

Efecto de las concentraciones del aceite esencial y del extracto hidroalcohólico de *Oreganum vulgare* "orégano" en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Effect of concentrations of essential oil and hydroalcoholic extract of Oreganum vulgare "oregano" on the growth of Staphylococcus aureus

SANDOVAL VERGARA, Ana Noemi¹; CONTRERAS JULIÁN, Rosa Mabel²

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de las concentraciones del extracto hidroalcohólico y el aceite esencial de *Oreganum vulgare* "orégano" en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, planteándose la hipótesis que el aceite esencial tiene efecto inhibitorio con respecto al extracto hidroalcohólico en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Se realizó una investigación aplicada con diseño experimental con post prueba únicamente, y número de repeticiones, utilizando como muestra biológica el orégano del cual se obtuvo: aceite esencial por hidrodestilación con concentraciones de 10, 20, 40 y 60 ug/ml y, extracto hidroalcohólico por maceración; se utilizaron concentraciones de 10, 20, 40 y 60mg/ml. La siembra del *Staphylococcus* se hizo en camada y para fijar las concentraciones se utilizó el método por difusión. Para el análisis de resultados, se utilizó el análisis de varianza y comparaciones múltiples con la prueba de Tukey para identificar si el promedio de las medias de los halos es diferente con respecto algún tratamiento; es así que, se acepta la hipótesis de investigación, encontrando que el aceite esencial tiene mayor efecto inhibitorio en las concentraciones de 40 y 60ug/ml con 3.5 y 3.8 cm de diámetro del halo con respecto al extracto hidroalcohólico a una concentración de 40mg/ml con 1.9 y 2 cm.

Palabras clave: aceite esencial, extracto hidroalcohólico, *Oreganum vulgare* y *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

The objective of this research work was to evaluate the effect of the concentrations of the hydroalcoholic extract and the essential oil of *Oreganum vulgare* "oregano" on the growth of *Staphylococcus aureus*. The hypothesis was that the essential oil has an inhibitory effect on the growth of *Staphylococcus aureus* with respect to the hydroalcoholic extract. An applied research was carried out with experimental design with post-test only, and number of repetitions, using as biological sample the *oregano* from which essential oil was obtained: by hydrodistillation with concentrations of 10, 20, 40 and 60 ug/ml, and also hydroalcoholic extract by maceration. Concentrations of 10, 20, 40 and 60mg/ml were used. The sowing of *Staphylococcus* was done in litter and the diffusion method was used to fix the concentrations. For the analysis of results, the variance analysis and multiple comparisons with the Tukey test was used to identify if the average of the halos is different with respect to any treatment. Therefore, the research hypothesis is accepted, finding that the essential oil has greater inhibitory effect in the concentrations of 40 and 60ug/ml with 3.5 and 3.8 cm in diameter of the halo with respect to the hydroalcoholic extract at a concentration of 40mg/ml with 1.9 and 2 cm.

Keywords: essential oil, hydroalcoholic extract, *Oreganum vulgare* and *Staphylococcus aureus*.

¹Docente de la escuela de Ingeniería Ambiental de la Universidad César Vallejo filial Tarapoto.

²Docente de la escuela de Administración de la Universidad César Vallejo filial Tarapoto.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos prehistóricos, el hombre ha utilizado plantas con fines medicinales, alimenticios y cosméticos, además de ser fuente de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica. El desarrollo de la farmacéutica se inicia con la identificación de principios activos de las plantas, bajo análisis biológicos, la formulación de la dosis, seguida por estudios clínicos para establecer la seguridad, eficacia y perfil farmacológico de las nuevas drogas.

En el Perú, como en otros países en vías de desarrollo, las plantas medicinales representan la principal herramienta terapéutica en medicina tradicional. La región San Martín es considerada una de las regiones con gran diversidad biológica con lo que respecta a flora, dentro de las especies más conocidas tenemos al *Oreganum vulgare* de la familia lamiáceas, es una planta aromática con diferentes propiedades medicinales, la misma que puede ser procesada por diferentes tipos de extracción para obtener metabolitos ya sea de aceite esencial, extracto hidroalcohólico o extracto acuoso. Estos métodos son de suma importancia, puesto que podrían utilizarse como alternativas de solución frente a enfermedades causadas por bacterias, considerando que hoy en día por diversos agentes externos las bacterias han ido evolucionando y con ello su resistencia frente a ciertos antibióticos dejando así a la población a un inherente estado crítico sobre su salud. El *Oreganum vulgare* es una de las especies que brinda una mayor cantidad de aceite esencial por la técnica arrastre por vapor de agua; sin embargo, un compuesto activo llamado fenoles es muy utilizado en tratamiento antimicótico y antibacteriano con la finalidad de mejorar las condiciones de salud¹. Además de contener fenoles en su composición química es rico en timol, ácidos fenolcarboxílicos, flavonoides, taninos, triterpenos entre otros².

Respecto al *Staphylococcus aureus* es una bacteria patógena con abundante distribución en la naturaleza, es capaz de elaborar un gran número de toxinas extracelulares y factores de virulencia que contribuyen a la patogenicidad, esta bacteria además de generar infecciones localizadas en la piel y mucosas puede invadir tejidos y órganos diversos originando procesos graves, siendo especialmente importante aquellas las colonias que son altamente resistentes a los fármacos³. Ante lo referido se planteó como objetivo general evaluar el efecto de las concentraciones del extracto hidroalcohólico y aceite esencial de *Oreganum vulgare* "orégano" en el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

A nivel internacional se realizaron trabajos de investigación como el de Bastos⁴, quien evaluó la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Oreganum vulgare*, donde comprobó su efecto antimicrobiano frente a bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, refiere que la concentración de inhibición mínima (CIM)

del aceite de orégano al 50 % inhibe el crecimiento de la cepa de *Staphylococcus aureus* evidenciándose en el diámetro del halo generado por el aceite esencial siendo este de 40.5mm.

Para Millones y Ponce⁵, que evaluaron la efectividad antibacteriana de productos naturales frente a microorganismos patógenos de la flora oral, el aceite esencial obtenido del *Oreganum vulgare* es significativamente más eficaz en *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Así mismo se determinó que el aceite esencial del orégano posee efecto antimicrobiano frente a bacterias grampositivas como el *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, considerando que los principios activos que poseen las plantas son eficaces para el tratamiento de enfermedades.

A nivel nacional, Sosa⁶ determinó el efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Oreganum vulgare* en concentraciones de 20mg/ml y 40 mg/ml, sobre el desarrollo de *Staphylococcus aureus* mediante el método de difusión en disco obteniéndose que la concentración de 40 mg/ml tuvo un promedio de diámetro de halo de 19,0 mm y 22,7mm lo que indica mayor inhibición a esta concentración. Colpa⁷ refiere que el efecto inhibitorio del *Oreganum vulgare* es mayor a medida que pasa el tiempo y su efecto inhibitorio fue aumentando conforme aumentaba su concentración, además cabe indicar que el efecto inhibitorio en diferentes concentraciones obtuvo resultados que señalan diferencias significativas al compararlo a las 24, 48 y 72 horas.

Para Sáez⁸, la extracción del aceite esencial a partir *Oreganum vulgare* se obtiene en grandes cantidades a diferencias de otras especies; esto es debido a las diferencias cuantitativas que se le pueden atribuir a los métodos de obtención, lugar, características químicas del suelo fecha y tiempo transcurrido entre la recolección y el proceso de obtención del aceite esencial.

Es importante recalcar que hoy en día la ciencia de la botánica ha ido creciendo con el paso de los años y ello le ha permitido al hombre buscar nuevas alternativas para el uso medicinal, que el empleo de extractos vegetales para el control de bacterias es una alternativa promisoriosa, debido a su elevada efectividad, bajo costo y no ser perjudicial al ambiente. Es sabido que un gran número de especies de plantas tienen actividades fisiológicas múltiples, puesto que actúan inhibiendo el crecimiento de microorganismos, estos hechos han generado gran inquietud en los investigadores elaborando nuevas técnicas o métodos de extracción de sustancias naturales con fines farmacológicos considerando que los antibióticos son muy comunes lo cual ha permitido que los microorganismos se hagan más resistentes al organismo. Es por ello que, las plantas de uso medicinal brindan nuevas alternativas para la búsqueda de la obtención de principios bioactivos que contribuyen a mitigar el control de enfermedades siendo una alternativa de uso de antiséptico⁹.

MATERIAL Y MÉTODOS

El tipo de estudio de la investigación fue aplicado con diseño experimental con post prueba únicamente y número de repeticiones, la determinación taxonómica para la muestra biológica de *Oreganum vulgare* se realizó en el Herbario Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo. El *Oreganum vulgare* fue sometido a dos tratamientos aceite esencial obtenido por el método de extracción por hidrodestilación para luego preparar concentraciones de 10, 20, 40 y 60ug/mL, y extracto hidroalcohólico por el método de maceración con 500g de orégano molido, vertido en un frasco color ámbar mezclado con alcohol al 96° guardado por una semana agitándolo esporádicamente; se obtuvo el producto final a través de evaporación en un rotavapor, la solución final se colocó en placa petri para llevar a secar en una estufa a 40°C por un lapso de 24 horas, culminado el proceso se realizaron las concentraciones de 10, 20, 40 y

60mg/mL. Con respecto a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 fue obtenida del laboratorio de bacteriología de la Universidad Nacional de Trujillo, el medio de cultivo utilizado fue agar Muller Hinton vertido en placas Petri de 15mm con 25 mL de medio de cultivo, para ambos tratamientos se aplicó el método de difusión o en pozo. La técnica de siembra fue en camada o superficial con el propósito de aplicar las concentraciones obtenidas. Para la preparación del inóculo se estandarizo en 5×10^8 unidades formadoras de colonia (UFC) equivalente al patrón de 0.5 en la escala de Mac Farland incubadas a 37°C para realizar las lecturas cada 24, 48 y 72 horas. Se consideró 10 repeticiones para cada concentración, siendo la unidad de análisis el diámetro del halo medido en cm para evaluar el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano.

RESULTADOS

Respecto a los resultados obtenidos a partir de la recolección de datos en laboratorio, se procedió aplicar un análisis de varianza para el aceite esencial y extracto hidroalcohólico con la finalidad de comparar las medias del diámetro del halo según sus concentraciones con respecto al número de horas de exposición del tratamiento

siendo estas 24, 48 y 42 horas; se identificó que existe diferencias significativas, por ello se aplicó el análisis de tukey con el propósito de identificar que tratamiento y concentración es la más efectiva para inhibir el crecimiento del *Staphylococcus aureus*.

Tabla 1. Análisis de varianza de las concentraciones del aceite esencial *Oreganum vulgare*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	22.71	3	7.57	106.6	0.000	2.86
Dentro de los grupos	2.55	36	0.07			
Total	25.26	39				

Tabla 2. Comparaciones múltiples entre las concentraciones de aceite esencial de *Oreganum vulgare* según el número de horas.

Concentraciones en ug/ml	24h			48h			72h			p valor
	n	\bar{x} (cm)	DS	n	\bar{x} (cm)	DS	n	\bar{x} (cm)	DS	
10 ug/ml	10	2.2	0.1	10	2.2	0.1	10	2.4	0.2	0.00
20 ug/ml	10	2.2	0.1	10	2.2	0.5	10	2.3	0.4	0.01
40 ug/ml	10	3.3	0.1	10	3.5	0.2	10	3.7	0.1	0.00
60 ug/ml	10	3.8	0.1	10	4.1	0.1	10	4.2	0.2	0.00

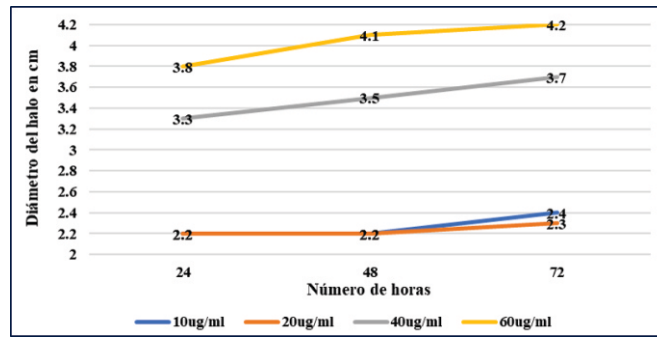


Figura 1: Media del diámetro del halo en cm a diferentes concentraciones y número de horas en aceite esencial.

Tabla 3. Análisis de varianza de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Oreganum vulgare*.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3.96	3	1.32	66.37	0.00	2.875
Dentro de los grupos	0.72	36	0.02			
Total	4.68	39				

Tabla 4. Comparaciones múltiples entre las concentraciones de extracto hidroalcohólico de *Oreganum vulgare* según el número de horas.

Concentraciones en mg/ml	24h			48h			72h			p valor
	n	\bar{x} (cm)	DS	n	\bar{x} (cm)	DS	n	\bar{x} (cm)	DS	
10 mg/ml	10	0.7	0.1	10	0.7	0.1	10	0.8	0.2	0.01
20 mg/ml	10	0.9	0.1	10	0.9	0.1	10	1.3	0.1	0.01
40 mg/ml	10	1.8	0.1	10	1.9	0.1	10	2	0.1	0.00
60 mg/ml	10	1.6	0.1	10	1.7	0.2	10	1.7	0.1	0.00

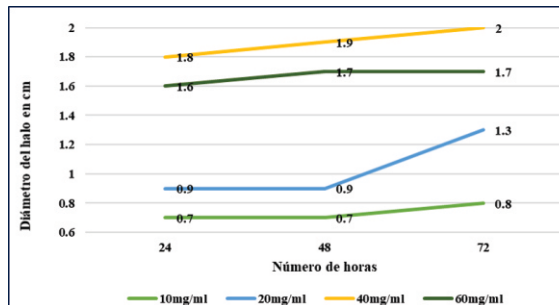


Figura 2: Media del diámetro del halo en cm a diferentes concentraciones y número de horas en extracto hidroalcohólico.

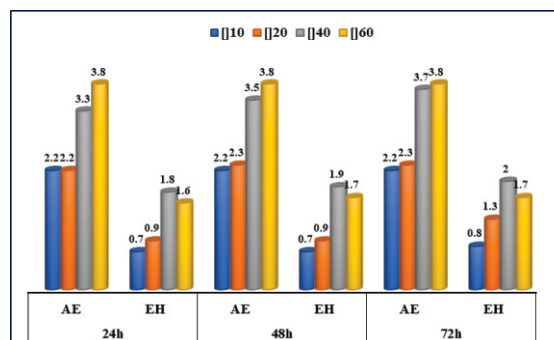


Figura 3: Comparación múltiple entre las concentraciones y número de horas en extracto hidroalcohólico y aceite esencial de *Oreganum vulgare*.

DISCUSIÓN

Las enfermedades de origen infeccioso originadas por bacterias y hongos patógenos representan un reto para la farmacología actual, evidenciándose en millones de muertes causadas a nivel mundial, esto debido al desarrollo vertiginoso de la resistencia bacteriana y la toxicidad de algunos medicamentos, por ello es favorable la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos a través del uso de productos naturales beneficiosos. No cabe duda que, en los últimos años, el *Staphylococcus aureus*, se han convertido en un microorganismo con patologías infecciosas más difíciles de combatir, con el paso del tiempo ha optado por nuevas vías de contagio, y nuevas formas de defensa ante los antibióticos que comúnmente usamos¹⁰

La resistencia bacteriana es un problema que surge a partir de la adaptación de la bacteria al antibiótico, tras una mutación genética que la convierte en un enemigo cada vez más fuerte de combatir, a partir de este tema se ha suscitado un sinnúmero de investigaciones que justamente involucran la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para hacerles frente a microorganismos como *Staphylococcus aureus* y en este contexto, se espera que este aporte científico contribuya con dicha finalidad¹¹

En la presente investigación se evaluó el efecto de las concentraciones del extracto hidroalcohólico y aceite esencial de *Oreganum vulgare* "orégano" en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). En la tabla 1, se presenta el análisis de varianza para comparar las medias del diámetro del halo de las concentraciones y el número de horas, es así que se obtuvo un p valor de 0.00 menor al nivel de significancia de 0.005, lo que indica que al menos en un tratamiento el promedio de las medias es diferente.

Frente a los datos obtenidos se procedió a realizar comparaciones múltiples a través de la prueba de Tukey para identificar diferencias significativas entre los grupos así se demuestra la tabla 2, puesto que se utilizaron concentraciones de 10ug/mL, 20ug/mL, 40ug/mL y 60ug/mL a todos se hizo lectura del diámetro del halo a las 24, 48 y 72 horas respectivamente; observando que todos los grupos experimentales difieren en sus medias ya sea por concentración u hora de toma de medida del halo en cm. Para mayor visualización se muestra la figura 1, el diámetro del halo se incrementa con respecto a la concentración y el número de horas de exposición del tratamiento es decir a mayor concentración mayor efecto inhibitorio del crecimiento de la bacteria hallándose susceptible a 40ug/mL y 60ug/mL esta última con mayor efecto antimicrobiano. Según algunas investigación refieren que los aceites esenciales presentan mayor capacidad inhibitoria, puesto que se ha encontrado componentes como fenoles, carvacrol, timol, terpeno y p-cimeno que pueden

alcanzar entre 80,2 y 98 % de la composición del aceite los mismos que tienen la capacidad de penetrar las membranas celulares, romper polisacáridos, ácidos grasos y lípidos, permeabilizando la membrana celular, la cual conduce a la pérdida de iones, al colapso de la bomba de protones y a la disminución del ATP llevando a la muerte celular, también se ha encontrado que a nivel citoplasmático puede actuar sobre lípidos y proteínas coagulando dichas moléculas; sin embargo, cabe indicar que la reacción antimicrobiana del aceite esencial no solo depende de uno de sus componente sino que trabaja de forma conjunta para proporcionar mayor eficacia para la destrucción bacteriana¹².

Tajkarimi et al¹³, mencionan que las bacterias gram-negativas son generalmente menos susceptibles a los aceites esenciales debido a los lipopolisacáridos presentes en su membrana externa, lo que restringe la difusión de compuestos hidrófobos.

Resultados similares se encontró en el trabajo desarrollado por Colpa⁷ haciendo énfasis que el aceite esencial de *Oreganum vulgare* presenta efecto inhibitorio a mayor concentración, mayor diferencia significativa al compararlo a las 24, 48 y 72 horas.

Con respecto al tratamiento de extracto hidroalcohólico, en la Tabla 3 se evidencia el análisis de varianza, donde se identifica que el p valor es menor al nivel de significancia de 0.00 resumiendo que, en al menos un grupo experimental es diferente con respecto al promedio de sus medias; por lo tanto se realizó las comparaciones múltiples a través de la prueba de tukey con el propósito de visualizar que grupo experimental es más efectivo con respecto al efecto antibacteriano con las cepas de *Staphylococcus aureus*, es así que se utilizaron cuatro tratamientos 10 mg/mL, 20mg/mL, 40mg/mL y 60mg/mL los mismos que fueron sometidos a 24, 48 y 72 horas para la toma de medida del halo para considerar un punto de referencia.

En la tabla 4 se observa que la concentración de 40mg/mL el diámetro del halo aumenta conforme transcurre el tiempo, sin embargo, a mayor concentración y tiempo expuesto se mantiene constante el promedio de las medias del halo. Por ello en la figura 2 se muestra que las concentraciones de 10 y 20mg/mL no tienen actividad antimicrobiana puesto que sus medias se encuentran entre 0.7 y 1.3 cm respectivamente analizando que la bacteria posee una reacción resistente. Sosa⁶ tuvo resultados similares concluyendo que el extracto hidroalcohólico de *Oreganum vulgare* a una concentración 40 mg/mL, tiene un promedio 19 y 27mm de diámetro de halo lo que indica inhibición frente al crecimiento bacteriano.

La resistencia a los fármacos se ha convertido en un problema de salud pública, ante lo cual, los extractos vegetales con acción antibacteriana pueden ser capaces de evitar los mecanismos de

resistencia actuales, además de representar una importante alternativa para el uso clínico en el tratamiento de enfermedades infecciosas, la utilización de extractos vegetales a nivel hospitalario es restringido, las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra, entonces es posible que los extractos vegetales puedan inhibir el crecimiento de cepas resistentes y multi resistentes¹⁴.

Finalmente, de acuerdo a los datos presentados en la figura 3, se concluye y se acepta la hipótesis

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bandoni, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Edit. Universidad Nacional La Plata. Buenos Aires Argentina; 2014.
2. Fonnegra y et al. Plantas medicinales aprobadas en Colombia, Editorial Universidad de Antioquía, (2da ed.). Colombia; 201. p. 193-195.
3. Hisham y et al. Resistencia antibiótica: enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Revista Science Direct 19(3): 19. 2017
4. Bastos, M. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Oreganum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. (Artículo científico). Universidad de la Habana Cuba; 2014. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000300006
5. Millones y et al. Efectividad antibacteriana de productos naturales frente a microorganismos patógenos de la flora oral. (Artículo científico). Universidad de Barcelona-España; 2015. Disponible en: <http://revistas.uladech.edu.pe/index.php/increscendosalud/article/view/946>
6. Sosa, J. Efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) y del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*. (Tesis de pregrado). Universidad Señor de Sipán. Chiclayo-Perú; 2015. Disponible en: http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/USSS_650bd5333b87f13e0c181d033cc13a1c
7. Colpa, M. Efecto inhibitorio del aceite esencial de *Oreganum vulgare* (orégano) y *Mentha piperita* (menta) frente a cepas de *Cándida albicans*. Estudio in vitro. (Tesis de pregrado). Universidad Privada Norbert Wiener. Lima-Perú; 2016. Disponible en: <http://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/123456789/580>
8. Sáez, G. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). (Tesis de especialidad). Universidad Nacional de Trujillo-Perú; 2016. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018130X2001000100004&script=sci_arttext
9. Fuentes y et al. Estudios fenológicos con plantas medicinales. Revista cubana de plantas medicinales 2013; 5 (3): 106-13.
10. Etiopatogenia microbiológica. Género *Staphylococcus*. 2012. Temas de bacteriología y virología médica. Sesión III. Pág. 257. Disponible en: <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2012/staphylococcus.pdf>
11. Cervantes et al. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana Patol Clin Medic Lab; 61(1): 28-40. Disponible en: www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf
12. Ryan y et al. Enterobacterias microbiología Médica. 5ª ed. Santa Fe: McGraw-Hill Interamericana; 2011. pp. 441-64.
13. Tajkarimi, et al. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control, 2010: 21(9), 1199-1218.
14. Murray y et al. Enterobacteriaceae microbiología médica. 7ª ed. Barcelona: Elsevier; 2013. pp. 258-72