Flavonoides del Orégano



Fuente: (Arsila, 2011)

3.2. Antecedentes

De las variedades de orégano con fines culinarios más tradicionales son *Origanum vulgare*, de procedencia europea y el *Lippia graveolens*, de procedencia mexicana. En el caso de la variedad europea (*Origanum vulgare*) de la familia *Labiatae* hay muy poca bibliografía, este no posee efectos tóxicos si se consume en su estado natural o a dosis y tiempo prudente. En las dos variedades se ha verificado propiedades antioxidantes, antimicrobiano, antitumoral, antiséptica, tónica, digestiva e insecticida, debido a que contiene varios componentes de importancia comercial de tipo terpenoide (carvacrol, timol, limoneno), hidrocarbonados (β -cariofileno, p-cimeno, canfor, linalol, a-pineno), entre muchos otros (Xóchihua, 2013).

3.3. Enfermedades transmitidas por alimentos

La Organización mundial de salud (OMS) define a las enfermedades transmitidas por los alimentos como “de carácter infeccioso o tóxico causadas por bacterias, virus, parásitos, o sustancias introducidas en el organismo a través del agua o alimentos contaminados” ((OMS), 2018). Para que ocurra una ETA, el patógeno o su toxina deberá estar presente en el alimento, pero la sola presencia del virus no significa una enfermedad potencial. Por ende

- El patógeno debe estar presente en cantidad suficiente como para causar una infección o para producir toxinas
- El alimento debe ser capaz de sustentar el crecimiento de los patógenos, o sea, debe presentar características intrínsecas que favorezcan al desarrollo del agente
- El alimento debe permanecer en la zona de peligro de temperatura durante tiempo suficiente como para que el organismo patógeno se multiplique y/o produzca toxina. Otras condiciones extrínsecas deben prevalecer para que esta multiplicación y/o producción de toxina sea favorecida.
- Debe ingerirse una cantidad suficiente de alimento conteniendo el agente, para que la barrera de susceptibilidad del individuo sea sobrepasada ((OMS), 2018).

3.3.1. Clasificación de las ETA

La clasificación puede estar definida como infecciones, intoxicaciones o infecciones mediadas por toxinas.

La Infección.- Transmitida por un alimento, enfermedad que resulta de la ingesta de alimento con microorganismos patógenos vivos como salmonella.

La Intoxicación.- ocurre cuando se ha desarrollado la toxina que produce los mohos o las bacterias en el alimento en cantidades que afectan a la salud.

La Infección mediada por toxinas.- con características inolora e insabora capaces de causar la enfermedad después de eliminado el microorganismos ((OPS), 2006).

3.4. Bacterias

3.4.1. Definición

En el medio ambiente que vivimos existen dos tipos de células, la procariota y la eucariota, la primera es evolutivamente más antigua, solo se encuentran como organismos unicelulares y constituyen las bacterias. El resto de organismos vivos unicelulares y pluricelulares está formado por células eucariotas (Herna Ortiz, 2013).

3.4.2. *Escherichia coli*

Ilustración 3: Bacteria *Escherichia coli*.



Fuente:(FAO, 2015)

Microorganismo en forma de bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, comúnmente móvil por flagelos, que se encuentra como huésped en el intestino de animales de sangre caliente. Este microorganismo es un indicador de posible contaminación fecal y presencia de patógenos en agua y alimentos debido a que se encuentra abundantemente en heces de humanos y animales. (Varela Z. , 2015). Productoras de toxinas Shiga, en

general cualquier persona puede infectarse con este tipo de patógeno, pero son los niños y ancianos los más propensos a desarrollar complicaciones. Con una sintomatología que se desarrolla a los 4 días de su ingesta, siendo los síntomas más comunes diarrea (en algunas ocasiones sanguinolenta), calambres estomacales intensos y vómitos. En algunas ocasiones acompañadas con fiebre. En algunas personas este patógeno puede ocasionar un problema grave llamado síndrome urémico hemolítico (HUS). Enfermedad que puede destruir las células rojas de la sangre y causar insuficiencia renal, comúnmente ocurre en niños menores de 5 años(SHEET, 2014).

3.4.3. Forma de Propagación

Por lo general, las personas se infectan al ingerir alimentos o bebidas contaminadas que no se han cocido o pasteurizado (tratamiento por calor), relacionandobrotos de infeccio por los siguientes casos:

- Ingerir carne bovina cruda o a medio cocer (poniendo especialmente a la carne molida) contaminada por estiércol en mataderos
- Beber leche de vaca sin pasteurizar (cruda) contaminada en el proceso de ordeño o durante la cadena de producción del enfundado de la misma.
- Productos enlatados, zumos, jugos de empresas que no presentan Buenas Prácticas de Manufactura (BPM)
- Ingerir alimentos frescos crudos o cocidos que se contaminaron con el jugo de la carne cruda en la cocina (Healt, 2015).

3.4.4. Salmonella

Ilustración 4: Bacteria *Salmonella*



Fuente:(Badiola, 2015)

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Son en forma de Bacilos Gram negativos móviles, Originando en su mayoría sulfuro de hidrogeno o gas por fermentación de los hidratos de carbono. Inicialmente se agruparon en más de 2000

especies (serotipos) en función de sus antígenos somáticos (O) y flagelares (H) (Esquema de Kauffman- White). Actualmente se considera una clasificación de dos o tres especies (*Salmonella entérica o Salmonella choleraesuis*, *Salmonella bongori* y *Salmonella typhi*) y los serotipos se consideran subespecies. (Vacarcel, 2014).

La salmonella es la causa mayoritaria de los brotes de toxiinfección alimentaria y de alteraciones gastrointestinales. El principal reservorio, son aves de corral, ganado vacuno y el porcino. Por lo tanto son fuentes de infección importantes las carnes de estos animales y los huevos. Principalmente los ovoproductos y los que llevan en su composición esta materia prima han sido los alimentos que han generado el mayor índice de brote de Salmonella y los de mayor riesgo sanitario, especialmente los que contienen huevo crudo en su composición, como la mayonesa, las salsas, los helados, las cremas, las masas de pastelería, etc. Otros medios de transporte alimentario son los lácteos no pasteurizados, el chocolate y las carnes fermentadas. El paso principal de este patógeno es por vía oral y por contacto con heces de animales infectados. Presentando resistencia al pH del estómago, evadiendo las defensas intracelulares de las células intestinales sin ser destruida, a continuación realizando un proceso de multiplicación dentro de la célula. Posteriormente pasa a la sangre y produce una infección sistémica, multiplicándose en macrófagos, y localizándose en el hígado, bazo, médula ósea, etc. Comparado con otras especies, la incidencia de Salmonella en conejos es baja, y es hallada con poca frecuencia en su carne (CRESA, 2012).

3.5.Efecto de microorganismos en la salud por ingesta de alimentos

Las enfermedades transmitidas por alimentos son generalmente de carácter infeccioso o tóxico y son causadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que penetran en el organismo a través del agua o alimentos contaminados.

Los patógenos de transmisión por alimentos pueden causar diarrea o infecciones debilitantes, como la meningitis. Las enfermedades transmitidas por los alimentos pueden causar discapacidad persistente y muerte. Algunos ejemplos de alimentos insalubres son los de origen animal no cocinado, las frutas y hortalizas contaminadas con heces y los mariscos crudos que contienen biotoxinas marinas

“Informe de la OMS señala que los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria” ((OMS), 2018).

3.6. Aceite Esencial De Orégano

Reconocido como el primer antiséptico natural con poder de inhibición microbiano. Por ende el Aceite Esencial de *Origanum vulgare L.* puede matar o bloquear el crecimiento de cualquier hongo, así como también inhibe el crecimiento de la mayoría de bacterias. En el aceite esencial los compuestos carvacrol y timol son mayoritariamente activos y estos trabajan con efecto sinérgico para potenciar las propiedades antisépticas (Bastos M. , 2011).

El Orégano en su estado de Aceite es quizás el más poderoso agente anti fúngico herbal. Bibliográficamente seguro, desde que es enteramente no tóxico, aumentando así su eficacia. El aceite esencial de *Origanum vulgare L.* es un eficaz calmante de dolor, siendo un poderoso antioxidante a la vez. Asimismo, el aceite esencial mejora la digestión estimulando el flujo de bilis (Paola, 2011).

3.7. Extractos Hidroalcohólicos

Son Extractos líquidos concentrados, obtenidos de la extracción a partir de una materia prima desecada de origen vegetal (Planta o una parte de ella), por maceraciones, utilizando como solvente alcohol y agua. Presentando sedimento, color y aroma característicos de la planta de la cual se obtiene (Gonzalez, 2014).

3.8. Actividad Antimicrobiana

Un antimicrobiano es un agente que interrumpe una función microbiana presentando a la vez una toxicidad selectiva. Estos agentes (Antibióticos) presentan en su composición espectros de inhibición, muchos de ellos son efectivos solo contra una variedad limitada de patógenos mientras que otros son de amplio espectro, es decir atacan diferentes clases de patógenos. Entre los microbianos existen dos clases los estáticos y los cidas (Capaces de matar a microorganismos). Estos Agentes estáticos inhiben el crecimiento microbiano de modo reversible, es decir si el agente es removido, los microorganismos recuperaran de nuevo el crecimiento, en cambio los agentes cidas destruyen el microorganismo por completo, su actividad depende de la concentración y el agente puede ser solamente estático a bajos niveles. Un agente puede ser cida para unas especies y estático para otras.

Un ensayo de actividad antimicrobiano puede ser afectado por innumerables factores tales como: el método de extracción, el volumen de inóculo, la fase de crecimiento, el medio de cultivo, el pH, el tiempo y la temperatura de incubación.

Ciertos datos de confianza de estos agentes son obtenidos a partir de la concentración inhibitoria mínima (CIM), la concentración mínima bacteriana (CMB) y el tiempo de muerte. La concentración inhibitoria mínima mide el desempeño antibacteriano del agente, a través de la más baja concentración de una droga que previene el crecimiento de un patógeno particular. Siendo la concentración mínima bacteriana la concentración más baja que mata al patógeno.

Hasta el momento existe una demanda significativa de consumidores de alimentos que son mínimamente procesados y libres de conservantes sintéticos de síntesis con la percepción de ser “natural”. Por ende, la industria Agroalimentaria se enfrenta a desafíos importante de producir alimentos naturales antimicrobianos y antioxidantes para reducir el uso de conservantes sintéticos.

Los agentes microbianos son utilizados en los alimentos por las siguientes razones:

- Para controlar los procesos naturales de deterioro (Conservación de Alimentos)
- Para prevenir y controlar el crecimiento de microorganismo, incluido patógenos.

Estos antimicrobianos naturales pueden ser de origen animal, vegetal y de origen microbiano.

3.9.Potencial Antibacteriano Del Orégano

El Orégano posee propiedades antibacterianas ya que puede ayudar en la prevención de infecciones bacterianas, incluyendo infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel e incluso intoxicaciones por alimentos. Un estudio sobre las cualidades de varios aceites desarrollados los de mayor nivel de actividad antibacteriano son los aceites de orégano y tomillo.

Del desarrollo de un estudio que duro 6 semanas en individuos con parásitos suplementarios de 600 mg. Diarios de aceite de orégano, llevo a cabo la destrucción en su totalidad de organismos nocivos. Así mismo puede protegernos contra una gran variedad de infiltración de parásitos diferentes, tanto dentro del cuerpo, así como el

entorno físico. Esto incluye gusanos redondos, gusanos planos chinchas, piojos, pulgas y mosquitos (Bussmann & Sharon, 2015).

3.10. Método de evaluación de actividad antimicrobiano

La administración de Alimentos y medicamentos (FDA) aprueba el método de difusión por disco, esta técnica se ha considerado como una norma para el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios, siendo el mismo el método técnico más a menudo utilizado para las proyecciones a los antimicrobianos de los aceites esenciales y extractos (Solis, 2011).

3.11. Método de difusión en agar

Para los estudios preliminares de actividad antimicrobiana el método de difusión por agar es el de mayor relevancia. Un disco de papel con anterioridad esterilización empapada con igualdad de oportunidades se coloca en la superficie de una placa de agar y después del desarrollo se mide la zona de inhibición microbiana (Solis, 2011).

3.12. Determinación del efecto antibacteriano

Se realizó tanto cuantitativo como cualitativo, de manera cuantitativa utilizando un calibrador para métodos de ensayo de la susceptibilidad, se procedió a la medición de los halos de inhibición de todas las cajas Petri.

Para realizar la medición de manera cualitativa nos basamos en las tablas de actividad antimicrobiana sustentada en porcentajes, la cual establece el diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano y lo encasilla dentro de los parámetros determinados como las pautas de Draffourd que nos indica:

- Para un diámetro inferior a 8 mm, se otorga la característica nula (-)
- Para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm, se lo define como sensibilidad imite (Sensible = +)
- Un diámetro entre 14 y 20 mm, se lo encasilla como medio (muy sensible =++)
- Finalmente para un diámetro superior a 20 mm el microorganismo es sumamente sensible (+++) (Aigaje, 2016).

4. METODOLOGÍA

4.1. Tipo de estudio

La metodología que se utilizó en el desarrollo de esta investigación fue:

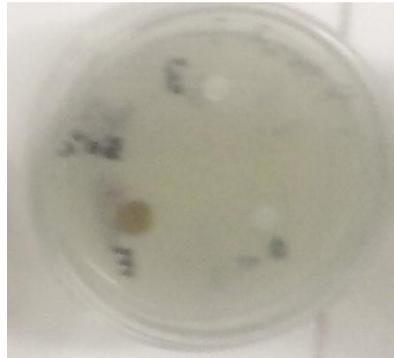
Es “**Experimental**” por que para realizar el presente estudio se manipula variables independientes, controlando minuciosamente cada eslabón del desarrollo de la investigación. Además según la toma de datos “**Prospectiva**” , ya que los datos fundamentales necesarios para el estudio son recolectados con forme sucede y progresa la experimentación.

4.2. Población y Muestra

La población a trabajar son cepas estándar de *Escherichia coli* y *Salmonella Sp.* se obtuvieron del “Laboratorio de Análisis Bioquímico y Bacteriológico” de la facultad de Ciencias de la “*ESPOCH*” Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Posteriormente se realizó una desinfección del Orégano en planta, el deshojado y el secado de 15 kg de hojas las mismas realizadas en el laboratorio de Control de Calidad de la carrera de Ingeniería Agroindustrial, de la Universidad Nacional de Chimborazo, donde paso por un secado por convección en un deshidratador de bandejas. Se obtuvo una cantidad de materia seca (Hojas) de 1,088 kg, para luego pasar al proceso de extracción. Una vez extraído obtuvo un nivel de pureza de extracto y aceite que va entre (25%, 50%, 75% y por último un 100%) se sembró por nivel de pureza 6 cajas petri por cepa (Como se muestra en la Tabla 2)

De esta manera logrando un total de 96 muestras en comparación con un blanco de estudio sembrado de manera triangular (Blanco- Extracto Hidroalcohólico-Aceite esencial) obtenido a partir de una solución de suero fisiológico. Siembra comparación, representada de manera gráfica en la siguiente imagen.

Ilustración 5: Muestras posicionamiento triangular (Blanco-Extracto Hidroalcohólico-Aceite Esencial) Comparativo



Fuente: Espinoza J. (2018)

Tabla 2: Disposición de Muestras

Muestras	Extracto Hidroalcohólico				Aceite Esencial			
	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%
Cepa	25%	50%	75%	100%	25%	50%	75%	100%
<i>Escherichia coli</i>	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R
<i>Salmonella Sp.</i>	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R	6 R

R= Repeticiones

4.3.Procedimiento

4.3.1.Obtención del aceite esencial de Orégano

4.3.1.1. Materia Prima: La obtención de la planta de Orégano se obtuvo de la asociación *JAMBI KIWA*, asociación que presenta sus funciones en el Barrio Santa Cruz- Riobamba- Chimborazo. Trasladas al laboratorio de Operaciones Unitarias de la Escuela de Ingeniería Industrial de la Universidad Nacional de Chimborazo, colocadas de forma conjunta en costales negros, tratando lo más posible el alejamiento de la luz, evitando con esto la pérdida de principios activos por oxidación.

4.3.1.2. Inspección y Limpieza del Área de Trabajo: La asepsia en cada uno de los escalones del proceso de desarrollo es de vital importancia por tal razón la desinfección

del área de trabajo se desinfecto con una solución de cloro-agua (Relación 1:5), es decir una parte de solución concentrada de cloro y cuatro partes de agua. Finalmente una posterior capa de desinfección con alcohol.

4.3.1.3. Control de Calidad: Esta parte de la obtención del extracto hidroalcohólico es imprescindible ya que de otra manera el rendimiento y la calidad se verán afectadas. En este punto se realiza una selección y clasificación, ya sean estos por pardeamiento (quemaduras por el sol), hojas picadas, tallos rotos o quebradizos, tamaño.

4.3.1.4. Pesado: Se obtuvo un peso tras todos los anteriores procedimientos de 2 kg (2000g) de orégano totales para el cumplimiento de extracción.

4.3.1.5. Lavado: El proceso de limpieza de la materia prima (Orégano) se realizó con la hoja de seguridad que presenta el cloro comercial para alimentos relación cloro-agua (1:1001), es decir una parte de cloro y mil partes de agua (1ml de cloro en 1000 ml de agua).

4.3.1.6. Secado: El proceso de secado se realizó por un secador de bandejas presente en el laboratorio de operaciones unitarias de la Escuela de Ingeniería Industrial, usando un deshidratador de aire forzado (Convección), que combina un flujo constante de aire con una fuente externa de calor. La base de la cámara en la que se colocó las hojas del Orégano se cubre con una lámina de papel aluminio. Presentando un ventilador que impulsa el aire caliente a través del producto

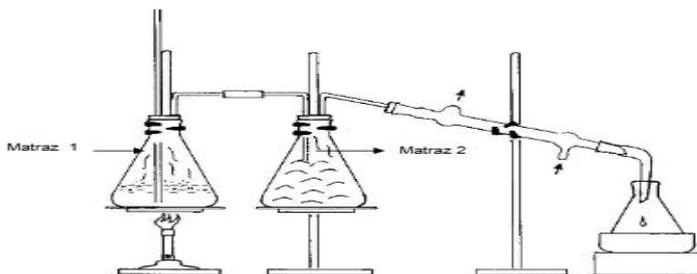
4.3.1.7. Destilación por Arrastre de Vapor: Para el desarrollo de este procedimiento, se realizó el montaje del equipo de la siguiente manera. Se colocó agua destilada en el primer matraz, teniendo este el trabajo de un generador de vapor, seguidamente en un segundo matraz se colocó hojas previamente deshidratadas (secas) evitando que la conexión de vidrio al tapar no sea obstruida por hojas, ya que no existirá el paso de corriente de vapor.

Una vez ensamblada esta primera parte se calentó con un mechero el primer matraz, hasta su punto de ebullición, con el fin de que sea este el vapor que pasara al segundo matraz, extrayendo de esta manera el aceite esencial de orégano.

Posteriormente de la destilación final se extrajo totalmente el aceite esencial, colocando en el embudo de separación el destilado, de esta manera separando la mayor parte de la

fracción acuosa, de esta manera recolectando el extracto orgánico en un matraz, por último se agregó sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua remanente.

Ilustración 6: Esquema de Destilación por arrastre de vapor



Fuente: (Pereyra, 2011)

4.3.1.8. Decantación: Se realizó una decantación por extracción simple. Colocando un embudo decantador en su respectivo soporte con la llave del grifo en posición cerrada, se vertió nuestro extracto orgánico (Orégano), seguidamente nuestro disolvente extractor que fue agua destilada por la parte superior del embudo. Seguidamente se cerró con el tapón, cuidadosamente con las dos manos (una de ellas sujetando el tapón y otra la llave cerrada) se volteo suavemente, evitando una sobrepresión, eliminándola abriendo la llave para la salida de estos gases, repitiendo el mismo las veces necesarias hasta que esta salida de gas desaparezca. Por último se dejó reposar hasta su separación de fases. Finalmente se quitó el tapón y se vertió la fase inferior en un vaso de precipitación y la parte superior en otro recipiente pero por la boca del embudo para evitar contaminaciones.

4.3.1.9. Centrifugado: Se colocó la muestra decantada **en** tubos de ensayo para posteriormente, ordenadamente ubicarlas en la centrifuga marca el modelo y año a ejemplo

4.3.1.10. Etiquetado de Diferenciación: Se recalca este etiquetado ya que no es un etiquetado de producción de venta al público, mediante este tipo de etiquetado diferenciamos un aceite esencial de un extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare* (Orégano)

4.3.1.11. Almacenamiento: Se lo hizo en lugares frescos, evitando el contacto del sol o de algún espectro de luz, durante 8 Días.

Tabla 3: Diagrama de operaciones del Aceite esencial del Orégano

Operación	Diagrama Operacional	Cantidad de Procesamiento (kg)	Tiempos (m)	Representación Porcetual en el producto final (%)
Recolección del <i>Origanum vulgare L.</i> (Orégano)			20	
Inspección y limpieza del área			20	
Control de Calidad, Selección y clasificación (Picados-Deteriorados)			30	
Pesado		13	20	100%
Lavado (agua + cloro)			20	
Deshojado-Secado(T=30°C)		1.040	360	8%
Extracción de aceite esencial (Destilación por arrastre de vapor 4L de agua)			120	8%
Decantación		1	20	
Centrifugado (100 rpm)			15	
Purificación (Sulfato de sodio)			20	
Concentración			20	
Eticado de diferenciación			5	
Almacenamiento				
TOTAL		1	670	100%

Resumen					
Actividad	Operación	Operación Combinada	Inspección	Almacenamiento	Total
Símbolo					
Cantidad	9	2	0	2	13

Fuente: Espinoza J. (2018)

4.3.2. *Extracto Hidroalcohólico*

4.3.2.1. Materia Prima: La obtención de la planta de Orégano fue mediante trámite pertinente a la asociación **JAMBI KIWA**, asociación que presenta sus funciones en el Barrio Santa Cruz- Riobamba- Chimborazo. Trasladas de la misma al laboratorio de Operaciones Unitarias de la Escuela de Ingeniería Industrial de la Universidad Nacional de Chimborazo, colocadas de forma conjunta en costales negros, tratando lo más posible el alejamiento de la luz, evitando con esto la pérdida de principios activos por oxidación.

4.3.2.2. Inspección y Limpieza del Área de Trabajo: En el estudio del presente trabajo la asepsia en cada uno de los escalones del proceso de desarrollo es de vital importancia por tal razón la desinfección del área de trabajo se desinfecto con una solución de cloro-agua (Relación 1:5), es decir una parte de solución concentrada de cloro y cuatro partes de agua. Finalmente una posterior capa de desinfección con alcohol.

4.3.2.3. Control de Calidad: Esta parte de la obtención del extracto hidroalcohólico es imprescindible ya que de otra manera el rendimiento y la calidad se verán afectadas. En este punto se realiza una selección y clasificación, ya sean estos por pardeamiento (quemaduras por el sol), hojas picadas, tallos rotos o quebradizos, tamaño.

4.3.2.4. Pesado: Se obtuvo un peso tras todos los anteriores procedimientos de 2 kg (2000g) de orégano totales para el cumplimiento de extracción.

4.3.2.5. Lavado: El proceso de limpieza de la materia prima (Orégano) se realizó con la hoja de seguridad que presenta el cloro comercial para alimentos relación cloro-agua

(1:1001), es decir una parte de cloro y mil partes de agua (1ml de cloro en 1000 ml de agua).

4.3.2.6. Secado: El proceso de secado se realizó por un secador de bandejas presente en el laboratorio de operaciones unitarias de la Escuela de Ingeniería Industrial, usando un deshidratador de aire forzado (Convección), que combina un flujo constante de aire con una fuente externa de calor. La base de la cámara en la que se colocó las hojas de Orégano se cubre con una lámina de papel aluminio. Presentando un ventilador que impulsa el aire caliente a través del producto

4.3.2.7. Triturado: Al término del secado de las hojas de orégano se realizó un triturado manual hasta el punto homogéneo de hasta 3ml

4.3.2.8. Maceración: Se realizó el macerado del extracto Hidroalcohólico en un frasco de vidrio, envuelto en papel aluminio para su conservación, se mantuvo este macerado en un lugar seco y fresco, alejado de la luz, durante el periodo de 8 días agitándolo varias veces por día para una homogenización más eficaz.

4.3.2.9. Filtrado: Al término del proceso de maceración, las soluciones etanólicas se decantaron y filtraron cuidadosamente en el equipo bomba de vacío.

4.3.2.10. Concentración: Este procedimiento se realizó en una plancha calefactora. El filtrado se sometió al calor hasta un punto espeso (Estado semisólido)

Tabla 4: Diagrama de Operaciones del Extracto Hidroalcohólico del Orégano

Operación	Diagrama Operacional	Cantidad de Procesamiento (kg)	Tiempos (m)	Representación Porcetual en el producto final (%)
Recolección del <i>Origanum vulgare L.</i> (Oregano)			20	
Inspección y limpieza del área			20	
Control de Calidad, Selección y clasificación (Picados-Deteriorados)			30	100%
Pesado		2000	20	
Lavado (agua + cloro)			90	
Deshojado			120	
Secado (T= 30°C)			360	
Molienda		84	120	4,20%
Maceración				
Filtrado			15	
Concentración			20	
Eticado de diferenciación			5	
Almacenamiento				
	TOTAL	0	820	100%

Resumen					
Actividad	Operación	Operación Combinada	Inspección	Almacenamiento	Total
Símbolo					
Cantidad	9	2	0	2	13

Elaborado por: Espinoza J. (2018)

4.3.3. *Antibiograma*

4.3.3.1. Reactivación de las cepas

Se colocó 5 ml de solución fisiológica estéril en dos tubos de ensayo. Se tomó con un asa bacteriológica de siembra previamente esterilizada directamente una muestra de cepa estándar de *Escherichia coli*. y *Salmonella Sp.* cada una se suspende en un tubo respectivo hasta alcanzar una turbidez.

Posteriormente se realizó una siembra en medios de cultivos propios para este tipo de bacterias en placas Petri en total diez, cinco de ellas destinadas a *Escherichia coli*. con su medio de cultivo “MACCONKEY” la siembra se realizó por el método de zic zac a superficie. Realizando lo mismo para *Salmonella Sp.* con su medio de cultivo “SHIGELLA”.

4.3.3.2. Incubación

La incubación se la realiza; para *Escherichia coli*. con un tiempo de 24 h \pm 2 h a 32 °C \pm 1, y para *Salmonella Sp.* un tiempo de 48h \pm 2 h a 32 °C \pm 1.

4.3.3.3. Preparación por Pureza de “Extracto Hidroalcohólico” y “Aceite Esencial”: En 9 tubos de ensayo se preparó las diferentes purezas, 4 para aceite esencial (25%, 50%, 75% y 100%) con los suficientes discos esterilizados con anterioridad, 4 para Extracto Hidroalcohólico (25%, 50%, 75% y 100%) de igual manera con los suficientes discos esterilizados y por ultimo un tubo de ensayo de discos esterilizados empapados de nuestro blanco que es el suero fisiológico.

4.3.3.4. Inoculación: Se colocaron 5 ml de solución suero fisiológico estéril en un tubo de ensayo, con la ayuda de un asa de siembra bacteriológica las cepas estándar

obtenidas de la reactivación de las mismas, suspendiéndolas el tubo de ensayo conjuntamente con el suero fisiológico, hasta alcanzar un punto turbio.

4.3.3.5. Homogenización: Se extendió la solución en las placas Petri de medida 90x10 mm por triplicado.

Escherichia coli. Con cultivo de MacConkey de 24 horas a 32°C

Salmonella Sp. con cultivo de Shigella de 48 horas a 32 °C

4.3.3.6. Disposición (Blanco-Extracto Hidroalcohólico-Aceite esencial): Posteriormente se introdujo los 3 Discos de sensibilidad que tienen por medida 5 mm de diámetro y 0,02 mm de espesor, posición triangular (Blanco-Extracto Hidroalcohólico-Aceite esencial), en el medio de cultivo, los mismos que fueron sumergidos un día antes en las diferentes diluciones de Extracto Hidroalcohólico y Aceite esencial, cada uno con purezas (25%, 50%, 75% y 100%).

4.3.3.7. Incubación: Las diferentes placas fueron incubadas a 32 °C ± 1, con control a las 24 y 48 horas.

4.3.3.8. Medición: Se midió los halos con una regla de diámetros, escalas Duraffourd

- Para un diámetro inferior a 8 mm, se otorga la característica nula (-)
- Para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm, se lo define como sensibilidad imite (Sensible = +)
- Un diámetro entre 14 y 20 mm, se lo encasilla como medio (muy sensible =++)
- Finalmente para un diámetro superior a 20 mm el microorganismo es sumamente sensible (+++) (Aigaje, 2016)

4.3.3.9. Interpretación: Se interpretó el efecto bactericida de acuerdo a las medidas de los halos originados por el antibiótico en estudio (*Oiganum vulgare L.*) En las cepas de aisladas de estudio

4.3.3.10. Interpretación del efecto antibacteriano

Se realizó cuantitativa como también cualitativa, de manera cualitativa

5. RESULTADOS

5.1 Antibiograma

“**Antibiograma** es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos” (García, 2000).

En la tabla 5 se encuentran los valores medios obtenidos del análisis antibiograma ejecutado para cepas bacterianas *Escherichia coli* y *Salmonella*, con diferentes concentraciones de aceite esencial y extracto hidroalcohólico.

Tabla 5: Valores medios de la distancia del Halo de inhibición en *Escherichia coli*. y *Salmonella*.

Tratamiento	Concentración	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
		Media SEM	Media SEM
AET	25%	10,17±0,41 ^a	13,50±1,38 ^b
AET	50%	10,33±0,52 ^a	11,17±0,75 ^a
AET	75%	10,33±0,52 ^a	10,33±0,52 ^a
AET	100%	16,33±0,82 ^c	10,33±0,52 ^a
EHT	25%	10,17±0,41 ^a	12,50±2,59 ^b
EHT	50%	14,67±1,03 ^b	19,00±3,85 ^c
EHT	75%	18,50±2,66 ^d	29,50±1,38 ^d
EHT	100%	20,33±1,21 ^e	31,17±1,94 ^d

AET: Aceite esencial (Tipo)

EHT: Extracto Hidroalcohólico

SEM: Desviación Estándar.

^{a-e} Medias en la misma columna con su respectiva cepa bacteriana, con diferente superíndice, representan susvalores que difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Tukey (p <0,05).

Elaborado por: Espinoza J. (2018)

En la tabla 5. Valores medios de la distancia del halo inhibitorio, se muestra los valores medios de las medidas calibradas del anillo que forma tanto aceite esencial y extracto hidroalcohólico a diferentes concentraciones, caracterizadas en dos cepas bacterianas, tales como *Escherichia coli* y *Salmonella*

Se han identificado 5 grupos. Los resultados cuantitativos obtenidos dentro del antibiograma, muestran un resultado importante para la cepa *Escherichia coli*, a concentración de Extracto Hidroalcohólico del 100% o totalmente puro, con una media

calculada de 20,33 en la unidad de medida (mm), y con una importante media de 18,50 a concentraciones del 75% del Extracto Hidroalcohólico.

Tomando en cuenta que el método de inoculación realizado fue a superficie, con una disposición triangular antibiograma B-AET-EHT, para todas las concentraciones, logrando con esto una igualdad en condiciones para el trabajo.

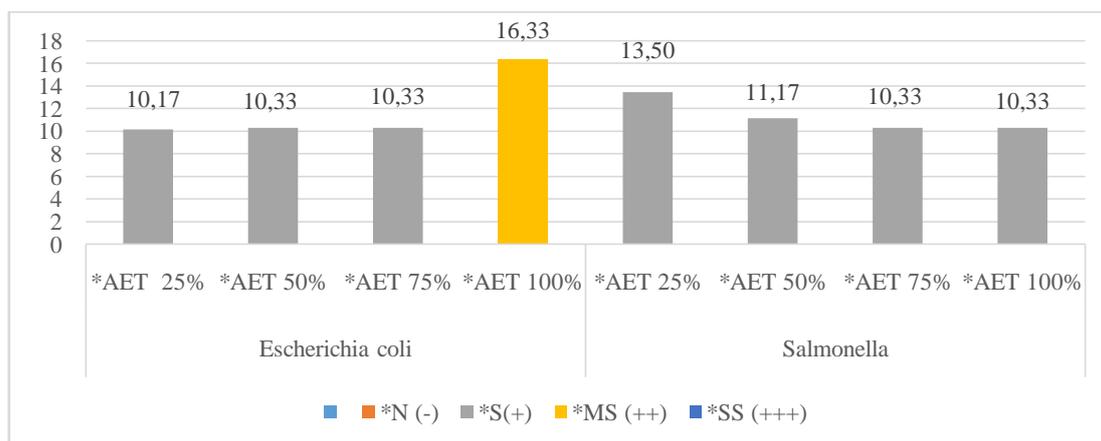
De igual manera para la cepa *Salmonella*, se obtiene que la concentración más efectiva es la de extracto hidroalcohólico del 100% o totalmente puro con una media calculada de 31,17 mm, media de anillo que supera con una diferencia muy significativa a *Escherichia coli*.

5.2. Diferenciación Escala Duraffourd

5.2.1. Escala Duraffourd del aceite esencial en *Escherichia coli* y *Salmonella*

La ilustración 7 presenta los valores medios del análisis antibiograma obtenido mediante análisis “*in vitro*”, técnica de siembra a superficie del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Tipo), utilizada para la presente investigación. Representación gráfica de barras que distingue por colores la clasificación en la escala Durafford del aceite esencial en sus diferentes concentraciones.

Ilustración 7: Media de halos más diferenciación Duraffourd



*N: Nula

*S: Sensible

*MS: Muy Sensible

*SS: Sumamente Sensible

*AET: Aceite esencial (Tipo)

Elaborado por Espinoza J. (2018)

Mejores resultados cuantitativos, se observó una efectividad mayor frente a la cepa de *Escherichia coli*. con el aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Tipo) al 100% o aceite puro con una media calculada del halo de 16,33mm encasillándose en un rango sensible (+) y muy sensible (++), seguido por las concentraciones bajas 25 % y 50% que presenta la cepa *Salmonella*, encasillando al aceite esencial frente a esta cepa como sensible (+).

5.2.1.1. Escala Duraffourd del aceite esencial por número de pruebas en *Escherichia coli* y *Salmonella*

Tabla 6: Efectividad antibacteriana en la escala Duraffourd de aceite esencial por número de pruebas *Escherichia coli*. vs *Salmonella Sp.*

<i>Escherichia coli</i>					TOTAL	<i>Salmonella Sp</i>				TOTAL
TRATAMIENTO	HALO DE INHIBICIÓN					HALO DE INHIBICIÓN				
	N (-)	S (+)	MS (++)	SS (+++)		N (-)	S (+)	MS (++)	SS (+++)	
AET 25%	0	6	0	0	6	0	6	0	0	6
AET 50%	0	6	0	0	6	0	6	0	0	6
AET 75%	0	6	0	0	6	0	6	0	0	6
AET 100%	0	0	6	0	6	0	6	0	0	6
Total	0	18	6	0	24	0	24	0	0	24

N: Nula

S: Sensible

MS: Muy Sensible

SS: Sumamente Sensible

AET: Aceite esencial (Tipo)

Elaborado por Espinoza J. (2018)

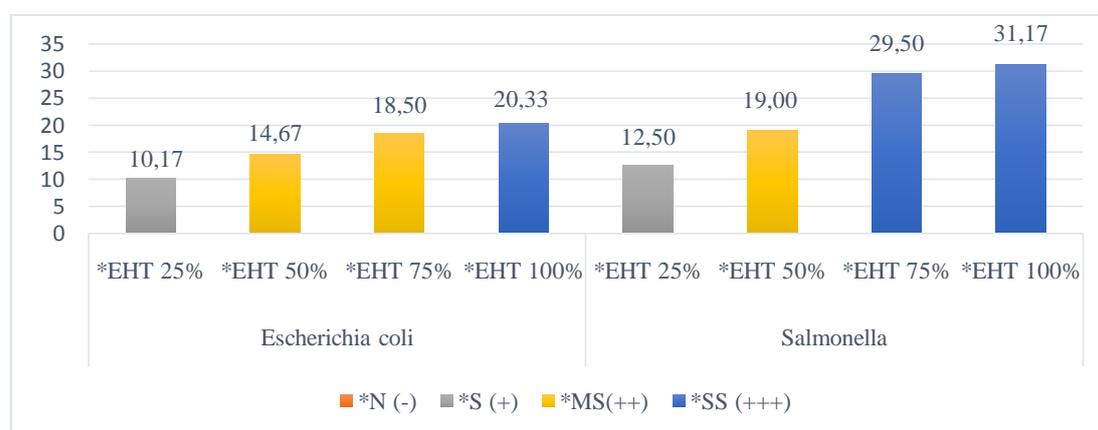
La tabla 7 de datos muestra la efectividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Tipo), generalizado por número de pruebas “*in vitro*” comparativo entre *Escherichia coli* vs *Salmonella*, en sus diferentes tratamientos, generalizando un cuadro denominado total para diferenciar y definir la efectividad por tratamiento, para definirlos dentro de una escala de sensibilidad.

Con una diferencia significativa del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* tipo al 100%, resaltando en la escala de efectividad Duraffourd como muy sensible, frente a la cepa *Escherichia coli*, pero sin lugar a duda por experimentación “*in vitro*” dictaminaremos al aceite esencial *Origanum vulgare L.* (Tipo) mediante las medias calculadas como sensible (+) en la Escala Duraffourd.

5.2.2. Escala Duraffourd del extracto hidroalcohólico en *Escherichia coli* y *Salmonella*

La ilustración 8 presenta los valores medios del análisis antibiograma obtenido mediante análisis “*in vitro*”, técnica de siembra a superficie del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* (Tipo), utilizada para la presente investigación. Representación gráfica de barras que distingue por colores la clasificación en la escala Duraffourd del extracto hidroalcohólico en sus diferentes concentraciones.

Ilustración 8: Media de halos más diferenciación Duraffourd (Extracto hidroalcohólico *Origanum vulgare L.*)



- *N: Nula
- *S: Sensible
- *MS: Muy Sensible
- *SS: Sumamente Sensible
- *EHT: Extracto Hidroalcohólico (Tipo)

Elaborado por Espinoza J. (2018)

Mejores resultados cuantitativos, se observó una efectividad mayor frente a la cepa de *Salmonella*. con el extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* (Tipo) al 100% o extracto puro y 75% encasillándose en un rango sensible (+), muy sensible (++) y sumamente sensible (+++) , seguido por las concentraciones alta del 100% de extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* (Tipo) al 100% o extracto puro que presenta la cepa *Escherichia coli*. Encasillando al Extracto Hidroalcohólico frente a *Escherichia coli*. como sensible (+), muy sensible (++) y sumamente sensible (+++).

5.2.2.1. Escala Duraffourd del extracto hidroalcohólico por número de pruebas en *Escherichia coli* y *Salmonella*

Tabla 7: Efectividad Antibacteriana Escala Duraffourd “Extracto Hidroalcohólico” *Escherichia coli*. vs *Salmonella Sp.*

TRATAMIENTO	<i>Escherichia coli</i>				TOTAL	<i>Salmonella Sp.</i>				TOTAL
	HALO DE INHIBICIÓN					HALO DE INHIBICIÓN				
	N (-)	S (+)	MS (++)	SS(+++)		N (-)	S (+)	MS (++)	SS (+++)	
EHT 25%	0	6	0	0	6	0	6	0	0	6
EHT 50%	0	0	6	0	6	0	0	6	0	6
EHT 75%	0	0	6	0	6	0	0	0	6	6
EHT 100%	0	0	0	6	6	0	0	0	6	6
TOTAL	0	6	12	6	24	0	6	6	12	24

N: Nula

S: Sensible

MS: Muy Sensible

SS: Sumamente Sensible

EHT: Extracto Hidroalcohólico (Tipo)

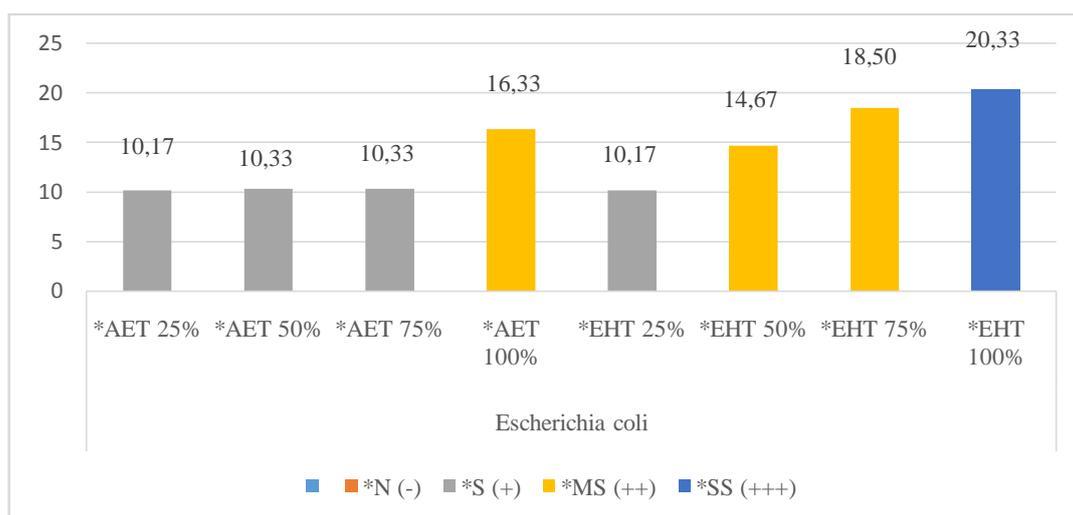
Elaborado por Espinoza J. (2018)

La tabla (8) de datos muestra la efectividad antibacteriana del Extracto Hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* (Tipo), comparativo entre *Escherichia coli* vs *Salmonella*, en sus diferentes concentraciones, encasillándose dentro de una escala sensible, muy sensible, con una diferencia significativa del extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* tipo al 100%, resaltando en la escala de efectividad Duraffourd como sumamente sensible frente a ambas cepas, logrando un rendimiento similar para el Extracto Hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* (Tipo) al 75% en *Salmonella*.

5.2.3. Escala Duraffourd del extracto hidroalcohólico y aceite esencial frente *Escherichia coli*.

La ilustración 9 presenta los valores medios del análisis antibiograma obtenido mediante análisis “*in vitro*”, técnica de siembra a superficie del extracto hidroalcohólico y aceite esencial a la par de *Origanum vulgare L.* (Tipo), utilizada para la presente investigación. Representación gráfica de barras que distingue por colores la clasificación en la escala Duraffourd del aceite esencial y el extracto hidroalcohólico en sus diferentes concentraciones frente a la cepa *Escherichia coli*.

Ilustración 9: Media de halos más diferenciación Duraffourd (Aceite esencial y Extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.*) cepa *Escherichia coli*.



- *N: Nula
- *S: Sensible
- *MS: Muy Sensible
- *SS: Sumamente Sensible
- *AET: Aceite esencial (Tipo)
- *EHT: Extracto Hidroalcohólico (Tipo)

Elaborado por Espinoza J. (2018)

Mejores resultados cualitativos, se observó una efectividad mayor frente a la cepa de *Escherichia coli*. con el extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* (Tipo) al 100% o extracto puro en la escala Duraffourd encasillándose en la división sumamente sensible (+++), desechando por completo, ya que presentando un rendimiento bajo al aceite esencial (Tipo) al 25, 50 y 75 % y al extracto hidroalcohólico (Tipo) al 25 %

5.2.3.1. Escala Duraffourd del aceite esencial y extracto hidroalcohólico por número de pruebas en *Escherichia coli*

Tabla 8: Efectividad Antibacteriana Escala Duraffourd por tipo de cepa (*Escherichia coli*.)

TRATAMIENTO	<i>Escherichia coli</i>				TOTAL
	HALO DE INHIBICIÓN				
	N (-)	S (+)	MS (++)	SS (+++)	
AET 25%	0	6	0	0	6
AET 50%	0	6	0	0	6
AET 75%	0	6	0	0	6
AET 100%	0	0	6	0	6
EHT25%	0	6	0	0	6
EHT 50%	0	0	6	0	6
EHT 75%	0	0	6	0	6
EHT 100%	0	0	0	6	6
TOTAL	0	24	18	6	48

N: Nula

S: Sensible

MS: Muy Sensible

SS: Sumamente Sensible

AET: Aceite Esencial (Tipo)

EHT: Extracto Hidroalcohólico (Tipo)

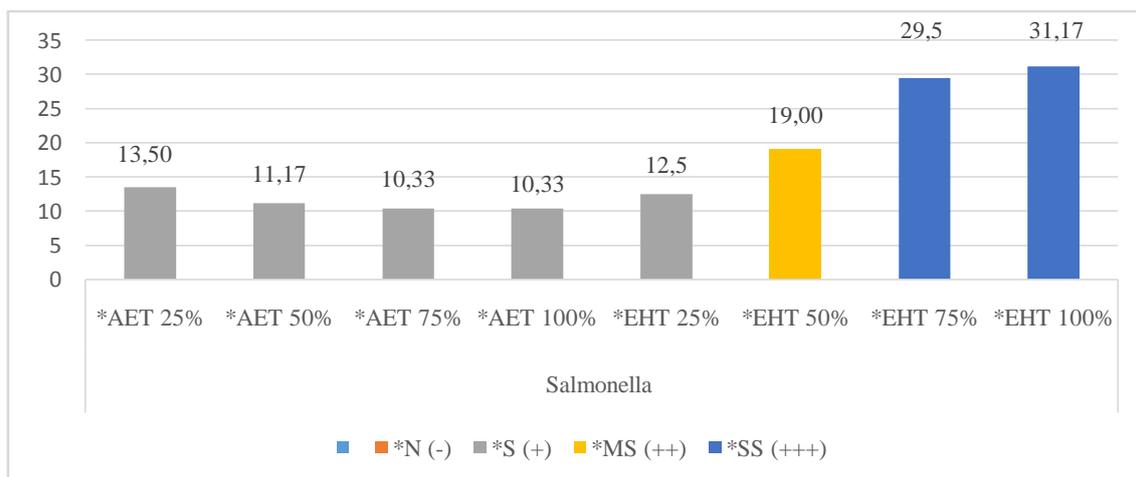
Elaborado por Espinoza J. (2018)

La tabla 9 de datos muestra la efectividad antibacteriana del Aceite esencial y Extracto Hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* (Tipo), comparativo con referencia a la cepa *Escherihia coli*, en las diferentes concentraciones, con una superioridad en datos generales encasillada dentro de la escala sensible (+), seguido de la escala muy sensible (++) y por último, pero con mayor significancia en el trabajo de investigación, para determinar el tratamiento de mayor eficacia, el extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* tipo al 100% presenta una diferencia significativa, resaltando en la escala de efectividad Duraffourd como sumamente sensible (+++) frente a la cepa en análisis.

5.2.4. Escala Duraffourd del extracto hidroalcohólico y aceite esencial frente *Salmonella*

La ilustración 10 presenta los valores medios del análisis antibiograma obtenido mediante análisis “*in vitro*”, técnica de siembra a superficie del extracto hidroalcohólico y aceite esencial a la par de *Origanum vulgare L.* (Tipo), utilizada para la presente investigación. Representación gráfica de barras que distingue por colores la clasificación en la escala Durafford del aceite esencial y el extracto hidroalcohólico en sus diferentes concentraciones frente a la cepa de *Salmonella*.

Ilustración 10: Media de halos más diferenciación Duraffourd (Aceite esencial y Extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.*) cepa *Salmonella*



- *N: Nula
- *S: Sensible
- *MS: Muy Sensible
- *SS: Sumamente Sensible
- *AET: Aceite esencial (Tipo)
- *EHT: Extracto Hidroalcohólico (Tipo)

Elaborado por Espinoza J. (2018)

Mejores resultados cuantitativos, se observó una efectividad mayor frente a la cepa de *Salmonella* con el extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* (Tipo) en dos concentraciones al 75% de pureza y al 100% o extracto puro en la escala Duraffourd encasillándose en la división sumamente sensible (+++), desechando por completo, ya que presentando un rendimiento bajo en los datos experimentales al aceite esencial (Tipo) en todas sus concentraciones y al extracto hidroalcohólico (Tipo) al 25 %

5.2.4.1. Escala Duraffourd del aceite esencial y extracto hidroalcohólico por número de pruebas en *Salmonella*.

Tabla 9: Efectividad Antibacteriana Escala Duraffourd por tipo de cepa (*Salmonella*)

TRATAMIENTO	<i>Salmonella</i>				TOTAL
	HALO DE INHIBICIÓN				
	N (-)	S (+)	MS (++)	SS (+++)	
AET 25%	0	6	0	0	6
AET 50%	0	6	0	0	6
AET 75%	0	6	0	0	6
AET 100%	0	6	0	0	6
EHT 25%	0	6	0	0	6
EHT 50%	0	0	6	0	6
EHT 75%	0	0	0	6	6
EHT 100%	0	0	0	6	6
TOTAL	0	30	6	12	48

N: Nula

S: Sensible

MS: Muy Sensible

SS: Sumamente Sensible

AET: Aceite Esencial (Tipo)

EHT: Extracto Hidroalcohólico (Tipo)

Elaborado por Espinoza J. (2018)

La tabla 10 de datos muestra la efectividad antibacteriana del Aceite esencial y Extracto Hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* (Tipo), comparativo con referencia a la cepa *Salmonella*, en las diferentes concentraciones, con una superioridad en datos generales encasillada dentro de la escala sensible (+), seguido de la escala sumamente sensible (+++), logrando para esta cepa una mayor significancia en el trabajo experimental de investigación, para el extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* tipo en dos concentraciones al 75% de pureza y 100% resaltados en la escala de efectividad Duraffourd como sumamente sensible (+++) frente a la cepa en análisis.

6. DISCUSIONES

(Bastos & Damé, 2011) publica sobre la evaluación de la actividad antimicrobiana que posee el aceite esencial de Orégano *Origanum vulgare L.* en un estudio anterior, determinan en su estudio experimental, una concentración bactericida mínima (CBM), eficaz para la Cepa de *Escherichia coli* en la concentración del 35%, encontrado a través de la técnica de difusión en agar un halo de inhibición de 29,5 mm, considerándose el halo de inhibición a partir de los 4 mm, lo que difiere un poco con nuestra investigación ya que se obtuvo una CBM eficaz para dicha cepa bactericida a la concentración del 25%, obteniendo una mayor eficacia con la concentración 100% o totalmente pura encasillándolo en la escala Duraffourd como muy sensible (++), considerando un halo de inhibición a partir de 10 mm.

Por su lado (Bañuelos & Delgadillo, 2010) en su investigación, obtiene resultados satisfactorios con un estudio único a una concentraciones puras o al 100%, tanto para el aceite esencia y extracto Hidroalcohólico, con halos de inhibición para la cepa de *Escherichia coli* medidos en mm iguales a 20,66 para el aceite y 10 para el extracto en sus medias correspondientes, calificando en la escala Duraffourd al aceite esencial como sumamente sensible (+++), lo que difiere con nuestra investigación que califica en dicha escala al aceite de las mismas cualidades como muy sensible (++), pero iniciando una CBM en 25%. Seguido un análisis de calificación del extracto en la escala Duraffourd como Sensible (+), deduciendo para esta concentración pura de extracto en nuestra investigación totalmente diferente con un halo de inhibición encontrado en una media de 20,33 calificada como sumamente sensible (+++) en escala, estableciendo una CBM desde 25% de pureza Sensible (+), realizando una escala importante para purezas del 50 y 75% ambas con una calificación muy sensible (++)

El extracto hidroalcohólico y aceite esencial de Orégano previamente obtenido en los laboratorios que presta la carrera de Ingeniería Agroindustrial para el desarrollo experimental y formación diaria a estudiantes fueron sujetos a pruebas para la presente investigación, mostrando resultados positivos de inhibición para las cepas bacterianas *Escherichia coli* y *Salmonella*, divididos en cuatro niveles de pureza en las diferentes técnicas de extracción, arrojando resultados para *Escherichia coli*. favorables para la inhibición de la misma, presentando una concentración bactericida mínima (CBM) del

25% de pureza encasillado en sensible (+), media de halo de inhibición igual a 10,16 mm, resaltando una sensibilidad mayor para el aceite esencial puro, logrando una calificación de muy sensible (++), media de halo de inhibición igual a 16,33 mm. Para la cepa bacteriana *Salmonella* la eficacia es menor obteniendo resultados calificados en la escala de Duraffourd como sensibles (+) para todos sus concentraciones datos cuantificados en mm que distingue valores de 10,33 a 13,5 Sensible (+). Pureza 25, 50, 75 y 100%, actuando como componente fenólico carvacrol que presenta un alto poder hidrofóbico, siendo capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Mientras que en el estudio de (Escalante & Dias, 2008) en su estudio determina que trabajando con un único nivel de pureza del 75% se obtiene un halo de inhibición promedio de 22,37 mm, infiriendo en nuestro estudio ya que nuestro halo promedio de investigación para este nivel de pureza fue de 10,33 mm, pero logrando determinar que el aceite esencial de Orégano en ambos estudios presente datos inhibitorios para esta cepa Gram negativa. (Lopez, 2018), en su estudio determina que el tratamiento más efectivo para la cepa *Escherichia coli* fue el de 60% con un diámetro de 17,62 mm determinado este estudio para la escala Duraffourd encasillada en muy sensible (++), concordando con este autor ya que el presente estudio realizado refleja que el aceite esencial de *Oreganum vulgare L.* en la escala Duraffourd se encasilla en Muy Sensible (++), pero infiriendo en el nivel de pureza ya que de mayor efectividad es en su estado puro 100% y un halo determinado en 16,33 mm. Concordando ambos estudios en cuanto a nivel de sensibilidad, con una inferencia en halos y purezas, debido a la diferencia de concentraciones de un autor y el otro.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1. CONCLUSIONES

- ✓ Se obtuvo un aceite esencial y extracto hidroalcohólico del Orégano (*Origanum vulgare L*) puros, a partir de materia vegetal 100% orgánico, permitiendo la división en sus diferentes purezas a partir del mismo.
- ✓ Frente a la evidencia reunida mediante experimentación en el laboratorio, se determina mejores resultados cuantitativos, frente a la cepa de *Escherichia coli* mayor efectividad. con el aceite esencial de *Origanum vulgare L*. (Tipo) al 100% o aceite puro con una media calculada del halo de 16,33mm encasillándose en un rango sensible (+) y muy sensible (++) , seguido por las concentraciones bajas 25 % y 50% que presenta la cepa *Salmonella*, encasillando al aceite esencial frente a esta cepa como sensible (+). Similar resultados cuantitativos, se observó frente a la cepa de *Salmonella*. con el extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L*. (Tipo) al 100% o extracto puro y 75% encasillándose en un rango sensible (+), muy sensible (++) y sumamente sensible (+++) , seguido por las concentraciones alta del 100% de extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L*. (Tipo) al 100% o extracto puro que presenta la cepa *Escherichia coli*. Encasillando al Extracto Hidroalcohólico frente a *Escherichia coli*. como sensible (+), muy sensible (++) y sumamente sensible (+++).
- ✓ De tal manera se compara una efectividad mayor frente a la cepa de *Escherichia coli*.. con el extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L*. (Tipo) al 100% o extracto puro en la escala Duraffourd encasillándose en la división sumamente sensible (+++), desechando por completo, ya que presentando un rendimiento bajo al aceite esencial (Tipo) al 25, 50 y 75 % y al extracto hidroalcohólico (Tipo) al 25 % . De igual forma, se observó una efectividad mayor frente a la cepa de *Salmonella* con el extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L*. (Tipo) en dos concentraciones al 75% de pureza y al 100% o extracto puro en la escala Duraffourd encasillándose en la división sumamente sensible (+++), desechando por completo, ya que presentando un rendimiento bajo en los datos experimentales al aceite esencial (Tipo) en todas sus concentraciones y al extracto hidroalcohólico (Tipo) al 25 %

- ✓ Como Consecuencia de lo expuesto se compara las dos técnicas de extracción y se establece el tratamiento de mayor efectividad frente a la cepa de *Escherichia coli.* con el extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* (Tipo) al 100% o extracto puro en la escala Duraffourd encasillándose en la división sumamente sensible (+++). Por otro lado se observó una efectividad mayor frente a la cepa de *Salmonella* con el extracto hidroalcohólico en dos concentraciones al 75% de pureza y al 100% o extracto puro en la escala Duraffourd encasillando estas dos concentraciones en la división sumamente sensible (+++)

7.2.RECOMENDACIONES

- ❖ Al trabajar con el aceite esencial y extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* es necesario que todas las plantas se encuentren en el mismo estado del ciclo de vida para certificar resultados confiables en los diferentes compuestos, de igual manera se recomienda no dejar pasar más de un día, evitar temperaturas que quemem la materia vegetal y tampoco humedecimientos de la misma después de la recolección para realizar las diferentes técnicas de extracción.
- ❖ Con el análisis empleado en el presente trabajo de investigación, de valores máximos y mínimos inhibitorios de extracto hidroalcohólico y aceite esencial (Tipo) *Origanum vulgare L.*, avanzar con el estudio para sintetizar los tratamientos de mayor relevancia presentados, para la conservación de servicio tipo alimentario.
- ❖ Comparar la efectividad antimicrobiana del aceite esencial y extracto hidroalcohólico de *Origanum vulgare L.* con otros extractos, aceites, bálsamos, resinas, infusiones, etc., de plantas de interés alimentaria de prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), evitando las enfermedades conocidas como enfermedades de la evolución.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

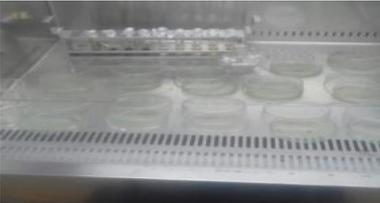
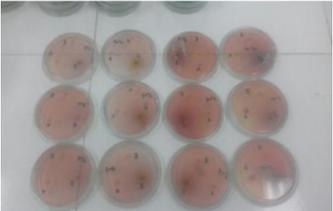
- (OMS), O. M. (2018). *Inocuidad de los alimentos*. Ginebra: OMS) Organizacion Mundial deSalud.
- (OPS), O. P. (2006). *Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA)*. Washington D.C.: (OPS), Organizacion Panamericana de la Salud.
- Aigaje, A. (1 de Febrero de 2016). "Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 % frente a *porphyromonas gingivalis* estudio in vitro". obtenido de "efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 % frente a *porphyromonas gingivalis* estudio in vitro".
- Arcila, C. C. (2012). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *SCIELO*, 2.
- Arsila, C. (2011). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Scielo*, 4.
- Badiola, I. (2015). La vacunación oral con cepas vivas de salmonella en aves . *IRTA Centro de Recerva en Sanita Animal* , 1.
- Bañuelos, R., & Delgadillo, L. (s.f.).
- Bastos , M., & Damé, L. (2011). Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. *SCIELO*, 5.
- CRESA. (1 de Enero de 2012). *Salmonelosis*. Obtenido de Salmonelosis.
- Cynithia, A., & Guadalupe, L. (2011). El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *SCIELO*, 3-4.
- Escalante, G., & Dias, F. (2008). Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. *CIMEL*, 45.

- FAO. (2015). Prevenion de la E. coli en los alimentos. *FAO*, 2.
- Gonzalez, A. (10 de Abril de 2014). *Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del amazonas* . obtenido de obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del amazonas : <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf>
- Healt, W. S. (13 de Febrero de 2015). *Washington Stake Depatment of Healt* .Obtenido de Washington Stake Depatment of Healt .
- Herna Ortiz, I. M. (12 de Febrero de 2013). *Investigación de staphylococcus aureus*. obtenido de investigación de staphylococcus aureus: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/4714/1/TESIS.pdf>
- Limachi, H. (1 de Enero de 2012). *Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna*. Obtenido de Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna: <http://repositorio.unjbg.edu.pe/bitstream/handle/UNJBG/532/TG0396.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Lopez, E. (1 de Enero de 2018). *Efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de orégano (origanum vulgare) sobre cepas certificadas de escherichia coli y staphylococcus aureus*. obtenido de efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de orégano (origanum vulgare) sobre cepas certificadas de escherichia coli y staphylococcus aureus.
- Morales, R. (21 de Abril de 2012). *Jardin Botanico*. Obtenido de Jardin Botanico : <http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/pubinv/RMV/225Or%C3%A9gano.pdf>
- Ortiz, D. (1 de Junio de 2016). *Efecto inhibidor del aceite esencial de clavo de olor* . Obtenido de Efecto inhibidor del aceite esencial de clavo de olor: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/7375/1/T-UCE-0015-380.pdf>
- Osorio, E. (2011). Leishmania: papel de la glicoproteína P en la mediación de la resistencia a los medicamentos y estrategias de inversión. *WorldWideScience.om*, 1.

- Paluo, e. (2014). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos . *Temas selectivos de Ingeniería de alimentos* , 4.
- Paola, S. (10 de Febrero de 2011). “Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*origanum vulgare l.*) y tomillo (*thymus vulgaris l.*) como potenciales bioconservadores en carne de pollo”. obtenido de “evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*origanum vulgare l.*) y tomillo (*thymus vulgaris l.*) como potenciales bioconservadores en carne de pollo”
- Pascal, L. (18 de Noviembre de 2015). *Efecto antifúngico del aceite esencial del origanum vulgare (orégano) y cymbopogon citratus (hierba luisa), sobre cepas de cándida albicans en comparación con la nistatina estudio invitro*”. obtenido de efecto antifúngico del aceite esencial del origanum vulgare (orégano) y cymbopogon citratus (hierba luisa), sobre cepas de cándida albicans en comparación con la nistatina estudio invitro”: Pereyra. (2011). *Manual de Laboratorio de Química Organica I*. Mexico: Universidad Autonoma Metropolitana .
- Prado, V. (2011). Salmonellosis, aspectos clinicos y epidemiológicos . *Scielo*, 264-265.
- Rumiche, O. (2012). Suplementación alimenticia con orégano (*Origanum vulgare*) y complejo enzimático en pollos de carne: I. Indicadores Productivos. *Scielo*, 2.
- SHEET, B. P. (2014). Infectious Disease Bureau. *Boston Public Health Commission*, 1.
- Solis, P. (15 de Marzo de 2011). “Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*origanum vulgare l.*) y tomillo (*thymus vulgaris l.*) como potenciales bioconservadores en carne de pollo”. Obtenido de “evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*origanum vulgare l.*) y tomillo (*thymus vulgaris l.*) como potenciales bioconservadores en carne de pollo”.

- Tellez, L. (2014). Determinación de timol y carvacrol de Orégano por HPLC FL. *Scielo*, 4.
- Tellez, L. (2014). Determinación de timol y carvacrol en hojas de Oregano por HPLC FL. *Scielo*, 4.
- Vacarcel, L. (30 de Junio de 2014). *Aplicación de métodos moleculares a la detección y tipificación de patógenos alimentarios en alimentos*. Obtenido de Aplicación de métodos moleculares a la detección y tipificación de patógenos alimentarios en alimentos.
- Varela, Z. (2015). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en colombia. *Scielo*, 3.
- Varela, Z. S. (2015). Bacterias causantes de enfermedades Bacterias causantes de enfermedades . *Scielo*, 2
- Xóchihua, M. (2013). Potencial del orégano como alternativa natural para controlar *Haemonchus contortus* en ovinos de pelo. *Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias del Instituto Tecnológico de Sonora*, 151.

9. ANEXOS

<p style="text-align: center;">Anexo 1</p>  <p>Ilustración 11: Oreo del orégano</p>	<p style="text-align: center;">Anexo 2</p>  <p>Ilustración 12 Separación de las hojas y los tallos de la planta de orégano</p>
<p style="text-align: center;">Anexo 3</p>  <p>Ilustración 13 Colocar las hojas de orégano en las bandejas del secador</p>	<p style="text-align: center;">Anexo 4</p>  <p>Ilustración 14 Autoclavado de material de trabajo</p>
<p style="text-align: center;">Anexo 5</p>  <p>Ilustración 15 Preparación por Pureza de “Extracto Hidroalcohólico” y “Aceite Esencial”</p>	<p style="text-align: center;">Anexo 6</p>  <p>Ilustración 16 Cabina de flujo laminar para trabajar en siembras de microorganismos</p>
<p style="text-align: center;">Anexo 7</p>  <p>Ilustración 17 Análisis microbiológico</p>	