



**Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud  
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

**TESIS:**

**“Efecto sinérgico del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo) y *Origanum vulgare* (orégano) sobre la actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**Químico Farmacéutico**

**BACHILLER: Flores Ale, Analí Daibby**

**ASESOR: Msc. Mallqui Brito, Vania**

**LIMA-PERÚ**

**2018**

## **DEDICATORIA**

*A ti Dios mío que siempre has estado a mi lado, gracias por darme las fuerzas para seguir con mis proyectos y permitir culminar esta etapa académica, creo en ti y sé que nada me faltará.*

*A mi querida Madre Irma Angelita Ale Yañez que desde el cielo has intercedido por mí, has hecho que yo sienta tu presencia y estoy orgullosa de ser tu hija.*

*A mi Padre Edin Flores por su apoyo incondicional, eres mi modelo de inspiración.*

*A mis queridas Hermanas Zulmi y Jilian, por su apoyo incondicional.*

*A mis queridas Tías Cecilia y Mery que me han apoyado en cada paso de mi carrera, son mi fuerza y mi valentía.*

*AnaÍ Daibby Flores Ale*

## *AGRADECIMIENTOS*

*A ti Dios mío por haber permitido finalizar esta etapa de mi vida y culminar este trabajo de investigación.*

*A mi asesora, Msc. Vania Mallqui Brito y Mg. Karen Quiroz Cornejo, por su apoyo incondicional, por su tiempo, conocimientos, para poder realizar este trabajo de investigación.*

*Al Ing. Pedro José Romero y Otiniano docente de la facultad de ingeniería química de la Universidad Mayor de San Marcos, por su apoyo y orientación en los procedimientos experimentales del presente trabajo de investigación.*

*Al Blgo. Neil Azabache V. del Laboratorio Microbiológico Bioen Lab SAC. Por brindarme sus conocimientos y facilitar el ambiente para desarrollar el trabajo de investigación.*

*Anali Daibby Flores Ale*

## INDICE

<b>DEDICATORIA</b>	<b>I</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>II</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>III</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>VII</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XIII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>XIV</b>

### **CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

1.1. Descripción de la realidad problemática .....	1
1.2. Problemas de investigación .....	2
1.2.1. Problema general .....	2
1.2.2. Problemas específicos .....	2
1.3. Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos .....	3
1.4. Justificación, importancia y limitaciones de la investigación.....	3
1.4.1. Justificación de la investigación .....	3
1.4.2. Importancia de la investigación.....	4
1.4.3. Limitaciones de la investigación.....	5

### **CAPITULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN**

2.1. Hipótesis de la investigación .....	6
2.1.1. Hipótesis general .....	6
2.1.2. Hipótesis específicas .....	6
2.2. Variables de la investigación.....	7

2.2.1. Identificación y clasificación de variables .....	7
2.2.2. Operacionalización de variables .....	7

### **CAPÍTULO III: MARCO TEÓRICO**

3.1. Antecedentes de la investigación .....	8
3.1.1. A nivel nacional.....	8
3.1.2. A nivel internacional.....	10
3.2. Bases teóricas .....	12
3.2.1. Aceite esencial.....	12
3.2.1.1. Composición química .....	13
3.2.1.2. Clasificación de los aceites esenciales.....	14
a. Consistencia.....	14
b. Origen.....	14
c. Químico .....	15
3.2.1.3. Propiedades físicas .....	15
3.2.1.4. Métodos de extracción de los aceites esenciales .....	15
a. Destilación por arrastre a vapor .....	16
b. Extracción por solventes.....	17
3.2.1.5. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales .....	18
3.2.1.6. Mecanismo de acción de los aceites esenciales.....	18
3.2.1.7. Actividad sinérgica .....	19
a. Mecanismos de sinergia .....	20
3.2.1.8. Usos de los aceites esenciales.....	20
3.2.2. Plantas medicinales .....	21
3.2.2.1. Composición química .....	21
3.2.3. <i>Thymus vulgaris</i> “Tomillo” .....	22
3.2.3.1. Taxonomía .....	23
3.2.3.2. Hábitat.....	23
3.2.3.3. Descripción botánica .....	23
3.2.3.4. Composición química .....	25
3.2.3.5. Farmacología .....	26
3.2.4. <i>Origanum vulgare</i> “Orégano” .....	28
3.2.4.1. Taxonomía .....	28

3.2.4.2. Hábitat.....	28
3.2.4.3. Descripción botánica .....	29
3.2.4.4. Composición química .....	30
3.2.4.5. Farmacología .....	31
3.2.5. Principios activos relevantes del tomillo y orégano .....	32
3.2.5.1. Timol.....	33
3.2.5.2. Carvacrol .....	34
3.2.6. Bacterias.....	36
3.2.7. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	36
3.2.7.1. Características generales.....	36
3.2.7.2. Patogenicidad .....	37
3.2.7.3. Factores de virulencia .....	38
3.2.8. <i>Salmonella enteritidis</i> .....	38
3.2.8.1. Características generales.....	39
3.2.8.2. Patogenicidad .....	39
3.2.8.3. Factores de virulencia .....	40
3.2.9. Métodos de determinación de actividad antibacteriana.....	40
3.2.10. Enfermedades de transmisión por alimentos .....	42
3.2.10.1. Clasificación de las enfermedades transmitidas por alimentos .....	43
3.3. Definición de términos básicos.....	43

#### **CAPITULO IV: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

4.1. Tipo y nivel de investigación .....	45
4.1.1. Tipo de investigación.....	45
4.1.2. Nivel de investigación .....	46
4.2. Método y diseño de la investigación.....	46
4.2.1. Método de la investigación .....	46
4.2.2. Diseño de la investigación.....	46
4.3. Población y Muestra de la investigación .....	47
4.3.1. Población.....	47
4.3.2. Muestra.....	48
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	48
4.4.1. Técnicas .....	48

4.4.2. Instrumentos .....	48
4.5. Procedimiento de recolección de datos.....	49
4.5.1. Recolección de recursos vegetales .....	49
4.5.2. Determinación botánica del recurso vegetal.....	49
4.5.3. Características de recursos vegetales.....	49
4.5.4. Extracción de los aceites esenciales .....	50
4.5.5. Análisis microbiológico .....	52
4.5.6. Procesamiento y análisis de datos .....	55

## **CAPÍTULO V: PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE**

### **RESULTADOS**

5.1. Análisis de tablas y gráficos.....	56
5.2. Discusión de los resultados .....	61

<b>CONCLUSIONES</b> .....	64
---------------------------	----

<b>RECOMENDACIONES</b> .....	65
------------------------------	----

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66
-----------------------------------------	----

<b>ANEXOS</b> .....	77
---------------------	----

## ABREVIATURAS

- **ETAs:** Enfermedades transmitidas por alimentos.
- **V/P:** Porcentaje peso volumen.
- **°C:** Grados centígrados.
- **mm:** milímetros.
- **mg:** miligramos.
- **mL:** mililitros.
- **cm:** centímetros.
- **msnm:** metros sobre el nivel del mar.
- **Kg:** kilogramo.
- **u:** micras.
- **pH:** coeficiente indica grado de acidez o basicidad.
- **PrfA:** factor regulador positivo A *Listeria monocytogenes*.
- **Act A:** proteína antigénica de *Listeria monocytogenes*.
- **SPI-1:** isla de patogenicidad (gen codificador).
- **Sip E:** proteína efectora (rearreglos de citoesqueleto) de SPI-1.
- **Sop E:** proteína efectora (rearreglos de citoesqueleto) de SPI-1.
- **Sop E2:** proteína efectora (rearreglos de citoesqueleto) de SPI-1.
- **Sop B3:** proteína efectora (rearreglos de citoesqueleto) de SPI-1.
- **Ag K o Vi:** antígenos de superficie de *salmonella*.
- **Ag O:** antígeno somático de *salmonella*.
- **Ag H:** antígeno flagelar de *salmonella*.
- **Na SO<sub>4</sub>:** sulfato de sodio anhidro.
- **ATCC:** American Type Culture Collection.
- **WPI:** Proteína aislada de suero lácteo.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **UFC:** Unidades Formadoras de Colonias.
- **AE:** Aceites esenciales.
- **SPSS:** Statistical Package for the Social Sciences.  
(Paquete Estadístico para Ciencias Sociales).
- **ANOVA:** Análisis of Variance (Análisis de Varianza).

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA N°1:</b> Evaluación microbiológica de concentraciones del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” frente a microorganismos patógenos .....	57
<b>TABLA N°2:</b> Evaluación microbiológica de concentraciones del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> “orégano” frente a microorganismos patógenos .....	58
<b>TABLA N°3:</b> Sinergismo antibacteriano de los aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” y <i>Origanum vulgare</i> “orégano” frente a microorganismos patógenos .....	59
<b>TABLA N°4:</b> Comparación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” y <i>Origanum vulgare</i> “orégano” frente a microorganismos patógenos.....	60

## INDICE DE CUADROS

<b>CUADRO N°1:</b> Operacionalización de variables .....	7
<b>CUADRO N°2:</b> Composición química de los aceites esenciales .....	13
<b>CUADRO N°3:</b> Métodos de extracción de aceites esenciales .....	16
<b>CUADRO N°4:</b> Composición química de recursos vegetales .....	22
<b>CUADRO N°5:</b> Composición química de <i>Thymus vulgaris</i> .....	26
<b>CUADRO N°6:</b> Composición química de <i>Origanum vulgare</i> .....	31
<b>CUADRO N°7:</b> Diseño de la investigación .....	47
<b>CUADRO N° 8:</b> Rendimiento del aceite esencial de tomillo y orégano .....	52

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA N°1:</b> Diagrama de destilación por arrastre de vapor .....	17
<b>FIGURA N°2:</b> <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” .....	25
<b>FIGURA N°3:</b> <i>Origanum vulgare</i> “orégano” .....	30
<b>FIGURA N°4:</b> Estructura de timol y carvacrol según su origen .....	33
<b>FIGURA N°5:</b> Estructura química de timol.....	33
<b>FIGURA N°6:</b> Estructura química de carvacrol.....	35

## ÍNDICE DE GRAFICOS

<b>GRAFICO N°1:</b> Efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” sobre el crecimiento bacteriano de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> .....	97
<b>GRAFICO N°2:</b> Efecto antibacteriano del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> “orégano” sobre el crecimiento bacteriano de <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> .....	98
<b>GRAFICO N°3:</b> Efecto sinérgico antibacteriano del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” y <i>Origanum vulgare</i> “orégano” sobre microorganismos patógenos .....	99
<b>GRAFICO N°4:</b> Comparación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” y <i>Origanum vulgare</i> “orégano” frente a microorganismos patógenos .....	100

## RESUMEN

La medicina natural se basa en el estudio de plantas medicinales como *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* dotados de principios activos que presentan actividad contra microorganismos patógenos. **Objetivo:** Determinar el efecto sinérgico antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” sobre el crecimiento bacteriano de cepas ATCC de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. **Material y método:** Estudio analítico, transversal y prospectivo. Se extrajo los aceites esenciales por el método de destilación por arrastre a vapor de agua, utilizando 4 Kg de cada recurso vegetal. La actividad antibacteriana de cada uno de los aceites esenciales se determinó mediante el método de Kirby Bauer y colaboradores, utilizando discos de papel filtro impregnados con 5 uL de cada aceite esencial para el sinergismo y 10 uL para la actividad individual a las concentraciones del 100% y 50% sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* cultivados en Agar Plate Count, los diámetros de los halos de inhibición se midieron a las 24 horas, incubación a 35°C+/-1. **Resultados:** Para el análisis de los datos se aplicó el análisis de varianza ANOVA, en donde el aceite esencial de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* - a una concentración del 100% - presentaron halos de inhibición de 39.9 mm sobre *Listeria monocytogenes* y 40 mm sobre *Salmonella enteritidis*; así mismo a una concentración del 50% se evidencio halos de inhibición de 38 mm sobre *Listeria monocytogenes* y 29.7 mm sobre *Salmonella enteritidis*. La actividad sinérgica de ambos aceites esenciales a la proporción de 1:1 presentó diámetros de 40 mm sobre *Listeria monocytogenes* y diámetros de 30 mm sobre *Salmonella enteritidis*. **Conclusión:** La actividad antibacteriana individual de cada aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” es igual a la actividad sinérgica, se concluye que no existe efecto sinérgico sobre *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.

**Palabras clave:** Efecto sinérgico, Aceites esenciales, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*

## ABSTRACT

Natural medicine is based on the study of medicinal plants such as *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* endowed with active principles that show activity against pathogenic microorganisms. **Objective:** To determine the synergistic antibacterial effect of the essential oil of *Thymus vulgaris* "thyme" and *Origanum vulgare* "oregano" on the bacterial growth of ATCC strains of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. **Material and method:** Analytical, transversal and prospective study. The essential oils were extracted by the steam distillation method, using 4 Kg of each vegetable resource. The antibacterial activity of each of the essential oils was determined by the method of Kirby Bauer et al., using filter paper discs impregnated with 5 uL of each essential oil in the synergism and 10 uL for their individual activity at 100% concentrations. and 50% on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* grown on Agar Plate Count, the diameters of the inhibition halos were measured at 24 hours, incubation at 35 ° C +/- 1. **Results:** ANOVA analysis of variance was applied for the analysis of the data, in which the essential oil of *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* - at a concentration of 100% - presented halos of inhibition of 39.9 mm on *Listeria monocytogenes* and 40 mm on *Salmonella enteritidis*; Likewise, at a concentration of 50%, there were evidence of inhibition of 38 mm on *Listeria monocytogenes* and 29.7 mm on *Salmonella enteritidis*. The synergistic activity of both essential oils at the 1: 1 ratio had diameters of 40 mm on *Listeria monocytogenes* and diameters of 30 mm on *Salmonella enteritidis*. **Conclusion:** The individual antibacterial activity of each essential oil of *Thymus vulgaris* "thyme" and *Origanum vulgare* "oregano" is equal to the synergistic activity, it is concluded that there is no synergistic effect on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*.

**Key words:** Synergistic effect, Essential oils, *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*.

## INTRODUCCIÓN

La medicina natural se basa en el estudio de plantas dotadas de principios activos, contienen sustancias fitoquímicas que ejercen una acción terapéutica sobre el organismo vivo. Se ha demostrado que la presencia de diversos metabolitos presentes en los recursos vegetales les proporcionan propiedades como antibacterianas, antifúngicas e insecticidas. Los aceites esenciales son productos de composición compleja, contienen diversos compuestos, como; timol, carvacrol y *p*-cimeno, que presentan actividad contra microorganismos. Los recursos vegetales que presentan este tipo de principios activos son el *Thymus vulgaris* “tomillo”, una de las especies vegetales más estudiadas desde la antigüedad y *Origanum vulgare* “orégano” que de acuerdo a la clasificación taxonómica pertenecen a la misma familia, ambas presentan un elevado contenido de principios activos, dando la posibilidad de tener efecto antibacteriano en determinados microorganismos patógenos.

Nuevos mecanismos de resistencia bacteriana están emergiendo y extendiéndose globalmente, amenazando la capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes como las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs), producidas por microorganismos patógenos tales como; *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, por lo que se requiere de la síntesis de nuevos principios activos, es por ello el interés por demostrar científicamente que los recursos naturales con actividad farmacológica pueden incrementar o disminuir su efecto antibacteriano al asociar principios activos de diferentes plantas medicinales, siendo el objetivo principal del presente estudio; el determinar el efecto sinérgico antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* "tomillo" y *Origanum vulgare* “orégano” frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.

# CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

Según la Organización Mundial de la Salud el incremento de casos por Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) han aumentado por la ingesta de alimentos contaminados por algunos microorganismos patógenos tales como: *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. A mediados del siglo XX se consideró a *Listeria monocytogenes* un microorganismo patógeno que está presente en alimentos contaminados, tiene habilidad de multiplicarse en la leche y vegetales almacenados en refrigeración, siendo la principal vía de infección de listeriosis humana<sup>1</sup>. *Salmonella enteritidis* es considerada también un microorganismo de importancia, siendo el causante más frecuente de la salmonelosis que constituyen la primera causa de infecciones transmitidas por los alimentos, en Trujillo determinaron que *Salmonella enteritidis* sobrevive por más tiempo en el agua potable<sup>2</sup>.

Recientes investigaciones han mostrado que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” presentan componentes fitoquímicos, polifenoles, antioxidantes como el timol, carvacrol, *p*-cimeno, terpineol, etc, cuya actividad

antibacteriana ha sido demostrada sobre diferentes microorganismos patógenos<sup>3</sup>. Estudios realizados evidencian que la presencia de sustancias activas con propiedades farmacológicas, podrían ejercer una acción sinérgica de inhibición, siendo importante demostrar este efecto el cual sería mediante un mecanismo de potenciación, considerando que *T. vulgaris* y *O. vulgare* son recursos vegetales de igual familia taxonómica.

## 1.2. PROBLEMAS DE INVESTIGACIÓN

### 1.2.1. PROBLEMA GENERAL

¿Cuál es el efecto sinérgico del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” sobre la actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*?

### 1.2.2. PROBLEMAS ESPECÍFICOS

- ¿Cuál es el efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” sobre la actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*?
- ¿Cuál es el efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano” sobre la actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*?
- ¿Cuál es el efecto sinérgico a la proporción 1:1 del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” sobre la actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*?

### 1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

#### 1.3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto sinérgico del aceite esencial de *Thymus vulgaris* "tomillo" y *Origanum vulgare* "orégano" sobre la actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.

#### 1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto del aceite esencial de *Thymus vulgaris* "tomillo" sobre la actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.
- Determinar el efecto del aceite esencial *Origanum vulgare* "orégano" sobre la actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.
- Determinar el efecto sinérgico a la proporción 1:1 del aceite esencial de *Thymus vulgaris* "tomillo" y *Origanum vulgare* "orégano" sobre la actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.

### 1.4. JUSTIFICACIÓN, IMPORTANCIA Y LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

#### 1.4.1. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

El presente estudio tiene como propósito evaluar el efecto sinérgico antibacteriano del aceite esencial del *Thymus vulgaris* "tomillo" y *Origanum vulgare* "orégano" para impedir el crecimiento de determinadas bacterias que son causantes de infecciones de origen alimentario como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*<sup>4</sup>. Durante este periodo de tiempo se ha constatado mediante investigaciones que recursos vegetales presentan sustancias activas con propiedades fitoquímicas y actividad farmacológica teniendo la

capacidad de impedir el crecimiento bacteriano<sup>5</sup>. En la actualidad, el reporte de investigaciones relacionadas con especies vegetales vinculadas entre sí con fines de experimentación sobre efectos antibacterianos son muy limitados, por ello surgió el interés de investigar estos recursos por su elevado contenido en principios activos con propiedades farmacológicas, que según los antecedentes presentan actividad antibacteriana. El desarrollo de esta investigación, fue efectuado mediante la asociación entre el aceite de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano”, pretendiendo demostrar un efecto sinérgico potenciando la acción antibacteriana. El estudio ampliará el conocimiento científico y sirve como base para realizar futuras investigaciones.

#### 1.4.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación tiene importancia teórica y social, porque demuestra mediante un estudio científico que hay recursos vegetales como el *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano”, con propiedades fitoquímicas; que al ser evaluadas en asociación inhiben el crecimiento bacteriano, pretendiendo aumentar el efecto antibacteriano mediante la acción sinérgica entre la asociación de los aceites esenciales. Considerando que ambas especies *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” pertenecen a la misma familia según la clasificación taxonómica, esta investigación es considerada importante porque sirve como base científica para continuar estudios posteriores dirigidos a patologías asociadas a enfermedades que se transmiten por la ingesta de alimentos contaminados.

### **1.4.3. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN**

- Elevado costo en los procedimientos de análisis microbiológico y determinación de compuestos activos por cromatografía.
- Escasas referencias bibliográficas sobre asociaciones de plantas medicinales.

## CAPÍTULO II

### HIPÓTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN

#### 2.1. HIPOTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

##### 2.1.1. HIPOTESIS GENERAL

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” poseen efectos sinérgicos sobre la actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.

##### 2.1.2. HIPOTESIS ESPECIFICAS

- El aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” presenta actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.
- El aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano” presenta actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.
- El aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” a la proporción 1:1 presenta efectos sinérgicos sobre la actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.

## 2.2. VARIABLES DE LA INVESTIGACIÓN

### 2.2.1. IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE VARIABLES

Por su posición en una relación causal las variables se clasifican en:

#### A. Variable dependiente

Actividad antimicrobiana.

#### B. Variable independiente

Concentración de los aceites esenciales.

### 2.2.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

**CUADRO N°1: Operacionalización de variables**

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	UNIDAD DE MEDIDA
CONCENTRACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	Independiente	Complejo de principios activos con capacidad antibacteriana	Concentración en mg/ml	100	%
				50	
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	Dependiente	Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas.	Halo mínimo de inhibición	Diametro del halo de inhibición	mm

**FUENTE:** Elaboración propia-2018

## CAPÍTULO III

### MARCO TEÓRICO

#### 3.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

##### 3.1.1. A NIVEL NACIONAL

**Apares R.** “EFECTO SINÉRGICO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* CON AMIKACINA COMPARADO CON AMIKACINA EN *Escherichia coli*, *In vitro*”, Perú **2016**.

El estudio evaluó el efecto sinérgico antimicrobiano de la asociación del aceite esencial de *Origanum vulgare* con amikacina, sobre cepas de *Escherichia coli*. Fue un estudio experimental cuantitativo, la evaluación microbiológica se determinó por el método de Kirby Bauer (discos de difusión). El grupo experimental estuvo constituido por el aceite de orégano y Amikacina y el grupo control por Amikacina. Los datos registrados al medir los diámetros de los halos de inhibición para *Origanum vulgare* fueron de 30.8 mm y para Amikacina fue 30 mm sobre *Escherichia coli*. Comparando ambos diámetros entre el grupo experimental y grupo control hubo una diferencia de 0.8 mm, siendo este valor levemente superior el

cual corresponde a la asociación del aceite de *Origanum vulgare* y Amikacina, concluyendo que el aceite esencial de *Origanum vulgare* asociado a la amikacina tiene efecto sinérgico antimicrobiano frente a *Escherichia coli*<sup>6</sup>.

**Chávez L, Díaz F, Escalante G.** “EFECTO SINÉRGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* A LA GENTAMICINA EN CULTIVOS DE *Escherichia coli*”, Perú **2009**.

La investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto sinérgico de la asociación de dos productos constituidos por el aceite de “*Origanum vulgare*” y gentamicina para detener el incremento bacteriano de *Escherichia coli*. El aceite esencial de *Origanum vulgare* fue obtenido por un procedimiento de destilación. La actividad antibacteriana se realizó mediante la técnica de Kirby Bauer, impregnaron 5 uL de las muestras sometidas a evaluación en discos de papel filtro. Los resultados mostraron que el extracto del *Origanum vulgare* y gentamicina presentaron una medida de 22.38 mm de halo de inhibición, el grupo control constituido por gentamicina tuvo 20.75 mm de halo de inhibición. Concluyendo que existe efecto sinérgico entre el aceite esencial de *Origanum vulgare* y gentamicina frente a *Escherichia coli*<sup>7</sup>.

### 3.1.2. A NIVEL INTERNACIONAL

**Sánchez I, Martínez V.** “DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LAS ESPECIAS EN RAMA, TOMILLO (*Thymus*), ORÉGANO (*Origanum vulgare*) Y CLAVO DE OLOR (*Syzygium*) UTILIZADAS EN UN PRODUCTO CÁRNICO MADURADO FERMENTADO FRENTE A MICROORGANISMOS CRITERIO MICROBIOLÓGICO SEGÚN LA NORMA NTC 1325”, Colombia **2017**.

La presente investigación determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM) del tomillo (*Thymus*), orégano (*Origanum vulgare*) y clavo de olor (*Syzygium*) en rama utilizadas en un producto cárnico fermentado frente a bacterias que son de criterio microbiológico según la NTC 1325. Para ello trabajaron dos metodologías: Difusión en disco y prueba de capacidad de especias, para comparar que metodología tiene mejor resultado al analizar la CIM. Los resultados obtenidos indican que el clavo de olor (*Zyzygium*) en rama tuvo mejores resultados obteniendo 5mm de halos de inhibición, el tomillo no se obtuvo resultados de inhibición frente a *Listeria monocytogenes*, sin embargo, sí evidencio halos de inhibición de 1mm para la *Salmonella* a las concentraciones 10%, 7.5%, 5%. En cambio el orégano (*Origanum vulgare*) no presento ningún efecto antimicrobiano frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*, en ninguna de las cuatro concentraciones. Concluyendo que *Thymus* presenta efecto antibacteriano frente a *Salmonella* y no frente a *Listeria*, sin embargo *Origanum vulgare* presenta efecto antibacteriano frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*<sup>8</sup>.

**Morales A.** “EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DEL TOMILLO (*Thymus vulgaris*) SOBRE LA CONTAMINACIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN QUESO RICOTTA”, Colombia **2015**.

La investigación evaluó el efecto del aceite de *Thymus vulgaris* como antimicrobiano natural sobre *Listeria monocytogenes*. Para realizar el extracto del *Thymus vulgaris* utilizaron el recurso a tres edades de corte 12, 14 y 16 semanas, emplearon el método de destilación por arrastre con vapor. Para demostrar el efecto contra *Listeria monocytogenes* se utilizó la técnica *In vitro* de difusión en agar con discos de papel filtro. El aceite esencial utilizado fue el que tuvo mayor rendimiento constituido por el tomillo con 14 semanas de edad de corte; se probaron concentraciones desde 0.005% hasta 2.4%. Los resultados determinan que el extracto de tomillo a concentraciones de 1.6% tiene efecto biocida sobre *Listeria monocytogenes* presentando halos de inhibición en tres repeticiones (11.33mm, 12mm, 11,17mm). Concluyendo que el aceite esencial de *Thymus vulgaris* presenta efecto antimicrobiano frente a *Listeria monocytogenes*<sup>9</sup>.

**Solís P.** “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*) Y TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*) COMO POTENCIADORES BIOCONSERVADORES EN CARNE DE POLLO”, Ecuador **2011**.

La investigación evaluó el efecto antibacteriano de los aceites de orégano y tomillo como conservadores naturales para disminuir la carga microbiana en el almacenamiento de pechuga de pollo. La evaluación microbiología se realizó mediante la técnica de CMB (Concentración mínima

bactericida) y diámetro de halos de inhibición en (mm) frente a *Salmonella spp.* y otros microorganismos proteolíticos. Utilizaron una concentración al 100% donde el tomillo presentó diámetros de 18 mm a 19 mm de halos de inhibición, siendo superior al patrón de streptomina el cual tiene una medida de 17mm y el orégano presentó una medida de 10 mm de halo de inhibición siendo inferior al de la streptomina. Concluyéndo que el aceite de tomillo y orégano *In vitro* tienen efecto antibacteriano frente a *Salmonella*, sin embargo cabe resaltar que el orégano presentó una inhibición mínima frente a *Salmonella*<sup>10</sup>.

## 3.2. BASES TEÓRICAS

### 3.2.1. ACEITE ESENCIAL

Son una mezcla volátil de compuestos orgánicos, de consistencia líquida o sólida, son de apariencia oleosa y derivan de plantas aromáticas extraídos por métodos físicos. Dentro de los aceites más comercializados durante años se encuentran el aceite esencial del *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano”<sup>11</sup>.

Según la norma AFNOR NF T 75-006 establece la definición de aceite esencial al producto obtenido a partir de un recurso vegetal, bien por arrastre de vapor, por procedimientos mecánicos o por destilación en seco. Se almacenan en los órganos vegetales como flores, hojas, cortezas, leños, frutos y semillas. Se encuentran en las glándulas o espacios intercelulares en el tejido de los recursos vegetales. Las sustancias aromáticas se producen en los cloroplastos de las hojas<sup>12</sup>.

### 3.2.1.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Existen 17500 especies aromáticas, los géneros capaces de elaborar los constituyentes que componen los aceites esenciales y están repartidos en un número limitado de familias como: Lamiaceae, Rutaceae, Apiacea, etc. Tienen un aproximado de 20 a 60 componentes de diferentes concentraciones, y solo son dos a tres componentes mayoritarios como se aprecia en el cuadro N°2 <sup>13</sup>:

**CUADRO N°2: Composición química de los aceites esenciales**

COMPUESTOS	PRINCIPIOS ACTIVOS
Hidrocarburos terpénicos	Terpenos, Terpenoides.
Aldehídos	A. benzoico, A. cinámico, Butanal, Propanal.
Ácidos	Acético, Palmítico.
Alcoholes	Linalol, Geraniol, Mentol.
Fenoles	Anetol, Eugenol.
Esteres	Acetato de linalilo, Acetato de geranilo
Cetonas	Tuyona
Otros	Éteres, derivados nitrogenados, sulfuros.

**FUENTE:** Ortuño M. - 2006.

### 3.2.1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites tienen diferentes criterios de clasificación:

#### a. CONSISTENCIA

- *Esencias fluidas*: Líquidos volátiles a temperatura ambiente.
- *Bálsamos*: Estos son de consistencia más espesa, poco volátiles, pueden sufrir reacciones de polimerización.
- *Oleorresinas*: Son líquidos muy viscosos y sustancias semisólidas retienen el aroma de los recursos vegetales en forma concentrada<sup>14</sup>.

#### b. ORIGEN

- *Naturales*: Son obtenidos directamente de las plantas, no necesitan modificaciones físicas ni químicas para incrementar su rendimiento y su extracción es costosa.
- *Artificiales*: Son obtenidos y enriquecidos con la misma esencia añadiendo uno de sus componentes.
- *Sintéticos*: Son obtenidos y producidos mediante la combinación de sus componentes los cuales son elaborados por procesos de síntesis química<sup>14</sup>.

### c. QUÍMICO

Se clasifican según sus componentes mayoritarios:

- *Aceites esenciales monoterpénicos*: Presentan en su mayoría monoterpenos como el tomillo, orégano y la albahaca.
- *Aceites esenciales sesquiterpenoides* presentes en la copaiba y pino.
- *Aceites esenciales fenilpropanoides*<sup>14</sup>.

#### 3.2.1.3. PROPIEDADES FÍSICAS

Son de aspecto oleoso, altamente volátiles, inflamables, lo que les diferencia de los aceites no esenciales, muy raramente son coloreados. En general tienen una densidad inferior a la del agua. Poseen un índice de refracción elevado y la mayoría desvían la luz polarizada, son olorosos, liposolubles, solubles en alcohol, éter y aceites fijos, pero insolubles en agua<sup>15</sup>.

#### 3.2.1.4. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los compuestos oleosos constituyen la fracción volátil de los principios activos que son contenidos en plantas aromáticas, en el cuadro N°3 se describe los métodos de obtención más utilizados<sup>16</sup>:

### CUADRO N°3: Métodos de extracción de aceites esenciales

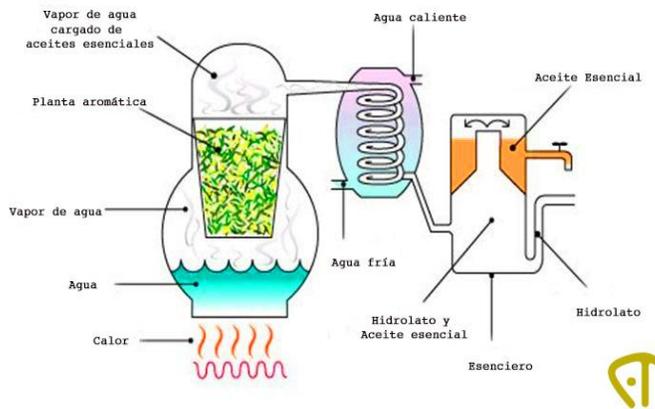
TIPO DE MÉTODO	PROCEDIMIENTO	PRODUCTOS OBTENIDOS
<b>Métodos directos</b>	Extrusión	Aceites esenciales cítricos
	Exhudación	Gomas, resinas, bálsamos
<b>Destilación</b>	Directa	Aceites esenciales y aguas aromáticas
	Arrastre con vapor de agua	
	Destilación- maceración (liberación enzimática de agliconas en agua caliente)	
<b>Extracción con solventes</b>	solventes volátiles	
	solventes fijos (grasas y aceites)	
	Extracción con fluidos en estado supercrítico	

FUENTE: Servicio Nacional de Aprendizaje - 2004.

#### a. DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR

El método de destilación es el más antiguo, el cual permite realizar extracciones cualitativas y cuantitativas, la técnica genera vapor de agua por ebullición el cual impregna toda la materia vegetal que está contenida en un recipiente de vidrio, disuelve y extrae las moléculas aromáticas, que se condensan debido al paso progresivo del agua fría que circula por un serpentín de esta manera se recupera el aceite esencial. En la salida del refrigerante, el producto de la destilación se separa en dos líquidos distintos: el hidrolato (agua aromática) y el aceite esencial (menos denso que el agua), el aceite se deja reposar para que sus

moléculas se estabilicen<sup>17</sup>, este procedimiento se aprecia en la figura N°1.



**FIGURA N°1: Diagrama de destilación por arrastre de vapor.**

**FUENTE:** Aromatherri – 2016

## **b. EXTRACCIÓN POR SOLVENTES**

Estas extracciones son de uso frecuentemente en laboratorios debido al elevado costo de los disolventes, por lo tanto no es factible el uso a nivel industrial. Se utiliza la muestra seca y molida en donde se pone en contacto con un disolvente orgánico tales como el alcohol, éter, cloroformo, etc. Los disolventes solubilizan y extraen otras sustancias como grasas y ceras concluyendo la obtención de una oleorresina o un extracto impuro, finalmente los aceites son recuperados evaporando el alcohol mediante un rotavapor. Una desventaja de esta técnica de extracción es la obtención de esencias contaminadas con otras sustancias, riesgo de

incendios, algunos disolventes causan toxicidad<sup>18</sup>.

### **3.2.1.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES**

La compleja composición química de los aceites hace que estas sustancias tengan varias propiedades terapéuticas, pero la más relevante en la industria farmacéutica es la actividad antimicrobiana. Investigaciones realizadas sobre extracciones de estos compuestos han permitido afirmar que la presencia de fenoles, monoterpenos y alcaloides, presentan acción antibacteriana en consecuencia inhiben el crecimiento microbiano de gérmenes Gram positivos o Gram negativos<sup>19</sup>.

### **3.2.1.6. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Los aceites tienen una compleja composición química, determinados estudios evidencian que los compuestos fenólicos como el carvacrol y timol tienen varios sitios de acción, en consecuencia no tienen un mecanismo específico, actúan dentro de las células y dependiendo de la concentración pueden generar las siguientes acciones frente a las bacterias<sup>20</sup>:

- Degradación de la pared celular.
- Daño a la membrana citoplasmática.
- Coagulación del citoplasma.
- Disminución de la fuerza motriz.

- Produce una hidrofobicidad produciendo la separación de los lípidos de la membrana celular y la mitocondria, desordenando la estructura y haciéndola más permeable, permitiendo de esta manera la filtración de iones y otros contenidos celulares.
- Cambios en la concentración de ácidos grasos de la membrana celular, desencadenando un aumento de ácidos insaturados.
- Pueden actuar como agentes que interfieren con la translocación de protones y la fosforilación del ATP.
- En bacterias Gram negativas se ha observado mayor susceptibilidad a los aceites esenciales debido a la membrana externa que poseen en su estructura, en comparación con bacterias Gram positivas, sin embargo en estudios *in vitro* indican que también interviene el tiempo de exposición de estas sustancias para alcanzar el mismo efecto en ambos tipos de bacterias<sup>21</sup>.

### **3.2.1.7. ACTIVIDAD SINÉRGICA**

Principios activos con propiedades farmacológicas, pueden relacionarse y formar asociaciones proporcionando efectos sinérgicos. La actividad sinérgica está más relacionada a los medicamentos que provocan una respuesta en un mismo sitio de acción, poseen un mismo mecanismo de acción, al administrar en forma simultánea dos compuestos se producirá una respuesta o un efecto aumentado en el

sitio de acción, suman sus efectos para lograr una respuesta o potenciación del efecto,<sup>22</sup>.

#### **a. Mecanismos de sinergia**

El sinergismo entre dos compuestos puede darse por dos mecanismos:

- **Adición:** El efecto producido es igual a la suma de las respuestas de cada uno de las sustancias a evaluar e implica la unión a los mismos tipos de receptores.
- **Potenciación:** El efecto producido es mayor que la suma de los efectos individuales. Este mecanismo se diferencia del otro porque la unión es en diferentes receptores o la acción se da por diferentes mecanismos de acción<sup>23</sup>.

#### **3.2.1.8. USOS DEL ACEITE ESENCIAL**

Determinados estudios reportan que los extractos oleaginosos presentan distintas actividades biológicas tales como antioxidante y antibacteriano, siendo este último de gran interés para el presente estudio, por la presencia de terpenos en los extractos, por lo tanto producen una inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano hasta la acción bactericida, siendo de importancia en la producción de farmacos<sup>24</sup>. Poseen aromas que son introducidos en ciertos medicamentos para enmascarar o mejorar el sabor, el olor, también son usados en cosmética (perfumería),

alimentaria por su atractivo flavor como especias y agentes saborizantes en alimentos<sup>25</sup>.

### **3.2.2. PLANTAS MEDICINALES**

La extracción y aislamiento de sustancias activas de plantas medicinales representan un área en franca expansión. Estas representan cerca del 25% del total de las prescripciones médicas en los países industrializados, en países en vías de desarrollo su uso representa el 80% del artesanal terapéutico. El factor ambiental puede influenciar la producción de los metabolitos secundarios debido que modifica la expresión de genética, siendo responsables en la producción de principios activos; pueden ser activados o desactivados por condiciones como; clima, nutrición, ataque de plagas etc. Los recursos vegetales que nacen espontáneamente poseen una gran variabilidad genética<sup>26</sup>.

Los recursos vegetales al estar expuestos a condiciones ambientales obtienen materias primas específicas para las complejas reacciones bioquímicas que están implicadas en el sostenimiento de sus células y en el desarrollo de las mismas, en condiciones normales casi todas las plantas verdes utilizan la fuente de luz solar para transformar dióxido de carbono y agua en compuestos orgánicos utilizados como fuente de energía<sup>27</sup>.

#### **3.2.2.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA**

Los recursos vegetales actúan a partir de sustancias inorgánicas como el agua y el dióxido de carbono, producen la glucosa y el almidón mediante la fotosíntesis, ambos productos al combinarse con las sales minerales absorbidas

por las raíces, permiten sintetizar diversos principios activos que se encuentran en las distintas partes u órganos de las plantas, proporcionándole el valor medicinal a éstas, debido a la presencia de sustancias químicas que producen un efecto fisiológico<sup>28</sup>. Su composición varía dependiendo de la especie, en el cuadro N°4 se menciona los más representativos.

**CUADRO N°4: Composición química de recursos vegetales de interés.**

<b>COMPUESTOS</b>	<b>ESPECIES VEGETALES</b> *Nombres vulgares propios de Barcelona
Aceites volátiles	Tomillo, orégano, romero.
Ácidos orgánicos	Sauce, Borraja.
Alcaloides	Boldo.
Almidón	Maíz, castañas.
Azúcares	Arándano, madroño.
Cumarinas	Apio, hinojo.
Flavonoides	Abrótano, cardo.
Saponinas	Saponaria, regaliz.

**FUENTE:** Cebrián J. -2012.

### **3.2.3. *Thymus vulgaris* “TOMILLO”**

*Thymus vulgaris* “tomillo” es una hierba muy conocida desde la prehistoria, fue traída de América por los europeos y se cultiva en las tres regiones del Perú (costa, sierra y selva), especialmente en la sierra de Arequipa (Puquina, Pocsi, Polobaya, Chiguata), Moquegua, Tacna (Candarave) y Lima (Huaral), para su desarrollo requiere de climas cálidos y secos, altitudes entre 800 a 2500 m.s.n.m. poco exigente de agua<sup>29</sup>.

### 3.2.3.1. TAXONOMÍA

<b>Reino:</b>	Plantae.
<b>División:</b>	Magnoliophyta.
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida.
<b>Orden:</b>	Lamiales.
<b>Familia:</b>	Lamiaceae.
<b>Género:</b>	<i>Thymus</i> .
<b>Especie:</b>	<i>vulgaris</i> .
<b>Nombre científico:</b>	<i>Thymus vulgaris</i> .
<b>Nombre común:</b>	Tomillo, Tomello, tremoncillo, extremoncillo <sup>30</sup> .

### 3.2.3.2. HÁBITAT

No requiere un terreno fértil ni estercolado, sino soleado, por que crece de forma espontánea en suelos endebles generalmente zonas costeras. Es una pequeña planta arbustiva, que tiene aproximadamente unos 30 cm de altura, muy aromática y está expuesta a fuertes vientos<sup>31</sup>.

### 3.2.3.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

*Thymus vulgaris* tiene flores, hojas, tallo y raíz, las cuales se pueden apreciar en la Figura N°2.

- **RAÍZ**

Presenta un sistema radical profundo una raíz adventicia, el cual le ayuda a estabilizarse en el

suelo, permitiendo tolerar periodos calurosos y secos<sup>32</sup>.

- **TALLO**

Son erectos, numerosos y surgen desde la raíz de la planta, tiene ramificaciones leñosas, con ramas tortuosas<sup>32</sup>.

- **HOJA**

Posee hojas opuestas de forma variada, lanceoladas, estrechas de 3 a 6 mm de largo y 1 a 3 mm de ancho; la inflorescencia es verticilada de pocas flores color púrpura. La cara dorsal de las hojas está marcada por un nervio central deprimido; las dos caras están recubiertas por un indumento gris a gris verdoso<sup>33</sup>.

- **FLORES**

Las flores, con cáliz belloso y corola bilabiada rosada o blanquecina; parda en estado desecado, se encuentran agrupadas en glomérulos ovoides<sup>34</sup>.



**FIGURA N°2: *Thymus vulgaris* “tomillo”**

**FUENTE:** Franz Eugen Köhler – 2010.

#### **3.2.3.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *Thymus vulgaris* “tomillo”**

Existen quimiotipos consideradas razas químicas que son frecuentes en plantas con aceites esenciales. Son siete quimiotipos diferentes de los cuales el *Thymus vulgaris* “tomillo” es el más demostrativo e importante del mediterráneo occidental, porque esta especie es morfológicamente homogénea y cariologicamente estable, el contenido de aceite es de 5 a 25mL/Kg y un mínimo de 0.5% de fenoles volátiles expresados en timol, pero puede variar porque además contiene heterósidos de la epigenina, luteolina y 6-hidroxiluteolina, así como flavonas<sup>35</sup>.

Este recurso vegetal también contiene heterosidos monoterpénicos, ya que una pequeña parte de timol y carvacrol se hallan en forma de glucosidos o de galactósidos.

Flavonas metoxiladas como cirsilineol, cirsimaritina, 5-desmetilnobiletina, timonina, timusina. Otros componentes como: ácidos fenoles: caféico, rosmarínico; triterpenos (ácido ursólico y oleanólico)<sup>36</sup>.

Estudios experimentales indican que *Thymus vulgaris* “tomillo” presenta una composición compleja de sustancias activas que se describen en el cuadro N°5<sup>9,37</sup>.

**CUADRO N°5: Composición química del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “Tomillo”**

<i>Thymus vulgaris</i> “tomillo”
Taninos 70 %
Carvacrol 65 %
Linalol 4-6.2%
Timol 35.8%, según la norma 36-55%
<i>y</i> - terpineno 9.7%, según la norma 5-10.3%
<i>p</i> - cimeno 15-28%

FUENTE: Lagos E.-2012.

### 3.2.3.5. FARMACOLOGÍA

El aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo”, contiene fenoles que le otorgan el poder antimicrobiano, antiespasmódico y antifúngico, comprobadas en ensayos *in vitro*, todos los quimiotipos son activos pero la actividad bactericida, se le atribuye a esta especie por presentar dos compuestos importantes como el timol y carvacrol. El aceite y el timol componen gran parte de la formulación de diversas especialidades; como pomadas antisépticas y cicatrizantes, jarabes para afecciones de vías respiratorias, preparaciones

para inhalación, es utilizado en especialidades destinadas a la antisepsia bucal y medicación para irritaciones cutáneas<sup>38</sup>.

*Thymus vulgaris* “tomillo” es usado desde la antigüedad por presentar varias propiedades, siendo recomendado para enfermedades pulmonares: asma, catarros, bronquitis, pleuritis. Para la fabricación de cosméticos en donde extraen las esencias de las hojas por destilación; en medicina el aceite esencial actúa sobre la circulación y centros nerviosos<sup>39</sup>.

A pesar que el tomillo es de amplio uso tradicional, existen pocos estudios clínicos que hayan sido publicados sobre su eficacia terapéutica. En la medicina alternativa los preparados de tomillo forman parte de tratamientos combinados con otras especies medicinales. La Agencia Europea del Medicamento (EMA) aprobó el uso bien definido y uso tradicional de preparados que están basados en la combinación de tomillo y raíz de primavera (*Primula veris L.*) como expectorante, por la presencia de saponósidos. Se evidenciaron ensayos clínicos del aceite esencial del tomillo en mujeres con dismenorrea primaria comparado con la acción del ibuprofeno, comprobándose la eficacia antiálgica de *Shirazi thymus vulgaris*, el efecto producido se debió a las cantidades de timol y carvacrol, confirmándose su capacidad para disminuir el dolor inhibiendo la biosíntesis de prostaglandinas (propiedad atribuida al carvacrol) y el timol se comporta como un inhibidor de la liberación de elastasa de neutrófilos, siendo efectivo en procesos inflamatorios de origen infeccioso. Se realizó también otro estudio clínico comprobándose la eficacia de un preparado de tomillo y hoja de hiedra como efecto sinérgico en pacientes ambulatorios con bronquitis aguda, determinándose la

efectividad en esta afección. Esta planta medicinal tiene efectos antisépticos y podría actuar de manera sinérgica o antagónica junto a otros antibióticos<sup>40</sup>.

### 3.2.4. *Origanum vulgare* “ORÉGANO”

*Origanum vulgare* “orégano” de origen Europeo y Asiático, es cultivado en Tacna (Tarata), Moquegua, Junín y Arequipa, cosechado, desecado y distribuido a los mercados nacionales y al exterior. Se cultiva en altitudes de 50 a 3400 m.s.n.m<sup>41</sup>.

#### 3.2.4.1. TAXONOMÍA

<b>Reino:</b>	Plantae.
<b>División:</b>	Magnoliophyta.
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida.
<b>Orden:</b>	Lamiales.
<b>Familia:</b>	Lamiaceae.
<b>Género:</b>	<i>Origanum</i> .
<b>Especie:</b>	<i>vulgare</i> .
<b>Nombre científico:</b>	<i>Origanum vulgare</i> .
<b>Nombre común:</b>	Orégano <sup>42</sup> .

#### 3.2.4.2. HÁBITAT

Es un arbusto herbáceo, perenne y aromático, cultivado hace varios años en climas templados, terrenos bien drenados en donde no se impregnen de agua en el invierno, crece en pastizales, pedregales, en zonas secas y soleadas. Es resistente a las sequías y heladas siempre y cuando esté en un cultivo en plena tierra, vive

por más de diez años. Alcanza una altura de 30 a 80 cm<sup>43</sup>.

### 3.2.4.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

*Origanum vulgare* tiene flores, hojas, tallo y raíz, se pueden observar en la figura N°3:

- **RAÍZ**

Es fasciculada, muy ramificada, al estar expuesta a la humedad puede ser susceptible a problemas fúngicos<sup>44</sup>.

- **TALLO**

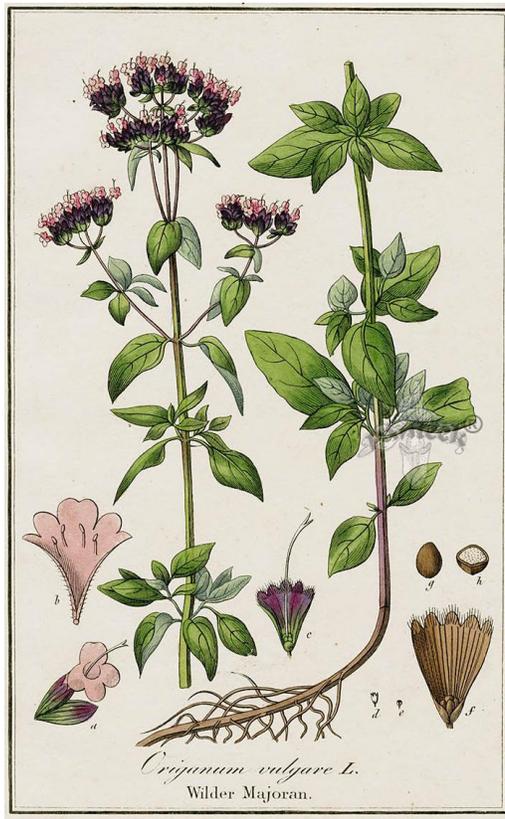
Son de color verde y rojizo, consistencia leñosa, se ramifican en la parte superior, son erguidos y presentan diez pares de ramas por tallo<sup>45</sup>.

- **HOJAS**

Son ovaladas, enteras, pilosas, pecioladas y anchas en general, con vellosidades en el envés, una superficie punteada por unas glándulas esferoidales que contienen las esencias, con bordes enteros o dentados.

- **FLORES**

Flores dispuestas en espiga de verticilastros de 5 a 30 mm, ovoide, oblonga o prismática, formando un conjunto, una inflorescencia carimbosa densa<sup>46</sup>.



**FIGURA N°3:** *Origanum vulgare* “Orégano”

**FUENTE:** Eduard Winkler Medicinal Prints - 2005.

#### **3.2.4.4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *Origanum vulgare* “orégano”**

Existen estudios sobre la concentración del aceite esencial de *Origanum vulgare* indicando que tienen de 1.1% a 2% de aceite, este aceite está compuesto por fenoles como carvacrol y timol, los monoterpenos hidrocarburos  $\gamma$ -terpineno y *p*-cimeno, los cuales son precursores biológicos del carvacrol y timol; estos cuatro compuestos constituyen entre el 80% y 90% del total del aceite esencial<sup>47</sup>.

La composición química del orégano fue evaluada por diversas investigaciones utilizando diferentes métodos de extracción permitiendo la obtención de extractos acuosos y aceites esenciales. Se han reconocido a los flavonoides como apigenina y luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. Contiene además ácidos cumarínicos, ferílico, cafeínico vainillínico<sup>48</sup>.

El porcentaje de sustancias activas que presenta el aceite esencial de *Origanum vulgare*, se pueden observar en el cuadro N°6<sup>49</sup>:

**CUADRO N°6: Composición química del aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano”**

<i>Origanum vulgare</i> "orégano"
Timol 1.47%
Termineol 2.76%
Carvacrol 7.72%
<i>p</i> -cimeno 8.3%

**FUENTE:** Acevedo D, Navarro M, Monroy L.- 2013.

### 3.2.4.5. FARMACOLOGÍA

Las partes aéreas como las hojas, ramas y sumidades floridas, se utilizan con fines medicinales estas se emplean en distintas formas como la decocción, infusión, aceite esencial, esencia y jarabe. Se aprovecha mejor la planta seca<sup>50</sup>. El uso tradicional presenta efectos como; emenagogo, antiespasmódico, antiinflamatorio, expectorante, diurético, tónico, en trastornos funcionales

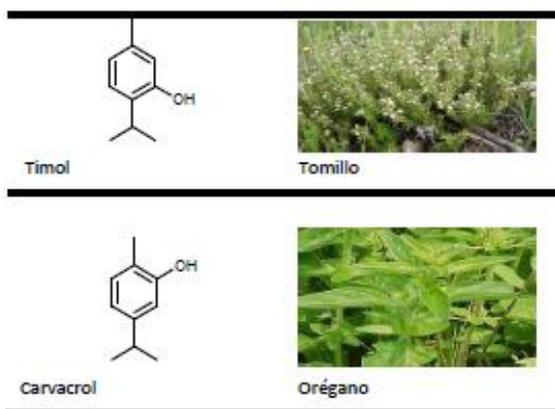
digestivos, tiene propiedades antibacterianas e insecticidas<sup>51</sup>.

El aceite de *Origanum vulgare* “orégano” extraído de las hojas es utilizado en la fabricación de antibióticos, fungicidas, también es usado como aditivo en la fabricación de alimentos, químico-farmacéutica y perfumería<sup>52</sup>.

Estudios realizados demuestran que *Origanum vulgare* “orégano” presenta actividad antimicrobiana debido que detienen el desarrollo de determinadas bacterias tales como: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus intermedius*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*<sup>53</sup>.

### **3.2.5. PRINCIPIOS ACTIVOS RELEVANTES DE *Thymus vulgaris* Y *Origanum vulgare*.**

Los aceites constituyen una composición química compleja pero se pueden identificar como compuestos terpénicos y fenoles, atribuyéndoles las propiedades bactericidas, fungicidas e insecticidas, estos están presentes en recursos naturales aromáticos en contra de la depredación que sufren bajo la acción de bacterias, hongos e insectos, en la figura N°4 se observa las estructuras químicas de los principales compuestos que presenta el tomillo y el orégano<sup>54</sup>:

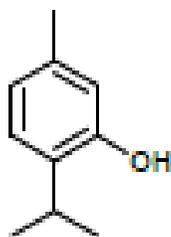


**FIGURA N° 4: Estructura química del tímol y carvacrol según su forma de origen.**

**Fuente:** Muñoz A. – 2010

### 3.2.5.1. TIMOL

Timol es un compuesto fenólico natural que le concede las propiedades antibacterianas, antioxidantes y antifúngicas, está presente en los aceites oleaginosos de *Thymus*, *Origanum*, *Thymbra* y *Lippia*, diversos estudios han mostrado su efectividad en estas especies, en la figura N°5 se puede apreciar su estructura química <sup>55</sup>.



**FIGURA N°5: Estructura química del tímol**

**FUENTE:** Rota C. 2008

El timol es un compuesto que presenta una efectiva actividad antimicrobiana frente a *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*<sup>56</sup>.

Estudios realizados demostraron que la propiedad antimicrobiana se debe a la presencia de compuestos denominados “terpenoides”. Estos contienen grupos alcoholes, aldehídos, grupos cetónicos y ejercen su actividad mediante tres mecanismos<sup>57</sup>:

- Aumenta la permeabilidad de la membrana a iones pequeños.
- Afecta la estabilidad estructural de la membrana.
- Desestabiliza el empaquetamiento de la bicapa lipídica.

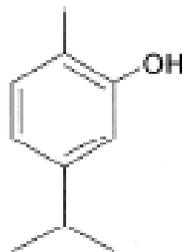
### 3.2.5.2. CARVACROL

La elevada bioactividad de los aceites de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* que pertenecen a la familia **Lamiaceae**, se debe a la presencia de constituyentes considerados componentes principales: timol (2-isopropil-5-metilfenol) y carvacrol (5-isopropil-2-metilfenol). El carvacrol es más eficaz que el timol frente a *Escherichia coli*, sin embargo, fue demostrada su actividad también frente a *Penicillium citrinum*. Al ingresar al microorganismo patógeno produce cambios a nivel celular, dañando las membranas<sup>58</sup>.

Es un monoterpenoide fenol, se obtiene por el aceite de orégano y en un porcentaje al 5% a 75% en el

aceite de tomillo, su fórmula química es  $C_6H_3-CH_3(OH)(C_3H_7)$  y su estructura química se puede visualizar en la figura N°6. El aceite de orégano fue ampliamente estudiado por este principio activo (carvacrol) demostrando su capacidad antimicrobiana, un estudio asoció las películas comestibles basadas en WPI con aceite de orégano y como resultado inhibieron el desarrollo de *L. innocua*, *S. enteritidis* y *S. aureus*<sup>59</sup>.

Cabe mencionar que el carvacrol tiene diferentes actividades biológicas antimicrobianas, antioxidantes, antimutagénicas, antigenotóxicas, antihepatotóxicas y hepatoprotectoras, sus propiedades han sido extendidas sobre bacterias patogénicas y algunos hongos<sup>60</sup>.



**FIGURA N°6: Estructura química de carvacrol.**

**FUENTE:** Quintanilla J-2016

### 3.2.6. BACTERIAS

Son llamadas procariotas, poseen un único cromosoma de ADN no separado del resto de la célula, sin ninguna membrana que le independice de él. Tienen un tamaño diminuto de 0.1 a 2.0 micras, su reproducción es asexual y son heterótrofas, es decir no pueden sintetizar su propia materia orgánica<sup>61</sup>.

### 3.2.7. *Listeria monocytogenes*

El género *Listeria* está constituido por 6 especies importantes de las cuales la *Listeria monocytogenes* es el único patógeno humano, se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, se puede encontrar en humanos, mamíferos, aves, plantas y suelos. Causa infecciones a neonatos, ancianos, mujeres embarazadas y pacientes con deficiencia de la inmunidad celular<sup>62</sup>. Este patógeno es el responsable de infecciones alimentarias más violentas, con una tasa de mortalidad entre un 20 a 30%, más alta comparado con las enfermedades transmitidas por alimentos. Es responsable de la listeriosis y meningitis<sup>63</sup>.

#### 3.2.7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

*Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, diminuto (0,4 a 0,5 u de ancho x 0,5 a 1,2 u de largo) no ramificado, anaerobio facultativo capaz de multiplicarse en un amplio rango de temperaturas (-7°C a 45°C) con una elevada concentración de sal. No tiene cápsula ni espora, tiene flagelos peritricos, debido a esto tiene movilidad a 30°C o menos, pero es inmóvil a 37°C, temperatura a la cual sus flagelos se inactivan. Crece en agar sangre de carnero

causando una beta hemolisis, es catalasa positivo y oxidasa negativo; hidroliza la esculina, produce ácido, pero no el gas de algunos carbohidratos<sup>63,64</sup>.

### 3.2.7.2. PATOGENICIDAD

Es un patógeno facultativo intracelular, que se presenta tras la ingesta de alimentos contaminados. Está relacionado particularmente con los productos lácteos, puede causar cuadros clínicos asintomáticos, formas crónicas de meningitis en individuos sanos y en aquellas personas inmunodeprimidas. Puede sobrevivir ante la presencia de las enzimas proteolíticas, ácido gástrico, y sales biliares que produce el ser humano, debido a que esta bacteria tiene una acción protectora de genes de respuesta ante una condición de estrés<sup>62,65</sup>.

*Listeria monocytogenes* puede adherirse a células hospedadoras mediante la interacción de las proteínas de la superficie bacteriana. Se implanta en el citoplasma de la célula, prolifera y se disemina en las células adyacentes, su unión a la célula del huésped se da por una proteína llamada “integrina”, luego es fagocitada por la célula del huésped, en el fagolisosoma es expuesta a un ambiente con un pH bajo, activando una exotoxina que es capaz de destruir la membrana del fagolisosoma en 30 minutos y escapar al citoplasma. Esta exotoxina hemolítica y citolítica es una causa crítica de virulencia de este microorganismo, conlleva a una interrupción de las membranas fagolisosómicas y a un crecimiento sin restricciones de *Listeria* dentro del fagocito<sup>63,66</sup>.

### 3.2.7.3. FACTORES DE VIRULENCIA

Se han descrito diversos factores de virulencia como el PrfA (factor regulador positivo A) el cual media la transición de esta bacteria, respondiendo a señales ambientales y endógenas permitiendo cambiar la bacteria de un estado avirulento a un estado virulento dentro del hospedero, la hemolisina cardiotónica, que puede ser la responsable por la muerte en los casos más graves; la lipolisina, un factor antifagocitario y un factor activador de maduración de monocitos. En la pared celular, la bacteria contiene una proteína internalina, que es un factor de virulencia, y el glicérido A, que es antigénico; además de la proteína Act A y la fosfolipasa C, que también son antigénicas<sup>62,67</sup>.

### 3.2.8. *Salmonella enteritidis*

La familia enterobacteriaceae está conformada por un grupo muy heterogéneo de bacterias como el género *Salmonella* que invaden el intestino del hombre y especies de origen animal, desarrollando patologías intestinales. Algunas especies se diseminan con facilidad por la circulación sanguínea, ocasionando estados septicémicos graves o la localización del bacilo en otros órganos y tejidos. Las infecciones intestinales frecuentes en el humano son resultado de la ingestión de organismos presentes en agua y/o alimentos contaminados como huevos mal cocidos considerados como el principal factor de riesgo para infección por *Salmonella enterica*<sup>68</sup>. Es el agente más conocido que causa la salmonelosis transmitida por los alimentos y ha sido reconocida como la razón principal de todas las afecciones transmitidas por bacterias patogénicas<sup>69</sup>.

### 3.2.8.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

*Salmonella enteritidis* son bacilos Gram negativos, móviles, flagelos peritricos, no esporulados, no encapsulados, con fimbrias y pilis, no producen esporas, forma colonias de 2 a 4mm de textura rugosas o lisas. Este microorganismo es aerobio o anaerobio facultativo mesófilo, se desarrollan en un pH 8 que fermentan glucosa, maltosa y manitol. No fermentan la lactosa, producen ácido sulfhídrico, resistente a: verde brillante, tetracionato de sodio, desoxicolato de sodio, catalasa positivo, oxidasa negativo citrato positivo<sup>70</sup>.

### 3.2.8.2. PATOGENICIDAD

*Salmonella* se adapta a cualquier tipo de huésped, es considerado como el patógeno universal. Al ingerir agua y alimentos contaminados, esta bacteria inicia su ciclo de infección invadiendo al individuo por medio del tejido linfoide. Se adhiere apicalmente a las células epiteliales del íleon y a las células M que debido a la ausencia del borde de cepillo así como de glicocalix, se acondiciona un medio para el desarrollo y la multiplicación. Invade las células del individuo mediante un mecanismo conocido como “disparo”, envía señales a las células epiteliales que inducen rearrreglos del citoesqueleto provocando la formación de ondulamiento (ruffling) en su superficie, como respuesta al contacto. Cuenta con 5 islas de patogenicidad, presenta también proteínas efectoras en la SPI-1 (isla de patogenicidad), involucradas en los rearrreglos del citoesqueleto: SipA, SopE, SopE2 y SopB3. Esta bacteria experimenta diferentes tipos de estrés a los cuales debe adaptarse; como el pH bajo del estomago<sup>63,71</sup>.

### 3.2.8.3. FACTORES DE VIRULENCIA

*Listeria monocytogenes* presenta los siguientes factores de virulencia:

- **Los antígenos de superficie (Ag K o Vi):** Incluyen el antígeno Vi, identificado por Felix y Pitt, ha sido asociado con las cepas de mayor virulencia las que necesitan menor dosis infectiva para producir padecimiento. Llamándose antígeno para indicar virulencia, es un factor antifagocitario.
- **Los antígenos O (Ag O):** Se consideran adhesinas porque ayudan al microorganismo a adherirse a las células de los tejidos. De esta forma funcionan las fimbrias de las cepas que tienen estas estructuras.
- **La endotoxina de pared (Ag H, Ag F, Islotes de patogenicidad SP11, SP12):** Es un polisacárido que se localiza en esta familia de microorganismos. Produce necrosis focal en el lugar de colonización de la bacteria, produciendo úlceras en el intestino delgado<sup>72</sup>.

### 3.2.9. MÉTODOS DE ESTUDIOS DE LA SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANA.

Existen diferentes pruebas de sensibilidad sobre microorganismos patógenos que determinan el grado de sensibilidad o resistencia que presenta una bacteria<sup>73</sup>.

### **3.2.9.1. Método del antibiograma disco-placa**

El fundamento está basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, establece en forma cuantitativa el efecto de un conjunto de sustancias ensayadas sobre cepas bacterianas. Este método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia que se necesita para detener el desarrollo microorganismos y el halo de inhibición que se forma en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado con la bacteria a ensayar, en donde se ha depositado un disco de papel filtro de 6mm de diámetro. Dentro del periodo de incubación el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda de agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración apareciendo una zona de inhibición<sup>74</sup>.

### **3.2.9.2. Método de dilución**

Este método fue uno de los primeros, permite la determinación cuantitativa de la sensibilidad de un antibiótico, se coloca concentraciones crecientes del agente antibacteriano se encuentra diluido en un medio de cultivo (caldo o agar), permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos, sin embargo presenta desventajas siendo laborioso, costoso por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización siendo limitado su uso a casos especiales<sup>75</sup>.

### 3.2.10. ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN POR ALIMENTOS Y SU RELACIÓN CON LA SALUD

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son enfermedades con agentes químicos o microbiológicos producidas por la ingestión de agua contaminada, engloban diferentes tipos como intoxicaciones alimentarias, toxiinfecciones alimentarias e infecciones alimentarias, estas dos últimas son las de relevancia para este estudio, porque las bacterias que producen estas infecciones son *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, etc siendo causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo<sup>76</sup>.

En Cajamarca se produjo una contaminación fecal en hortalizas que se expendían en los mercados de dicha ciudad en donde encontraron patógenos bacterianos, la Food and Drug Administration (FDA), establecen que gran parte de estas bacterias están implicadas en casos de ETAs, algunas de estas enfermedades han sido ocasionadas por el consumo de tomate contaminado con *Salmonella*, determinan también que otros microorganismos muy aparte de *Escherichia coli*, como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* pueden estar presentes en hortalizas, aún en recuentos mínimos para coliformes fecales, constituyéndose así un riesgo para la salud pública<sup>77</sup>.

En el 2013 un estudio analizó la leche y queso fresco que se comercializaba en la provincia de Trujillo al evaluar las 60 muestras de leche y queso, se encontró *Listeria monocytogenes* en un 3.34% en queso fresco, al relacionarlo con la Norma Técnica establecida se concluye que fue bajo el porcentaje encontrado, mostrando la preocupación, porque los factores de riesgo son altos que posibilitan la infección por listeriosis humana<sup>78</sup>.

### 3.2.10.1. CLASIFICACIÓN DE LAS ETAs SEGÚN LA OMS

Estas enfermedades son clasificadas en función a la manera que se manifiestan, son tres tipos<sup>79</sup>:

- *Infección*; ocasionada por la ingestión de alimentos contaminados.
- *Intoxicación*; causadas por el consumo de alimentos que presentan sustancias tóxicas o productos tóxicos que están alterados por la descomposición del propio alimento.
- *Toxiinfección*; originadas por la aparición de gérmenes patógenos que se reproducen y producen toxinas en los alimentos.

### 3.3. DEFINICIÓN DE TERMINOS BÁSICOS

- **Aceite esencial:** Es un producto obtenido por un recurso vegetal, bien por arrastre de vapor o por procedimientos mecánicos vapor destilación en seco. Sustancia untuosa, combustible y líquida. Insoluble en agua pero se mezcla fácilmente en disolventes orgánicos como el éter.
- **Sinergismo:** Palabra griega que significa la cooperación de dos agentes a un mismo fin; el resultado será un efecto igual a la suma del propio agente (sinergia aditiva) o un efecto aun mayor (sinergia de potenciación).
- **Principio activo:** Sustancia activa química que se utiliza por su actividad farmacológica, es responsable del efecto farmacológico.
- **Fitoquímico:** Está constituido por sustancias activas que Se hallan en un recurso vegetal y presentan propiedades benéficas para la salud.

- **Efecto farmacológico:** Es la respuesta observable del medicamento, se define por la naturaleza, la intensidad y duración de la respuesta, comprende el efecto terapéutico y los efectos adversos.
- **Concentración:** Medida de cantidad de soluto en una cantidad dada de solvente.
- **Patógeno:** Organismo que puede desarrollar situaciones de inmunosupresión transitoria de variable intensidad, con la finalidad que la respuesta inmune sea menos potente en contra del microorganismo. Incita una respuesta inmune exagerada que termina produciendo daño, y mayor invasión del patógeno.
- **Enfermedades transmitidas por alimentos:** Desencadenan trastornos intestinales, con síntomas como; dolor abdominal, diarrea y vómito. Estas enfermedades son causadas por la ingesta de alimentos que presentan una elevada aglomeración de bacterias patógenas (perjudicial para el organismo) o de productos tóxicos (venenos), se multiplican entre sí.
- **Mortalidad:** Es el volumen de muertes ocurridas por todas las causas de una enfermedad, en todos los grupos de edad y para ambos sexos.
- **Compuestos fenólicos:** Estructura molecular que contiene al menos un grupo fenol, deriva del metabolismo secundario de recursos vegetales y presentan propiedades biológicas.
- **Resistencia bacteriana:** Capacidad que tienen las bacterias de soportar los efectos de los antibióticos.

## CAPITULO IV

### METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

#### 4.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

##### 4.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

- **Analítico:** Porque presenta relación de variables.
- **Transversal:** Porque se realizó una medición en la muestra con relación al tiempo.
- **Prospectivo:** Porque la captación de la información se da después de iniciada la investigación.

#### 4.1.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN

- **Explicativo:** Considerada así porque busca explicar el efecto sinérgico antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare* frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.

### 4.2. MÉTODO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

#### 4.2.1. MÉTODO DE INVESTIGACIÓN

**Deductivo:** Porque el presente estudio parte de lo general a lo específico, llega a conclusiones empíricas a partir de la experiencia.

#### 4.2.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

**Experimental:** Porque se manipula las variables, en el cuadro N°7 se describe el diseño de investigación propuesta para el desarrollo de esta investigación.

**CUADRO N°7: Diseño de la investigación**

FORMULA	LEYENDA
	<p><b>G<sub>L</sub></b>: Grupo Placas Petri con <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111.</p>
<p><b>G<sub>L1</sub> O1 X<sub>1</sub> O2</b></p>	<p><b>G<sub>S</sub></b>: Grupo Placas Petri con <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076.</p>
<p><b>G<sub>L2</sub> O1 X<sub>2</sub> O2</b></p>	<p><b>X<sub>1</sub></b>: Momento de experimentación (Aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo”).</p>
<p><b>G<sub>L3</sub> O1 X<sub>3</sub> O2</b></p>	<p><b>X<sub>2</sub></b>: Momento de experimentación (Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> “orégano”).</p>
<p><b>G<sub>S4</sub> O1 X<sub>1</sub> O2</b></p>	<p><b>X<sub>3</sub></b>: Momento de experimentación (Aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> “tomillo” asociado al Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> “orégano”).</p>
<p><b>G<sub>S5</sub> O1 X<sub>2</sub> O2</b></p>	<p><b>O1</b>: Inicio del experimento</p>
<p><b>G<sub>S6</sub> O1 X<sub>3</sub> O2</b></p>	<p><b>O2</b>: Medida del halo formado (zona de inhibición) después de la aplicación del aceite.</p>

FUENTE: Apares R.- 2016

### 4.3. POBLACIÓN Y MUESTRA DE LA INVESTIGACIÓN

#### 4.3.1. POBLACIÓN

Hojas y tallo de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano”.

#### 4.3.2. MUESTRA

- 8 ml del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo”.
- 5 ml del aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano”.

#### 4.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

##### 4.4.1. TÉCNICAS

- **Destilación por arrastre de vapor de agua:** Técnica empleada para la obtención de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*.
- **Difusión con Discos – Método de Kirby Bauer y colaboradores:** Técnica empleada para la evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Thymus vulgaris* y *Origanum vulgare*.
- **Observación directa:** Técnica empleada para registrar la medida de los halos de inhibición expresados en milímetros que presentaron ambos aceites<sup>80</sup>.

##### 4.4.2. INSTRUMENTOS

Para la recolección de los datos se utilizó el siguiente instrumento:

“**FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS**” donde fueron arrojados los datos de la medida de la zona de inhibición producida sobre *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. Ver el **anexo N°1**.

#### 4.5. PROCEDIMIENTO DE RECOLECCION DE DATOS

##### 4.5.1. RECOLECCIÓN DE LOS RECURSOS VEGETALES

Las muestras vegetales se recolectaron en días secos a mediados de la primavera en forma selectiva, excluyendo a los recursos vegetales dañados de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano”<sup>81</sup>.

- *Thymus vulgaris* “tomillo” se recolectó en la provincia de Huaral perteneciente al Departamento de Lima durante el mes de octubre del 2017.
- *Origanum vulgare* “orégano” se recolectó en la provincia de Tarma Departamento de Junín durante el mes de octubre del 2017. Ver el **anexo N°7**.
- Se recolectó 4 Kg de cada vegetal de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano”.

##### 4.5.2. DETERMINACIÓN BOTÁNICA DEL RECURSO VEGETAL

La clasificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Ver el **anexo N°5 y 6**.

##### 4.5.3. CARACTERÍSTICAS DE LOS RECURSOS NATURALES

El estudio utilizó como material de experimentación las hojas y el tallo de ambas plantas medicinales, según investigaciones realizadas determinan que presentan mayor cantidad de compuestos activos.

#### 4.5.4. EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

La extracción de los aceites de las dos muestras vegetales ***Thymus vulgaris*** “tomillo” y ***Origanum vulgare*** “orégano” se realizó en los laboratorios de la Facultad de Ingeniería Química en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en el diagrama N°1 se puede visualizar los procedimientos para la obtención de los aceites.

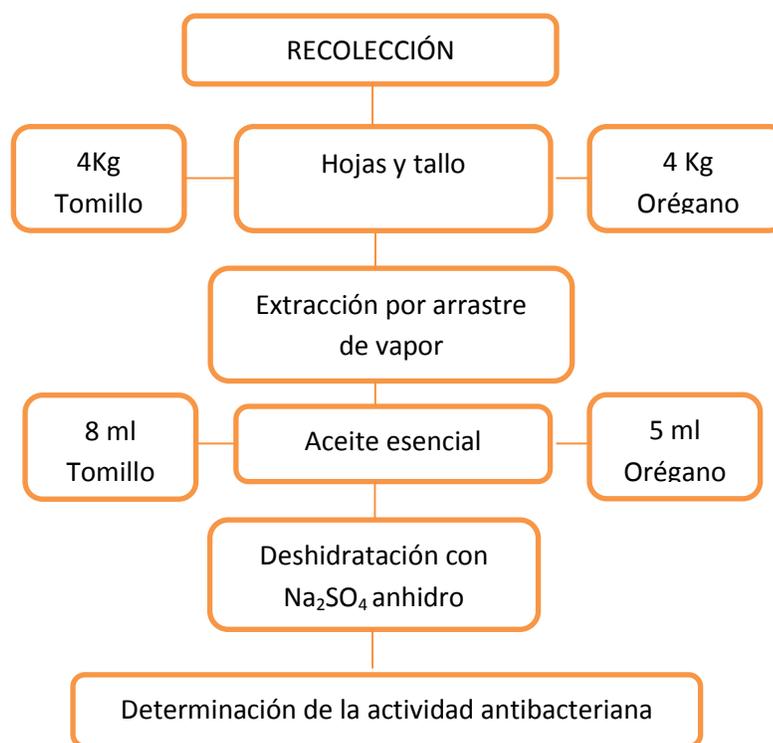
Para la destilación se utilizó el método de arrastre por vapor de agua que se distingue por ser una destilación, está formado por un *generador de vapor*, *alambique* y un *condensador*, las cuales son unidas mediante un cierre hidráulico, un separador de fases semi-continuo llamado *separador florentino* y una probeta de 100 mL ubicado inmediatamente a la salida del condensador y pera de decantación. Seguidamente se colocó en el alambique metálico 4 Kg del recuso vegetal por separado en diferentes procesos, la muestra fue sometida (durante 65 minutos) al vapor producido, el aceite se evaporó, y al ser soluble en el vapor circundante fue “arrastrado” por la corriente hacia el tope del destilador.

Esta mezcla de vapor saturado y aceite esencial se dirigió hacia el serpentín donde se condensó y se enfrió por efecto del intercambio de calor con el agua corriente que circunda.

Al salir del condensador se obtuvo una emulsión líquida inestable que fue recibida en una probeta de vidrio y posteriormente a una pera de decantación, en donde ocurrió la división de fases a causa de la desigualdad de densidades

o las propiedades de inmiscibilidad que hay entre el agua y el aceite<sup>82</sup>.

Se guardó los extractos obtenidos de las dos muestras vegetales por separado en frascos de vidrios herméticos de color ámbar (cristal topacio)<sup>83</sup>, culminando el primer proceso se procedió con la deshidratación de las impurezas de agua en el aceite de cada recurso vegetal para ello se utilizó el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (sulfato de sodio anhidro) y posteriormente fue filtrado, este proceso fue realizado en el Centro de Control Analítico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Ver **anexo N°8**.



**DIAGRAMA N°1: Preparación de la muestra y extracción del aceite esencial.**

**FUENTE:** Elaboración propia - 2018

#### CUADRO N° 8: Rendimiento del aceite esencial de tomillo y orégano.

EXTRACCIÓN	Peso	Tiempo Destilación	Cantidad Obtenida	Rendimiento
Aceite esencial <i>Thymus vulgaris</i> "tomillo"	4 Kg	65 min	8 mL	0.20%
Aceite esencial <i>Origanum vulgare</i> "orégano"	4 Kg	65 min	5 mL	0.10%

FUENTE: Elaboración propia – 2018.

#### 4.5.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó por el Método Kirby Bauer y Colaboradores - Difusión en Agar por Discos; el cual fue desarrollado en el laboratorio microbiológico BIOEN LAB S.A.C. y está constituido por una serie de pasos, que se describen en el diagrama N°2. Ver el **anexo N°2**

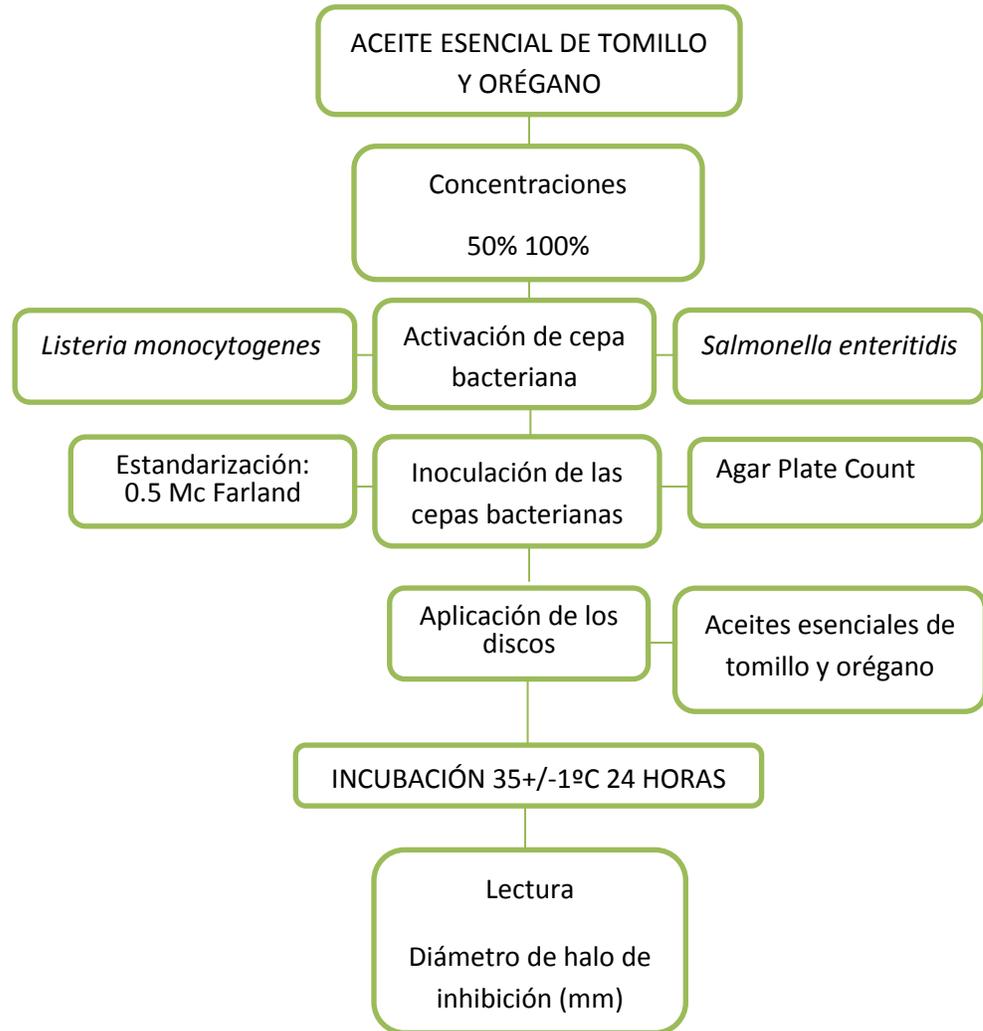
- Se trabajó con cepas estándar ATCC (American Type Culture Collection) de dos especies bacterianas relacionadas con las ETAs: *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 y *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, las cuales fueron proporcionadas por el Laboratorio Microbiológico BIOEN LAB S.A.C.  
Ver el **anexo N°3 y 4.**

- *Preparación de la suspensión del inóculo;* se seleccionaron 3 a 5 colonias con un asa de siembra "Asa de kohl" y se transfirieron a un tubo con 5 ml de caldo Soya Tripticasa en tubos de ensayo con tapa

rosca. Se incubo a 35°+/-1°C hasta alcanzar la turbidez 0.5 de la escala de Mac. Farland, obteniéndose una suspensión que contiene aproximadamente 1.5x10<sup>8</sup> UFC/ml.

- *Inoculación de las placas*; pasado los 15 min al ajuste de turbidez del inóculo, se inoculó la superficie de las placas con Agar Plate Count (APC), mediante el hisopado, estriando en tres direcciones para asegurar la distribución uniforme de ambas bacterias, dejando secar la placa a temperatura ambiente durante 5 minutos<sup>86</sup>.
- *Aplicación de los discos a las placas inoculadas con Listeria monocytogenes ATCC 19111 y Salmonella enteritidis ATCC 173076*; Se esterilizaron los discos de papel filtro (Wathman) N°3 de 6 mm de diámetro en autoclave a (121°C por 15 min), se colocaron cuatro discos en forma equidistante en cada una de las placas con agar Plate Count, impregnados con 5 uL del aceite esencial de **Thymus vulgaris** “tomillo” y 5uL del aceite de **Origanum vulgare** “orégano” para evaluar el sinergismo y para evaluar el efecto antibacteriano de cada aceite se impregnó cada disco con 10 uL del aceite esencial de cada recurso vegetal a concentraciones del 100% y 50%. Para el grupo control se colocó discos de papel filtro embebidos con dimetilsulfoxido (DMSO) sobre la superficie inoculada sobre las bacterias correspondientes.

- *Incubación*; Las placas fueron incubadas por un periodo de 24 horas a una temperatura de 35° +/-1°C. Ver el **anexo N°9**.



**DIAGRAMA N°2: Determinación de la actividad antibacteriana.**

**FUENTE:** Elaboración propia – 2018.

- *Medición de diámetro de la zona de inhibición sobre crecimiento bacteriano*; transcurrido las 24 horas de incubación, cada placa fue examinada y se midió el diámetro de cada zona libre de crecimiento bacteriano

expresada en milímetros alrededor del disco mediante el instrumento vernier<sup>87</sup>.

#### **4.5.6. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS**

Para analizar los resultados se utilizaron estadísticos descriptivos e inferenciales. El análisis se realizó con el programa software IBM SPSS versión 22, en el cual se utilizó un análisis de varianza ANOVA ver **anexo N°10**, para hallar la diferencia significativa entre los aceites esenciales.

El procesamiento de los datos se dio de manera manual y visual mediante la ficha de datos donde se anotó las medidas repetidas de los diámetros de la zona de inhibición. La lectura se efectuó midiendo los halos mediante el vernier (regla milimetrada) alrededor del disco.

## **CAPÍTULO V**

### **PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

#### **4.1. ANÁLISIS DE TABLAS Y GRÁFICOS**

Se determinó el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, para ello la evaluación de los datos obtenidos se analizó mediante el uso de estadísticos descriptivos e inferenciales como la media, desviación estándar y la prueba estadística de ANOVA, las cuales demostraron diferencias estadísticas entre los grupos evaluados y se pueden evidenciar en las siguientes tablas:

**TABLA N°1**

**EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Thymus vulgaris* “TOMILLO” FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS.**

CEPAS	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111					<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076				
Concentración del aceite esencial (%) de tomillo	Halos de inhibición (mm)					Halos de inhibición (mm)				
	n				x̄	n				x̄
	1	2	3	4		1	2	3	4	
100	40	39.8	40	39.6	39.9	40.2	40	39.8	40	40
50	38.2	37.8	38	38.1	38	29	30	29.8	30	29.7

FUENTE: Elaboración propia- 2018

n = número de ensayos microbiológicos.

x̄ = promedio

En la tabla N°1 se observan las medidas de los halos de inhibición (mm) producidos por el aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” a diferentes concentraciones, obtenidos por el enfrentamiento microbiológico frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, obteniéndose que el aceite de tomillo a las concentraciones del 100% y 50% presentan un comportamiento similar, dado que mostraron diámetros de 39.9 a 38 mm halos de inhibición respectivamente frente a *Listeria monocytogenes*, de esta forma se determina que ambas concentraciones producen el mismo efecto antibacteriano sobre *Listeria monocytogenes*, sin embargo al comparar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” sobre *Salmonella enteritidis* muestran una notable diferencia, debido que a la concentración del 100% presentó diámetros de 40 mm y al 50% diámetros de 29.7mm halos de inhibición, por lo tanto se muestra que la mejor concentración es la del 100 % sobre *Salmonella enteritidis*.

**TABLA N°2**

**EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL ACEITE ESENCIAL *Origanum vulgare* “ORÉGANO” FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS.**

CEPAS	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111					<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076				
	Halos de inhibición (mm)					Halos de inhibición (mm)				
	n				$\bar{x}$	n				$\bar{x}$
1	2	3	4	1		2	3	4		
100	40	39.8	40	39.6	39.9	40.2	40	39.8	40	40
50	38.2	37.8	38	38.1	38	29	30	29.8	30	29.7

FUENTE: Elaboración propia- 2018

n = número de ensayos microbiológicos.

$\bar{x}$  = promedio

La tabla N°2 muestra las medidas de los halos de inhibición (mm) producidos por el aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano” a diferentes concentraciones, obtenidos por el enfrentamiento microbiológico frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, obteniéndose que el efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano a las concentraciones del 100% y 50% presentan un comportamiento similar debido que mostraron diámetros de 39.9 mm y 38 mm halos de inhibición respectivamente frente a *Listeria monocytogenes*, de esta forma se observa que a ambas concentraciones presentan el mismo efecto antibacteriano sobre *Listeria monocytogenes*, sin embargo se observa una notable diferencia al evaluar la sensibilidad del aceite de orégano frente a *Salmonella enteritidis*, donde la concentración del 100% y 50% presentaron diámetros de 40 mm y 29.7 mm halos de inhibición respectivamente, mostrando así que existen diferencias significativas al evaluar las concentraciones, siendo la óptima concentración la del 100% frente a *Salmonella enteritidis*.

**TABLA N°3**

**SINERGISMO ANTIBACTERIANO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Thymus vulgaris* “TOMILLO” Y *Origanum vulgare* “ORÉGANO” FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS**

CEPAS	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111					<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076				
	Halos de inhibición (mm)					Halos de inhibición (mm)				
	n				$\bar{x}$	n				$\bar{x}$
1	2	3	4	1		2	3	4		
01:01	40	40	40	39.8	40	30	30	30	30	30

FUENTE: Elaboración propia- 2018

n = número de ensayos microbiológicos.

$\bar{x}$  = promedio

La tabla N°3 muestra los halos de inhibición (mm) producidos por los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” en asociación a la proporción de 1:1 presentaron un promedio de 40 mm de halos de inhibición frente a *Listeria monocytogenes* y 30 mm de halos de inhibición frente a *Salmonella enteritidis*, demostrando que la combinación de ambos aceites esenciales muestran mayor actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes*. Sin embargo no existe un efecto sinérgico debido que no se evidencia potenciación de los aceites esenciales al comparar su actividad antibacteriana que presentaron por separado.

**TABLA N° 4**

**COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Thymus vulgaris* “TOMILLO” Y *Origanum vulgare* “ORÉGANO” FRENTE A MICROORGANISMOS PATÓGENOS.**

CEPAS	<i>Listeria monocytogenes</i>					<i>Salmonella enteritidis</i>				
	Halos de inhibición (mm)					Halos de inhibición (mm)				
	n				$\bar{x}$	n				$\bar{x}$
	1	2	3	4		1	2	3	4	
AE tomillo	40	39.8	40	39.6	39.9	40.2	40	39.8	40	40
AE orégano	40	39.8	40	39.6	39.9	40.2	40	39.8	40	40
Proporción 1:1 (AE tomillo + AE orégano)	40	40	40	39.8	40	30	30	30	30	30

FUENTE: Elaboración propia- 2018

n = número de ensayos microbiológicos.

$\bar{x}$  = promedio

La tabla N°4 muestra la comparación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* “tomillo”, *Origanum vulgare* “orégano” y la asociación entre *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano”; donde la actividad por separada del aceite esencial de tomillo y orégano a la concentración del 100% presentaron un diámetro de 39.9 mm halo de inhibición respectivamente frente a *Listeria monocytogenes* y la asociación de ambos aceites presento un diámetro de 40mm halo de inhibición demostrando que la combinación de estos aceites presentan un comportamiento similar por lo tanto no existe un efecto sinérgico. Así mismo la actividad por separada del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” a la concentración del 100% presentaron diámetros de 40 mm halo de inhibición respectivamente frente a *Salmonella enteritidis* y la asociación de ambos aceites esenciales presento un diámetro de 30 mm de halo de inhibición, de esta forma se observa que los aceites esenciales presentan mejor actividad antibacteriana cuando se evalúan por separado.

## DISCUSIÓN

Los aceites esenciales más importantes y los más estudiados durante este periodo de tiempo son el aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano”, su escasa evaluación de la asociación de ambos recursos hace que la presente investigación sea de interés relacionándolo con el efecto inhibitorio que poseen sobre microorganismos patógenos para el ser humano como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*

Con respecto al efecto antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 100 % de concentración presentó un diámetro de 39.9mm de halo de inhibición frente a *Listeria monocytogenes*, sin embargo en los estudios realizados por **Sánchez I.** , determinó que especias de tomillo (*Thymus*) utilizadas en un producto cárnico fermentado frente a *Listeria monocytogenes* no presentó zona de inhibición, esto puede deberse al tipo de muestra utilizada, también señala que el tomillo (*Thymus*) en rama presenta halos de inhibición de 1mm para *Salmonella* spp, a concentraciones de 10%, 7.5% y 5% y en nuestro trabajo de investigación el aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 100% de concentración tuvo un mejor comportamiento debido que mostró diámetros relevantes de 40 mm halos de inhibición frente a *Salmonella enteritidis*, esto puede deberse a la distintas concentraciones utilizadas. La evaluación del aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano” al 100% de concentración en el enfrentamiento microbiológico frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* se obtuvieron diámetros de 39 a 40 mm de halos de inhibición respectivamente, sin embargo **Sánchez I.** al evaluar el comportamiento del orégano (*Origanum vulgare*) en rama sobre *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. no presentó efecto antibacteriano en ninguno de estos microorganismos estudiados, este resultado puede deberse a la variación de la composición química del orégano debido que el porcentaje de dichos compuestos químicos varían de acuerdo a la zona de cultivo, ubicación geográfica, así

mismo refieren que hay diversos estudios demuestran que la actividad inhibitoria del tomillo es más efectiva si se emplea en aceite esencial y no con el uso de la planta entera, con ello se afirma su observación debido que el presente estudio presentó halos de inhibición que son más relevantes por el uso de los aceites esenciales de los recursos vegetales, a esto le favorece el empleo de mayores concentraciones (100% y 50%) obteniendo mejores resultados para ambas bacterias.

En la investigación realizada por **Morales C.** evaluó el efecto antimicrobiano del aceite esencial del *Thymus vulgaris* “tomillo” sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso ricota en Colombia, el estudio determinó que el aceite esencial de tomillo provoca un efecto biocida, obteniendo diámetros de 11.2mm de halos de inhibición sobre el crecimiento bacteriano de *Listeria monocytogenes* en quesos, utilizando concentraciones de 0.005% hasta 2.4%. A diferencia de los resultados obtenidos en la presente investigación en donde el aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” al 100% de concentración presentó diámetros de 39.9mm de halos de inhibición, sobre el crecimiento bacteriano de *Listeria monocytogenes*, estos resultados nos permiten reconocer que las distintas concentraciones utilizadas son un factor importante en la evaluación de estos recursos vegetales en consecuencia los resultados son relevantes a una mayor concentración (100%), es por ello se obtuvo mayores efectos inhibitorios

La investigación realizada por **Solís C.** evaluó el efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano y tomillo frente a *Salmonella* para determinar el mejor efecto inhibitorio frente a este microorganismo, determinó que el aceite esencial de tomillo a la concentración del 100% presenta una mayor actividad inhibitoria contra *Salmonella* debido que obtuvo un diámetro de 18mm de halo de inhibición, sin embargo en el presente trabajo la evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de tomillo a la concentración del 100% obtuvo mejores efectos inhibitorios frente a *Salmonella enteritidis* presentando diámetros de 40mm de halos de inhibición lo cual evidencia una

mejor actividad antibacteriana, así mismo el aceite esencial del orégano obtuvo diámetros de 10mm de halo de inhibición y en el presente estudio el aceite de *Origanum vulgare* “orégano” presentó diámetros de 40mm de halo de inhibición siendo superior al encontrado por **Solis C.**, esto puede deberse a la composición química, influyendo también el genotipo, los estados de crecimiento, clima y la localización geográfica por la cual fueron extraídos estos recursos vegetales.

La asociación de aceites esenciales es una materia de estudio que genera interés, en donde se destaca que aún no se han realizado investigaciones sobre estos dos recursos naturales, que han sido estudiados durante este periodo de tiempo por separado. El estudio determina que al evaluar dos especies que pertenecen a la misma familia (*Laminaceae*) como el aceite esencial de tomillo y orégano actuando de manera conjunta no producen efectos sinérgicos frente *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, sin embargo al comparar con los estudios ya mencionados, la actividad antibacteriana del tomillo y orégano al ser evaluados por separado tuvo mejores resultados, estos datos se han encontrado y deben ser tomados en cuenta para futuras investigaciones

## CONCLUSIONES

1. Se determinó que no existe efecto sinérgico antibacteriano al asociar los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* "tomillo" y *Origanum vulgare* "orégano" sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. debido que mostraron un efecto semejante a la actividad producida por separado.
2. Se determinó que a mayor concentración (100%) del aceite esencial de *Thymus vulgaris* "tomillo" presenta mayor actividad antibacteriana sobre *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* debido que presentaron diámetros de 40 mm y 39.9mm de halos de inhibición.
3. Se determinó que a mayor concentración (100%) del aceite esencial de *Origanum vulgare* "orégano" presenta mayor actividad antibacteriana sobre *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes* debido que presentó diámetros de 40mm y 39.9mm de halos de inhibición.
4. Se determinó que a la proporción establecida, el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* "tomillo" y *Origanum vulgare* "orégano" en asociación, presentan diámetros de 40mm de halos de inhibición sobre *Listeria monocytogenes* siendo igual a la actividad que presentaron por separado por lo tanto no existe efecto sinérgico, sin embargo sobre *Salmonella enteritidis* presentaron diámetros de 30mm de halos de inhibición demostrando que existe un efecto antagónico debido que el resultado obtenido fue inferior al comparar con la actividad que presentaron los aceites por separado.

## RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios sobre el efecto sinérgico de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “Orégano”, a diversas concentraciones frente a otros microorganismos patógenos de interés.
- Realizar estudios de comparación del efecto sinérgico antibacteriano de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* “Tomillo” y *Origanum vulgare* “Orégano”, frente a diferentes fármacos utilizados para tratar las enfermedades transmitidas por alimentos.
- Realizar estudios Químico Farmacéuticos de los aceites esenciales para la elaboración de formas farmacéuticas, determinar los principios activos mediante cromatografía, y su posible toxicidad en el ser humano.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Núñez K, Kühbacher A, Peraza J, Cossart P, Pizarro J.** Rol de la Tropomiosina y del Adaptador NEDD9 durante la invasión celular de *Listeria monocytogenes*, tecnología en marcha. 2014. vol.2. Ed. tecnología de costa rica.
2. **Moya R, Alvarado P, Vásquez N.** Supervivencia de *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* en agua potable de cuatro distritos de Trujillo (Perú). Rev. Rebiolest. Ed.Egoavil. [Internet]. 2013 [20-08-2017]; Vol. 1, Núm. 2.  
<https://books.google.com.pe/books?isbn=8445817973>
3. **Altamirano N, Romano C, Repetto M, Abadi K, Moreno S.** Bioactividades de compuestos polifenólicos no volátiles aislados de plantas *Lamiaceae* de Argentina. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.[Internet]. 2007 [citado 30-09-2017]; vol. 6, Núm. 6, Pag. 319-320 Universidad de Santiago de Chile Santiago, Chile.
4. **Zamudio M, Arias I, Luna M, Valenzuela A, Segovia E, Villanueva E.** Vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos en el Perú 2007. Bol – Inst. Nac. Salud 2007; 13 (11-12) nov – dic [citado 30-09-2017].
5. **Abreu O, Cuéllar A.** Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. Rev Cubana Plant Med [Internet]. 2008 sep [citado 02-10-2017]; 13(3): Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S102847962008000300009&lng=es.](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962008000300009&lng=es)
6. **Apares R.** Efecto sinérgico antimicrobiano del aceite esencial de *Origanum vulgare* con Amikacina comparado con Amikacina *Escherichia coli*, *In vitro*. Perú - 2016.

7. **Chávez L. Díaz F. Escalante G.** Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli* [Tesis].Lima, Perú; 2009.
8. **Sánchez I, Martínez V.** Determinación de la concentración mínima inhibitoria de las especias en rama, tomillo (*Thymus*), orégano (*Origanum vulgare*) clavo de olor (*Syzygium*) utilizadas en un producto cárnico madurado fermentado frente a microorganismos criterio microbiológico según la norma NTC 1325". Colombia 2017.
9. **Morales A.** Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial del Tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre la contaminación de *Listeria monocytogenes* en queso Ricotta [Tesis].Universidad Nacional de Colombia; 2015.
- 10.**Solís P.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgares L.*) y tomillo (*Thymus vulgaris L.*) como potenciales bioconservadores en carne de pollo. [Tesis]. Escuela superior politécnica de Chimborazo- Ecuador; 2011.
- 11.**Martínez P, Guarnizo A.** Experimentos de química orgánica. Con enfoque en ciencias de la vida [Internet].2da Ed. Colombia: Ed Elizcom; 2010. [09-08-2017].
- 12.**Tisserand R.** El arte de la aromaterapia. Aceites esenciales y masajes para la cura del cuerpo y la mente [Internet]. 1ra Ed. Barcelona: Ed. Paidos Iberica, S.A. 2007 [14-08-2017]. Pag. 20.
- 13.**Izco J, Barrero E, Brugués M. Fernandez F.** Botánica, La presencia de compuestos químicos. 2a Ed. Madrid: Ed. Mc Graw Hill interamericana; 2009.Pag 169.
- 14.**Martínez A.** Aceites Esenciales [internet]. Medellín: Universidad de Antioquía, 2003 [29-10-2015; 22-08-2017].

[https://www.researchgate.net/publication/283308669\\_Aceites\\_esencial\\_es.](https://www.researchgate.net/publication/283308669_Aceites_esencial_es)

15. Introducción a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Sistema de Bibliotecas. SENA <http://biblioteca.sena.edu.co/coleccion/1.html>
16. **Arraiza P.** Uso industrial de plantas aromáticas y medicinales. Open course ware. Universidad politécnica de Madrid. Tema N°12. [ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas...y.../tema12.pdf](http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas...y.../tema12.pdf)
17. **Romero M.** Plantas Aromáticas. Tratado de aromaterapia científica buenos aires. Ed. Kier S.A.1 Ed.; 2011.
18. **Peredo H, Palou E, Lopez A.** Aceites esenciales: Métodos de extracción. Temas selectos de ingeniería de alimentos, México. Vol. 3 N°1; 2009. Pag. 24-32.
19. **Damián P, Damian K.** Aromaterapia: El olor y la psique: Utilización de los aceites esenciales 1ra ed. Ed. Lasser Press Mexicana S.A. México, 2012
20. **García R, Palou E.** Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos [Internet]. 2008 [11-08-2017]. Vol 2(2): pág. 41-45. [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2\(2\)Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No2-Vol-2/TSIA-2(2)Garc%C3%ADa-Garcia-et-al-2008a.pdf)
21. **Reyes F, Palou E, Lopez A.** Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. Temas selectos de Ingeniería de alimentos [Internet].2012 [07-12-2017]. Vol 6(1). Pág. 29-39
22. **García J. Picazo J.** Microbiología Medica: clínica. Buenos Aires. Ed. Harcourt brace. vol. 2.
23. **Palmero M.** Interacciones Farmacológicas. 2do grado- enfermería curso 2011-2012.
24. **Ortuño M.** Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. España. 1ª ed. Ed. Aiyana; 2006. Pag 21.

- 25. Maguna F, Romero A, Garro O, Okulik N.** Actividad antimicrobiana de un grupo de terpenoides. Argentina. Universidad nacional del norte este- comunicaciones científicas y tecnología.2006.  
<http://200.45.54.140/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-057.pdf>
- 26. Sharapin N.** Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Colombia. 1ra ed. Ed. Roberto Pinzon; S. Convenio Andrés Bello; 2000.
- 27.** Curso internacional de agroecología y producción de plantas medicinales. [10-08-2011]. Instituto de Fitoterapia Americano. 1ra ed. Perú.
- 28. Cebrián J.** Diccionario de Plantas Medicinales. Barcelona: Ed. Rba Libros SA. 1ra ed; 2012.
- 29. Montalbán L.** Efecto de dos concentraciones de medio base Murashige & Skoog y cuatro concentraciones de citokinina en el cultivo in vitro del tomillo (*Thymus vulgaris L.*). [Tesis]. Universidad nacional Jorge Basadre Grohmann- Tacna; 2009.
- 30. Cano A.** Determinación taxonómica de *Thymus vulgaris L.* C. N° 223-USM. Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú; 2017.
- 31. Gonzales A.** Recetario de Hierbas y Plantas Medicinales. Perú: Ed. Euromexico S.A. de C.V. 2000.
- 32. Burri A, Piarpuezán O.** Evaluación agronómica de tres densidades de siembra en el cultivo de tomillo *Thymus vulgaris*, mediante la aplicación de tres fertilizantes orgánicos, con fines de exportación, en la parroquia de Yaruqui, provincia de Pichincha. [Tesis]. Universidad Estatal de Bolívar; Ecuador; 2013.
- 33. Villar M. Villavicencio O.** Manual de Fitoterapia. Perú: 1ª Ed. Editorial Carlos Enrique Paz Soldan; 2001. Organización Panamericana de la Salud.

34. **Vela A.** Manual de Plantas Medicinales. 1ª Ed. Perú: Ed. Cooperación unión Europea; 2000.
35. **Bruneton J.** Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales. 2ª Ed. España: Ed. Acribía SA; 2001. Pag 481.
36. **Cañigueral S, Vanaclocha B.** Usos terapéuticos del tomillo. Unidad de farmacología I Farmacognosia. Rev. Fitoterapia, Barcelona; 2000. Vol. 1 Pág. 5-13.
37. **Lagos E.** Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del Aceite Esencial *Thymus vulgaris L.* "Tomillo" frente a *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 causante de gingivitis. [Tesis]. Universidad Nacional de Jorge Basadre Grohmann-Tacna; 2012.
38. **Pahlow M.** El Gran Libro de las Plantas Medicinales. 1ª Ed. España: Ed. Everest, S.A; 2000.
39. **Segura S. Torres J.** Historia de las plantas en el mundo antiguo [Internet]. 1ª. Universidad de Deusto. Madrid: Ed. Bilbao; 2009 [10-08-2017]. Consejo superior de investigaciones científicas. Pag 348.
40. **Carretero M, Ortega T.** Plantas medicinales con actividad expectorante: tomillos; 2013.
41. Ficha técnica cultivo del orégano. INDAR-PERU. Condiciones ecológicas para la producción de orégano. Tecnologías desafiando la pobreza.
42. **Cano A.** Determinación taxonómica de *Origanum vulgare L.* C. N° 259-USM. Museo de Historia Natural. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú; 2017.
43. **Toledo R.** Evaluación de rendimientos y niveles de nutrientes al follaje del orégano (*Origanum vulgare L.*) bajo fertilización orgánica en casa sombra. [Internet]. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" México; 2013.
44. **Flores L.** Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) aplicado en el pan molde en

microencapsulado y pulverizado. [Internet]. Universidad Peruana Unión; 2017.

45. **Muñoz L.** Plantas Medicinales Españolas: *Origanum vulgare L.* (Lamiaceae) (Orégano). Acta botánica Malacitana. [Internet]. 2002 [18-10-2017]; Vol 27(1): Pág. 274.
46. **Boudassou B.** Plantas aromáticas para la cocina y la salud: Cómo cultivarlas y conservarlas en casa. Ed. Grijalbo. 2015.
47. **Gómez A, López A.** Potencial antimicrobiano de los aceites de *origanum vulgare* (orégano) y *cinnamomum zeylanicum* (canela). Temas selectos de ingeniería de alimentos [Internet]. 2009 [10-09-2017]; vol 3(1): Pag 33-45.
48. **Arcila C, Loarca G, Lecona S, González E.** El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Programa de Posgrado en alimentos del Centro de la Republica - Universidad Autónoma Querétaro. México; 2010.
49. **Acevedo D, Navarro M, Monroy L.** Composición Química del Aceite Esencial de Hojas de Orégano (*Origanum vulgare*). Programa de ingeniería de Alimentos [Internet]. [30-03-2013; 15-10-2017]; vol. 24(4).Pag 43-48.  
<http://www.scielo.cl/pdf/infotec/v24n4/art05.pdf>
50. **Yábar A, Baca L.** Efecto antibacteriano in vitro de los aceites esenciales de: *foeniculum vulgare* (hinojo), *cimbopogon citrus* (hierba luisa), *origanum vulgare* (orégano), *citrus aurantifolia swingle* (limon) y *citrus sinensis* (naranja), frente a cepas estandarizadas de *streptococcus mutans*. [tesis]. Universidad Andina del Cusco. Perú; 2016.
51. **Fonnegra R, Jiménez S.** Plantas medicinales aprobadas en Colombia [Internet]. 2ª ed. Colombia: Ed Universidad de Antioquia; 2007. [12-09-2017]. <https://books.google.com.pe/books?isbn=9586559998>
52. **Sanchez O, Medellin R, Aldama A, et al.** Método de evaluación del riesgo de extinción de las especies silvestres en México. Universidad

nacional autónoma de México. NOM-059-SEMARNAT-2001.[www.semarnat.gob.mx](http://www.semarnat.gob.mx)

- 53. Condori J.** Efecto del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) como conservante en la carne de cuy (*Carvia pcellus*). [Tesis] Universidad Nacional del Altiplano Puno-Perú 2011.
- 54. Requena A.** Tríadas. Nuevas Lecturas en Ciencia y Tecnología, España. Ed. Gesbiblo S.L.; 2008. Pág. 16.
- 55. Fuselli R, García de la Rosa B, Gende B, Eguaras J, Fritz R.** Inhibición de *Paenibacillus larvae* empleando una mezcla de aceites esenciales y timol. Rev. argent. microbiol. [Internet]. 2006 Abr [citado 2017 Dic 05]; 38( 2 ): 89-92. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412006000200010&lng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412006000200010&lng=es).
- 56. Maguna F, Romero A, Garro O, Okulik, N.** Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas en Internet. Argentina: Facultad de Agroindustrias. [Internet]. 2006. Abr [citado 2017 Dic 05]: 45-54. Disponible en: <http://200.45.54.140/unnevieja/Web/cyt/cyt2006/08-Exactas/2006-E-057.pdf>
- 57. Muñoz, A.** Estudio de especies aromáticas con alto contenido de timol, carvacrol, trans-anetol o estragol y empleo de fenoles y sus derivados en la síntesis 2,5-dihidro-1-benzoxepinas y evaluación de actividad biológica.[Tesis doctoral]. Universidad Industrial de Santander; 2010.
- 58. Oviedo L.** Biotransformación de los sustratos timol y carvacrol mediante el hongo fitopatógeno *Colletotrichum acutatum* [Internet]. Universidad Nacional de Colombia; 2014.
- 59. Otín J.** Estudio de la difusión del carvacrol y el eugenol desde películas de proteína de suero lácteo a diferentes simulantes alimentarios [Internet]. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra; 2011.

- 60. Quintanilla J.** Efecto antibacteriano del carvacrol (aceite de orégano) sobre *Candida albicans* [Internet]. Rev. De Investigación de la Universidad Norbert Wiener., 2016, N°5.
- 61. Soria S, Soria S.** Determinación del estado sanitario de las plantas y suelo. España: 1<sup>ra</sup>ed. Ed. Paraninfo; 2012. Pág. 11.
- 62. Romero R.** Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. México: 3ra Ed. Editorial Médica Panamericana; 2007. Pag. 453- 593.
- 63. Murray P, Rostenthal K, Pfaller M.** Microbiología Médica. España: 7<sup>a</sup> ed. Ed. El Sevier; 2014. Pag. 216(19); 264(66).
- 64. Noriega M, Ibáñez S, González P, Yamamoto M, et al.** *Listeria monocytogenes*: Informe de un aumento de casos en mujeres embarazadas y revisión de la literatura. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2008 Oct [citado 2017 Oct 27]; 25( 5 ): 342-349. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182008000500004>
- 65.** Peligros biológicos, Inocuidad de alimentos, Control sanitario, HACCP. Organización Panamericana de la Salud [Internet]. 2016. [10-10-17]. Disponible en: [www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article...](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article...)
- 66. Brooks G, Carroll K, Butol J, Morse S, Mietznen T.** Microbiología Médica. México: 26<sup>a</sup> Ed. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana Editores; 2014. Pag. 192- 238
- 67. Vera A, González G, Domínguez M, Bello H.** Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2013 Ago [citado 2017 Sep 2]; 30( 4 ): 407-416. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182013000400010&lng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000400010&lng=es)
- 68. Patrick M, Adcock P, Gómez T.** Emergentes infecciosos. *Salmonella enteritidis*, Estados Unidos. Biblioteca Nacional de Medicina de los

Estados Unidos Institutos Nacionales de Salud [Internet]. 2004 [jun-2004; 20-09-2017]; vol 10(1) : [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

- 69. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P.** Actividad antimicrobiana del aceite de albahaca (*Ocimum basilicum*) contra *Salmonella enteritidis* in vitro y en alimentos. Biociencia, biotecnología y bioquímica [Internet]. 2010 [14-08-2017]; 74 (6), 1200-1204. [link.springer.com/content/pdf/10.../978-94-007-3926-0\\_5.pdf](http://link.springer.com/content/pdf/10.../978-94-007-3926-0_5.pdf)
- 70. Hilvay L.** Efecto de los aceites esenciales de limón (*Citrus limon*), albahaca (*Ocimum basilicum L.*) y orégano (*Origanum vulgare*), en la conservación de la carne de cuy (*Cavia porcellus*) [Tesis]. Ecuador; 2015. <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/11978>.
- 71. Adelantado C, Arosemena L, Calvo A, et al.** *Salmonella*, de actualidad desde siempre. Real escuela de avicultura. Ed. Lab. Calier. [Internet]. 2013 [20-08-2017]; Pág.10. Disponible en <https://books.google.com.pe/books?isbn=8492097876>
- 72. Gonzalez J, Pereira N, Soto Z, Hernández E, Villarreal J.** Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. Revista Salud Uninorte [Internet]. 2014 [Jan./Apr. 2014;21-09-2017]; Vol.30(1). <http://www.scielo.org.co>
- 73. Sacsquispe R, Velásquez J,** Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002. Ed. Leonid Lecca García.
- 74. Ramirez L, Marin D,** Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica Año XV, N°42, Agosto 2009. Universidad Tecnología de Pereira. ISSN 0122-1701.[08-06-2009; 12-07-2009].
- 75. Taroco R, Seija V, Vignoli R.** Métodos de estudio de la sensibilidad a los antibiótica. Temas de bacteriología y virología médica. pág. 668.
- 76. Zamudio L, Meza A, Bailón H, Martínez J, Campos J.** Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por

alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública [Internet]. 2011 Mar [citado 2017 Dic 06] ; 28( 1 ): 128-135. **Disponible en:** [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342011000100020&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342011000100020&lng=es).

**77. Rivera M, Rodríguez C, López J.** Fecal contamination in green vegetables that are sold in markets of Cajamarca city, Peru. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública [Internet]. 2009 Ene [citado 2017 Dic 06] ; 26( 1 ): 45-48. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1726-46342009000100009&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342009000100009&lng=es).

**78. Díaz M, Chávez M, Elmo S.** *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco como vehículo transmisor de Listeriosis humana en la provincia de Trujillo, Perú. Rev. Ciencia y tecnología. Universidad Nacional de Trujillo.[Internet].2013 [citado 2017 Dic 06]; Vol 9 N°2.Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/PGM/article/view/268>

**79. OMS (2016).** Inocuidad de Alimentos - Control Sanitario - HACCP, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <http://www.paho.org/hq/index>.

**80. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A.** Diagnostico microbiológico. 12<sup>va</sup>ed. Madrid: Ed. Médica Panamericana; 2007. Pág. 194.

**81. Cecchini T, Ticli B.** El libro de las hierbas medicinales. 1<sup>a</sup> ed. Paris: Editorial de Vecchi; 2016. <https://books.google.com.pe/books?isbn=1683251393>

**82. Ocampo R, Ríos L, Betancur L, Ocampo D.** Curso práctico de química orgánica. Enfocado a biología y alimentos. 1<sup>a</sup> Ed. Colombia: Ed. Universidad de caldas; 2008. Pag. 35.

**83. López P.** Química orgánica. [Internet].2da Ed. Colombia: Ed Elizcom; 2010 2009 [20-08-2017].

**84.** <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/tripteinasoyagar.htm>

**85.** <http://www.britanialab.com/productos/b02112%20rev%2001-recuento%20en%20placas%20agar.pdf>

**86. Gamazo C, Sánchez S, Camacho A.** Microbiología basada en la experimentación [Internet]. 1ra Ed. España: Ed Elsevier; 2013 [01-09-2017].

**87. Zaragoza R.** Microbiología aplicada al paciente crítico. 1ª ed. Madrid: Ed. Médica Panamericana; 2007.

# **ANEXOS**

## ANEXO N°1

### FICHA DE EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

HALOS DE INHIBICIÓN BACTERIANA (diámetro mm)	n°	ACEITES ESENCIALES				
		TOMILLO		ORÉGANO		TOMILLO + ORÉGANO
		100%	50%	100%	50%	01:01
		1°				
2°						
3°						
4°						
$\bar{x}$						

**En donde:**

**n°:** número de repeticiones.

**$\bar{x}$ :** promedio

## ANEXO N°2

### CONSTANCIA DE LOS ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS



# BIOEN LAB S.A.C.

Pág. 1 de 4

### ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS INFORME N° 1480-2017

#### 1. IDENTIFICACIÓN DEL SOLICITANTE

Cliente: Analí Daibby Flores Ale

#### 2. IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

Ingrediente activo: Aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo)  
Aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano)  
Diluyente: Dimetil sulfoxido (DMSO).  
Cantidad recibida: 02 frascos de vidrio x 05 mL cada uno  
Cepas utilizadas para enfrentamiento:  
*Listeria monocytogenes* ATCC 19111.  
*Salmonella enterica* sv *enteritidis* ATCC 13076  
Fecha de análisis: 09 de noviembre del 2017  
Fecha de reporte: 11 de noviembre del 2017

#### 3. MÉTODO DE ANÁLISIS:

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

3.1 Medio de cultivo: Agar Plate Count (APC).  
3.2 Inóculo: 0,5 Mc Farland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL)  
3.3 Discos: Papel filtro Whatman N°3, de 6 mm de diámetro.  
3.4 Repeticiones: Cuatro.  
3.3 Tiempo de incubación:  $24 \pm 2$  horas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ , en aerobiosis.

#### 4. DATOS DEL ENSAYO

4.1. Concentraciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo). Según protocolo recibido, volumen final 1000  $\mu\text{L}$ .

CONCENTRACION (%)	ACEITE ( $\mu\text{L}$ )	DILUYENTE ( $\mu\text{L}$ )
100	1000	0
50	500	500

  
Bigo. Néji Azabache V.  
C.B.P 4001



# BIOEN LAB S.A.C.

Pág. 2 de 4

4.2. Concentraciones del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano). Según protocolo recibido, volumen final 1000 µL.

CONCENTRACION (%)	ACEITE (µL)	DILUYENTE (µL)
100	1000	0
50	500	500

4.3. Concentraciones del aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo) + *Origanum vulgare* (orégano). Según protocolo recibido, volumen final 1000 µL.

CONCENTRACION (%)	ACEITE ESENCIAL DE <i>Thymus vulgaris</i> (tomillo) (µL)	ACEITE ESENCIAL DE <i>Origanum vulgare</i> (orégano) (µL)
50	500	500

## 5. CONTROLES:

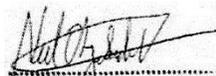
Muestra	Medio de cultivo	Resultado
Discos con DMSO	APC + <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	Negativo
Discos con DMSO	APC + <i>Salmonella enterica sv enteritidis</i> ATCC 13076	Negativo
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	APC	Crecimiento
<i>Salmonella enterica sv enteritidis</i> ATCC 13076	APC	Crecimiento

## 6. RESULTADOS

6.1. Evaluación microbiológica *in vitro* de aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo). Método difusión en agar por discos. Halos de inhibición en milímetros (mm).

<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111 n	100%	50%
1	40,0	38,2
2	39,8	37,8
3	40,1	37,9
4	39,6	38,1

n= número de repeticiones.

  
Bigo. Néji Azabache V.  
C.B.P 4001

Av. Guardia Civil 1041. Los Inkas E-302. Santiago de Surco. Tf: 257-4392. E-mail: [neilazabache@gmail.com](mailto:neilazabache@gmail.com)  
Claro-RPC: 987-112773



# BIOEN LAB S.A.C.

Pág. 3 de 4

<i>Salmonella enterica sv enteritidis ATCC 13076</i> n	100%	50%
1	40,2	29,0
2	40,1	30,0
3	39,8	29,8
4	39,9	30,0

n= número de repeticiones.

**Método utilizado:** Bauer y col. Modificado.

## 6.2. Evaluación microbiológica *in vitro* de aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano). Método difusión en agar por discos. Halos de inhibición en milímetros (mm).

<i>Listeria monocytogenes ATCC 19111</i> n	100%	50%
1	40,0	38,2
2	39,8	37,8
3	40,1	37,9
4	39,6	38,1

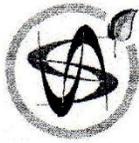
n= número de repeticiones.

<i>Salmonella entérica sv enteritidis ATCC 13076</i> n	100%	50%
1	40,2	29,0
2	40,1	30,0
3	39,8	29,8
4	39,9	30,0

n= número de repeticiones.

**Método utilizado:** Bauer y col. Modificado.

  
.....  
**Bigo. Neji Azabache V.**  
C.B.P 4001



# BIOEN LAB S.A.C.

Pág. 4 de 4

**6.3. Evaluación microbiológica *in vitro* de aceite esencial de *Thymus vulgaris* (tomillo) 50% + *Origanum vulgare* (orégano) 50%. Método difusión en agar por discos. Halos de inhibición en milímetros (mm).**

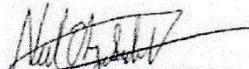
<b><i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111</b>	<b>50 + 50%</b>
n	
1	40,0
2	40,0
3	40,1
4	39,8

n= número de repeticiones.

<b><i>Salmonella enterica</i> sv <i>enteritidis</i> ATCC 13076</b>	<b>50% + 50%</b>
n	
1	30,0
2	29,8
3	30,0
4	30,2

n= número de repeticiones.

**Método utilizado:** Bauer y col. Modificado.

  
Bigo. Neil Azabache V.  
C.B.P 4001

ANEXO N°3

CERTIFICADO DE CALIDAD CEPA *Listeria monocytogenes* ATCC 19111



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p><b>Specifications</b>  <b>Microorganism Name:</b> <i>Listeria monocytogenes</i> (serotype 1)  <b>Catalog Number:</b> 0277  <b>Lot Number:</b> 277-55  <b>Reference Number:</b> ATCC® 19111™  <b>Purity:</b> &lt; 0.1% Total Pellet CFU  <b>Recovery:</b> &gt; 1000 CFUs per Pellet  <b>Passage from Reference:</b> 2</p>	<p><b>Expiration Date:</b> 2018/2/28  <b>Release Information:</b>  <b>Quality Control Technologist:</b> Tanner E Rothstein  <b>Release Date:</b> 2016/5/2</p>
<b>Performance</b>	
<p><b>Macroscopic Features:</b>                  Medium, circular, convex, entire to slightly erose edge, pale white, translucent, beta hemolytic; with aging of culture, some more intense white colonies with smaller zone of beta hemolysis present</p> <p><b>Microscopic Features:</b>                  Regular, short, gram positive rods with rounded ends</p> <p><b>ID System:</b> Vitek GP (1)                  See attached ID System results document.</p>	<p><b>Medium:</b>                  SBAP</p> <p><b>Method:</b>                  Gram Stain (1)</p> <p><b>Other Features/ Challenges: Results</b>                  (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive                  (1) Purple Broth W/Rhamnose: positive                  (1) Purple Broth W/Xylose: negative</p> <div style="text-align: center;">                       Brad Goskowicz, President                      AUTHORIZED SIGNATURE                 </div>
<p><small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="381 1291 511 1344"> </div> <div data-bbox="592 1270 1339 1312"> <p><small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small></p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="381 1354 544 1480"> </div> <div data-bbox="592 1354 885 1375"> <p><small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small></p> </div> </div>	

## ANEXO N°4

### CERTIFICADO DE CALIDAD CEPA *Salmonella enteritidis* ATCC 13076

**Thermo**  
SCIENTIFIC

#### Certificate of Quality

**Product Name:** S. enterica sv Enteritidis ATCC13076 PK/5  
**Lot Number:** 956811

**Product Number:** R4608200  
**Expiration Date:** 2018-05-16  
(YYYY-MM-DD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality Systems Regulation, 21 CFR Part 820. Representative samples were tested per Remel Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

**Purity:**

Standardized aliquots of the rehydrated product are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

**Viability And Quantification:**

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated as the current preserved state.

**Macroscopic And Microscopic Morphology:**

Colony morphology is consistent with documented referenced description. Traditional staining is performed.

**Biochemical Analysis:**

Organism exhibits characteristic biochemical and/or enzymatic reactions. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/loop: >10(4)  
Gram Reaction: Gram Negative Rod

Passage: 3  
Biochemical Profile: Vitek 2C GN & Antisera Grouping

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop  
pH: N/A

Signed

*Aime Williams*

Quality Assurance Supervisor

## ANEXO N°5

### DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE *Thymus vulgaris* “Tomillo”



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



“Año del Buen Servicio al Ciudadano”

#### CONSTANCIA N°223-USM-2017

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

La muestra vegetal (tallo con hojas) recibida de **Anali Daibby FLORES ALE**, estudiante de la Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud- Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad ALAS PERUANAS; ha sido estudiada y clasificada como: *Thymus vulgaris* L. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION:** MAGNOLIOPHYTA

**CLASE:** MAGNOLIOPSIDA

**SUBCLASE:** ASTERIDAE

**ORDEN:** LAMIALES

**FAMILIA:** LAMIACEAE

**GENERO:** *Thymus*

**ESPECIE:** *Thymus vulgaris* L.

Nombre vulgar: “Tomillo”

Determinado por Mag. Asunción A. Cano Echevarría

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 10 de octubre de 2017

  
Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



ACE/adb

## ANEXO N°6

### DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE *Origanum vulgare* “Orégano”



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

#### CONSTANCIA N° 259-USM-2017

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

La muestra vegetal (rama estéril), recibida de **Anali Daibby FLORES ALE**, estudiante de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad ALAS PERUANAS; ha sido estudiada y clasificada como: ***Origanum vulgare* L.**; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1981):

**DIVISION:** MAGNOLIOPHYTA

**CLASE:** MAGNOLIOPSIDA

**SUB CLASE:** ASTERIDAE

**ORDEN:** LAMIALES

**FAMILIA:** LAMIACEAE

**GENERO:** *Origanum*

**ESPECIE:** *Origanum vulgare* L.

Nombre vulgar: "orégano"

Determinado por: Mg. Asunción A. Cano Echevarría.

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

Lima, 08 de noviembre de 2017

  
Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



443/008

ANEXO N°7

RECOLECCIÓN DE LOS RECURSOS VEGETALES



a.



b.



c.



d.

a, b: *Origanum vulgare* “orégano”

c, d: *Thymus vulgare* “tomillo”

## ANEXO N°8

### EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES POR EL MÉTODO DE DESTILACIÓN POR ARRASTRE A VAPOR



a.



b.



c.



d.

**a y b:** tomillo y orégano en el alambique para su destilación.

**c y d:** tomillo y orégano restante después de la destilación.



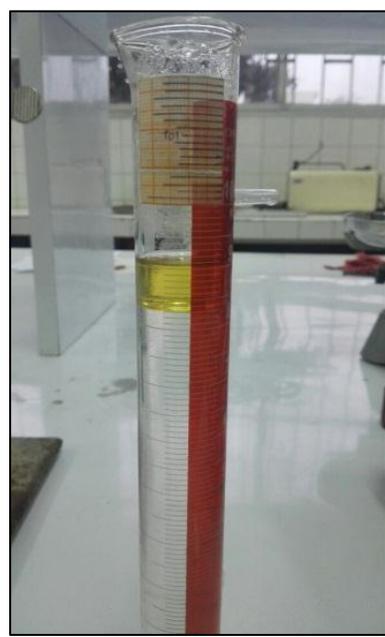
**e.**



**f.**



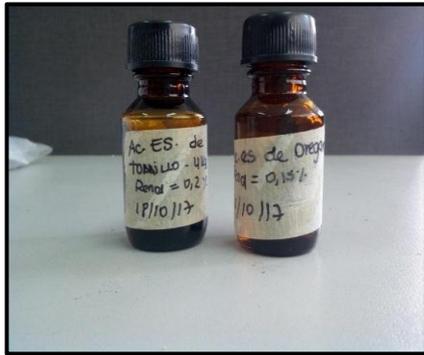
**g.**



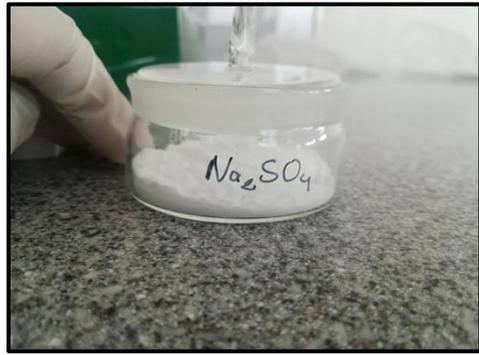
**h.**

**e y f:** Recolección de los aceites esenciales en la probeta de vidrio.

**g y h:** Aceites esenciales en la pera de decantación.



i.



j.



k.



l.

i: envase y almacenamiento de los aceites esenciales.

j: sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ).

k y l: deshidratación de los aceites esenciales.

## ANEXO N° 9

### ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO



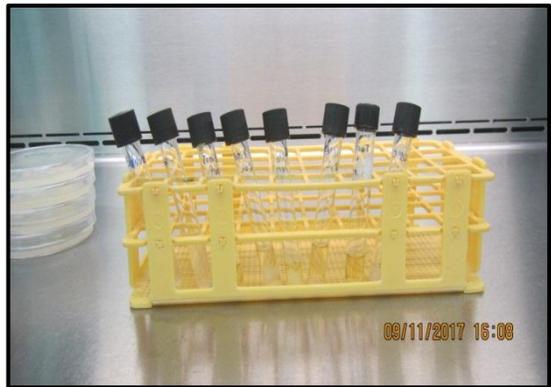
b.



b.



c .



d.

a: cepas estandarizadas ATCC.

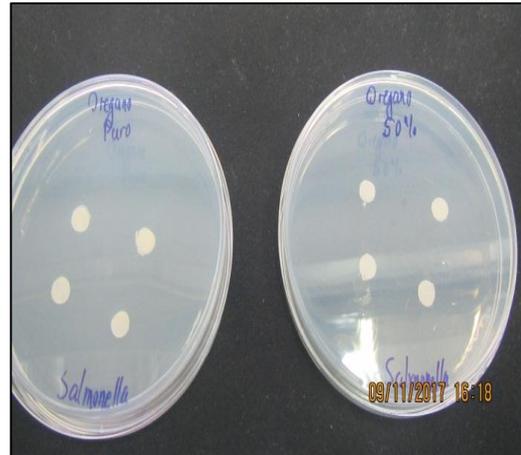
b: medio adecuado para el desarrollo del experimento.

c: inóculo comparado con la escala de Mac Farland.

d: muestras de aceites esenciales.



e.



f.



g



h

d: medio de cultivos con *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.

f: discos de papel filtro embebidos con aceite esencial.

g: incubación 24 horas.

h: halos de inhibición.

## ANEXO N°10

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

**Unidireccional**

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Halos de inhibición en milímetros (mm) a la cc. de 100%	Entre grupos	329,744	5	65,949	1906,952	,000
	Dentro de grupos	,623	18	,035		
	Total	330,366	23			
Halos de inhibición en milímetros (mm) a la cc. de 50%	Entre grupos	275,560	3	91,853	706,564	,000
	Dentro de grupos	1,560	12	,130		
	Total	277,120	15			

**Subconjuntos homogéneos**

Halos de inhibición en milímetros (mm) a la cc. de 100%

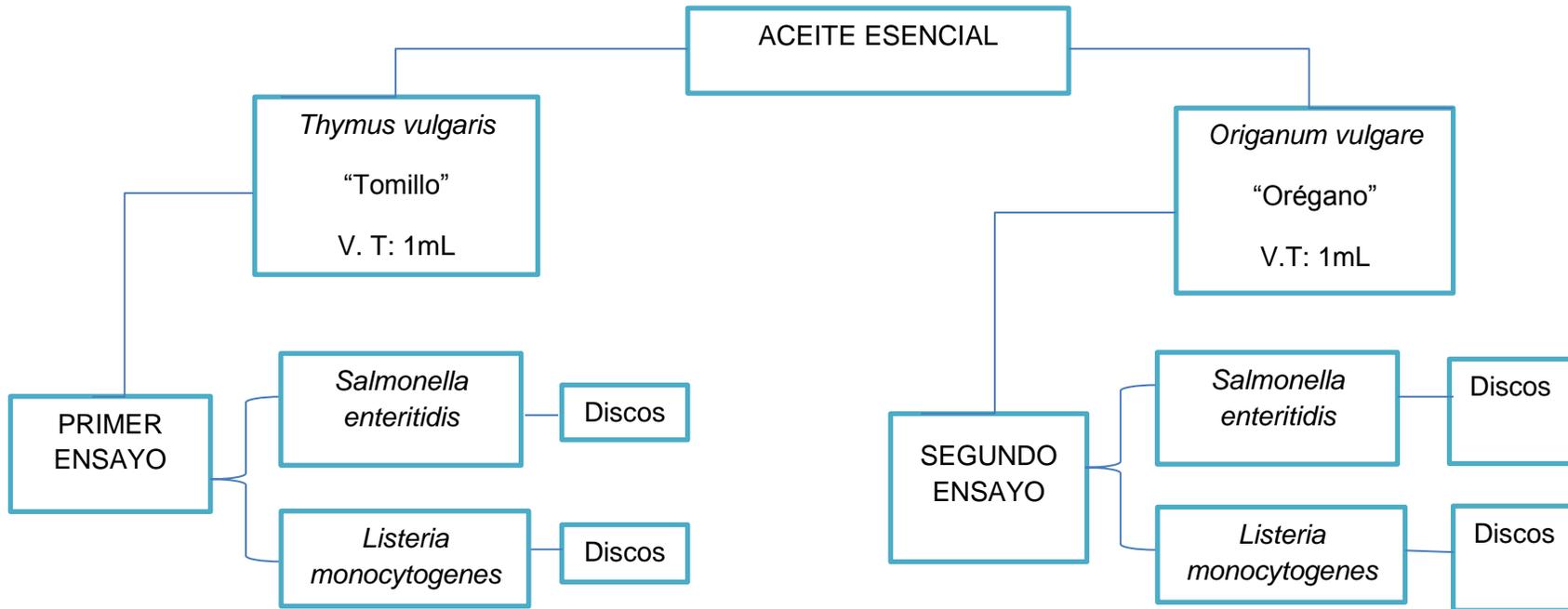
HSD Tukey<sup>a</sup>

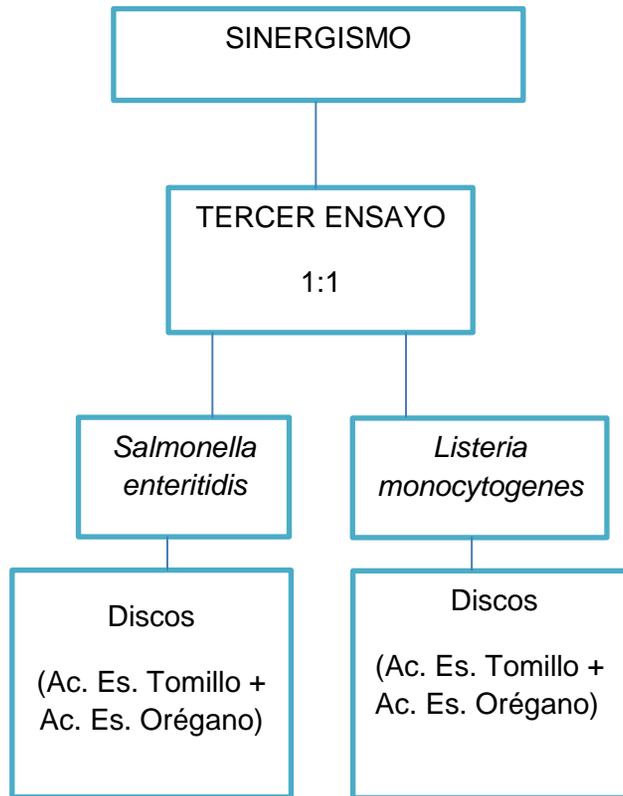
Evaluación Microbiológica in vitro de aceite esencial	N	Subconjunto para alfa = 0,05	
		1	2
Thymus vulgaris(Tomillo) 50% + Origanum vulgare(orégano) 50% en Salmonella enterica sv enteritidis ATCC 13076	4	30,000	
Thymus vulgaris(Tomillo) en Listeria monocytogenes ATCC 19111	4		39,875
Origanum vulgare(orégano) en Listeria monocytogenes ATCC 19111	4		39,875
Thymus vulgaris(Tomillo) 50% + Origanum vulgare(orégano) 50% en Listeria monocytogenes ATCC 19111	4		39,975
Thymus vulgaris(Tomillo) en Salmonella enterica sv enteritidis ATCC 13076	4		40,000
Origanum vulgare(orégano) en Salmonella enterica sv enteritidis ATCC 13076	4		40,000
Sig.		1,000	,927

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

## ANEXO N°11

### PROTOCOLO PARTE EXPERIMENTAL





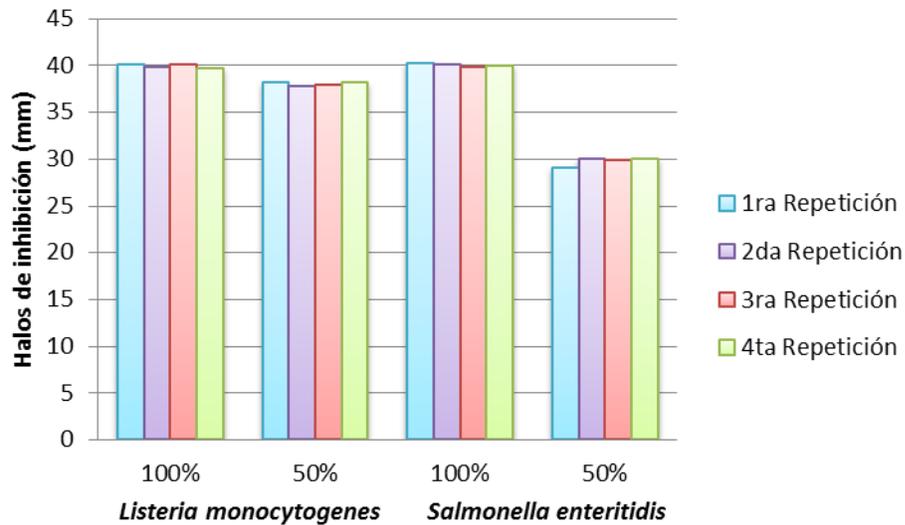
## ANEXO N°12

### MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	MÉTODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	VARIABLES	POBLACIÓN Y MUESTRA
¿Cuál es el efecto sinérgico del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> "Tomillo" y <i>Origanum vulgare</i> "Orégano" sobre la actividad antibacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> ?	Determinar el efecto sinérgico del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> "Tomillo" y <i>Origanum vulgare</i> "Orégano" sobre la actividad antibacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> .	El aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> "Tomillo" y <i>Origanum vulgare</i> "Orégano" poseen efecto sinérgico sobre su actividad antibacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> .	<b>TIPO DE INVESTIGACIÓN:</b> Analítico Transversal Prospectivo	<b>MÉTODO DE INVESTIGACIÓN:</b> Deductivo	<b>VARIABLE INDEPENDIENTE:</b> Concentración de los aceites esenciales	<b>POBLACIÓN:</b> Las hojas y tallos de <i>Thymus vulgaris</i> "Tomillo" y <i>Origanum vulgare</i> "Orégano".
<b>PROBLEMAS ESPECÍFICOS:</b> ¿Cuál es el efecto del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> "Tomillo" sobre la actividad antibacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> ?	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b> Determinar el efecto del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> "Tomillo" sobre la actividad antibacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> .	<b>HIPÓTESIS ESPECIFICAS:</b> El aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> "Tomillo" presenta actividad antibacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> .	<b>NIVEL DE INVESTIGACIÓN:</b> Explicativo	<b>DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:</b> Experimental	<b>INDICADORES:</b> 100% 50%	<b>MUESTRA:</b> 8 ml de aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> "tomillo" y 5 ml de aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> "Orégano".
¿Cuál es el efecto del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> "Orégano" sobre la actividad antibacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> ?	Determinar el efecto del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> "Orégano" sobre la actividad antibacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> .	El aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> "Orégano" presenta actividad antibacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> .			<b>VARIABLE DEPENDIENTE:</b> Actividad antimicrobiana	
¿Cuál es el efecto sinérgico a la proporción 1:1 del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> "Tomillo" y <i>Origanum vulgare</i> "Orégano" sobre la actividad antibacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> ?	Determinar el efecto sinérgico a la proporción 1:1 del aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> "Tomillo" y <i>Origanum vulgare</i> "Orégano" sobre la actividad antibacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> .	El aceite esencial de <i>Thymus vulgaris</i> "Tomillo" y <i>Origanum vulgare</i> "Orégano" a la proporción 1:1 presenta efecto sinérgico sobre la actividad antibacteriana frente a <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella enteritidis</i> .			<b>INDICADORES:</b> Halos de inhibición (mm)	

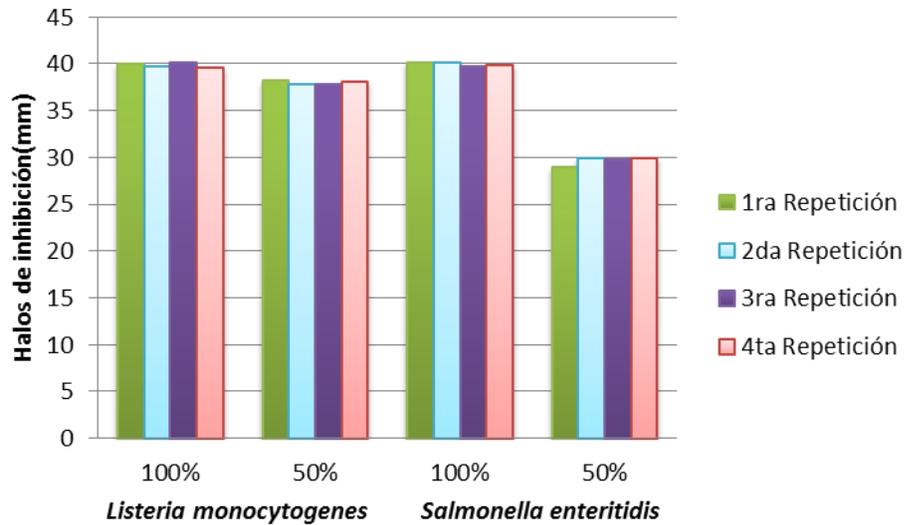
## ANEXO N°13

**GRAFICO N°1: Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” sobre el crecimiento bacteriano de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.**



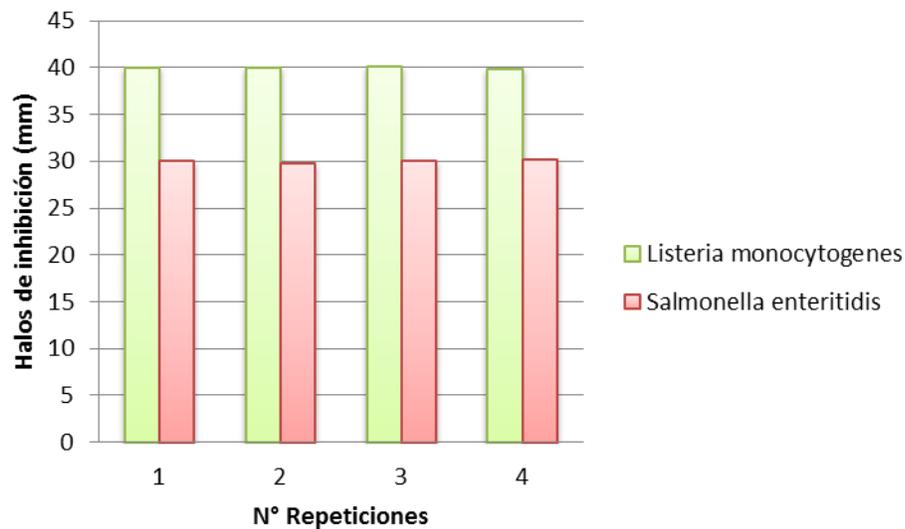
En el grafico N°1 se visualiza las medias del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” a diferentes concentraciones, obtenidos por el enfrentamiento microbiológico sobre *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, observando que el aceite de tomillo a las concentraciones del 100% y 50% presentan un comportamiento similar, de esta forma se observa que ambas concentraciones producen el mismo efecto antibacteriano sobre *Listeria monocytogenes*, sin embargo al comparar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” sobre *Salmonella enteritidis* muestran una notable diferencia, debido que a la concentración del 100% presentó un promedio de 40 mm y al 50% un promedio de 29.7mm de halos de inhibición, por lo tanto se muestra que la mejor concentración es la del 100 % sobre *Salmonella enteritidis*.

**GRAFICO N°2: Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano” sobre el crecimiento bacteriano de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.**



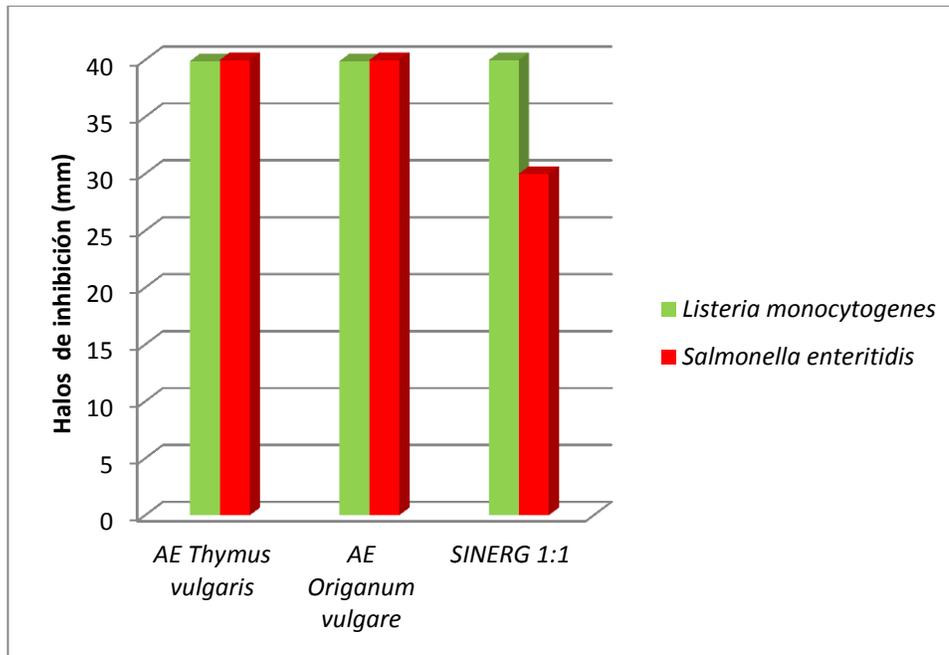
En el grafico N°2 se visualiza efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano” a diferentes concentraciones, obtenidos por el enfrentamiento microbiológico frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, obteniéndose que el efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano a las concentraciones del 100% y 50% presentan un comportamiento similar, de esta forma se puede observar que a ambas concentraciones presentan el mismo efecto antibacteriano sobre *Listeria monocytogenes*, sin embargo se observa una notable diferencia al evaluar la sensibilidad del aceite esencial de orégano frente a *Salmonella enteritidis*, donde la concentración del 100% y 50% tuvo un promedio de 40mm y 29.7 mm de halos de inhibición respectivamente, mostrando así que existen diferencias significativas al evaluar las concentraciones, siendo la óptima concentración la del 100% frente a *Salmonella enteritidis*

**GRAFICO N°3: Efecto sinérgico antibacteriano del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “Tomillo” y *Origanum vulgare* “Orégano” sobre el crecimiento bacteriano de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*.**



En el grafico N°3 se visualiza el efecto de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” en asociación a la proporción de 1:1 presentaron un promedio de 40 mm de halo de inhibición frente a *Listeria monocytogenes* y 30 mm de halo de inhibición frente a *Salmonella enteritidis*, demostrando que la asociación de ambos aceites esenciales muestran mayor actividad antibacteriana frente a *Listeria monocytogenes*. Sin embargo no existe un efecto sinérgico frente a *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis* debido a que no se evidencia potenciación de los aceites esenciales al comparar su actividad antibacteriana que presentaron por separado.

**GRAFICO N°4: Comparación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” frente a microorganismos patógenos.**



En el grafico N° 4 se visualiza la comparación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Thymus vulgaris* “tomillo”, *Origanum vulgare* “orégano” y la asociación entre estos aceites en donde la actividad por separada del aceite esencial de tomillo y orégano a la concentración del 100% presentaron un promedio de 39.9 mm de halo de inhibición respectivamente frente a *Listeria monocytogenes* y la asociación de ambos aceites presento un promedio de 40mm de halo de inhibición, de esta manera se considera que no existe efecto sinérgico. Así mismo la actividad por separada del aceite esencial de *Thymus vulgaris* “tomillo” y *Origanum vulgare* “orégano” a la concentración del 100% presentaron un promedio de 40 mm de halo de inhibición respectivamente frente a *Salmonella enteritidis* y la asociación de ambos aceites esenciales presento un promedio de 30 mm de halo de inhibición de esta manera se observa que los aceites esenciales presentan mejor actividad antibacteriana cuando se evalúan por separado.