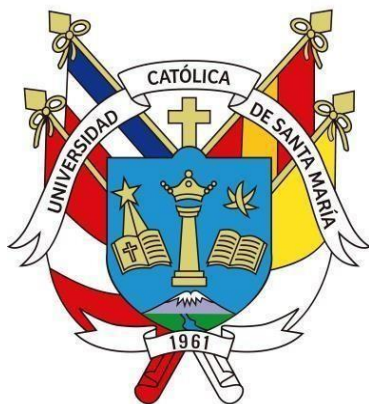


Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
ACEITES ESENCIALES DE TRES ECOTIPOS DE ORÉGANO
(*Origanum x aplii Domin Boros*) CHINITO; (*Origanum x majoricum
Cambessedes*) NIGRA; (*Origanum majorana L.*) MEJORANA, FRENTE
CEPAS DE AMPLIO ESPECTRO**

Tesis presentada por los
Bachilleres:

**Arenas Aranibar, Karol Alberto
Begazo Soto, Jonathan Irvin**

Para optar el Título Profesional de:
Ingeniero Biotecnólogo

Asesora:

**Mg. Blga. Bardales Álvarez
Roxana Margarita**

**Arequipa – Perú
2023**

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 29 de Agosto del 2023

Dictamen: 004849-C-EPIB-2023

Visto el borrador del expediente 004849, presentado por:

2007701211 - ARENAS ARANIBAR KAROL ALBERTO

2007700631 - BEGAZO SOTO JONATHAN IRVIN

Titulado:

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE ACEITES ESENCIALES DE TRES ECOTIPOS DE ORÉGANO(ORIGANUM X APLII(DOMIN)BOROS CHINTO;(ORIGANUM X MAJORICUM CAMBESSEDES) NIGRA;(ORIGANUM MAJORANA L.) MEJORANA FRENTE A CEPAS DE AMPLIO ESPECTRO.

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**29213630 - CARDENAS GARCIA JAIME DANTE
DICTAMINADOR**



**29294320 - ROQUE RODRIGUEZ FRANCISCO JAVIER
DICTAMINADOR**



**42098888 - CORDOVA BARRIOS CINTHIA CAROL
DICTAMINADOR**



EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
ACEITES ESENCIALES DE TRES ECOTIPOS DE ORÉGANO
(ORIGANUM X APLII DOMIN BOROS) CHINITO; (ORIGANUM X
MAJORICUM CAMBESSEDES) NIGRA; (ORIGANUM MAJORANA
L.) M

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

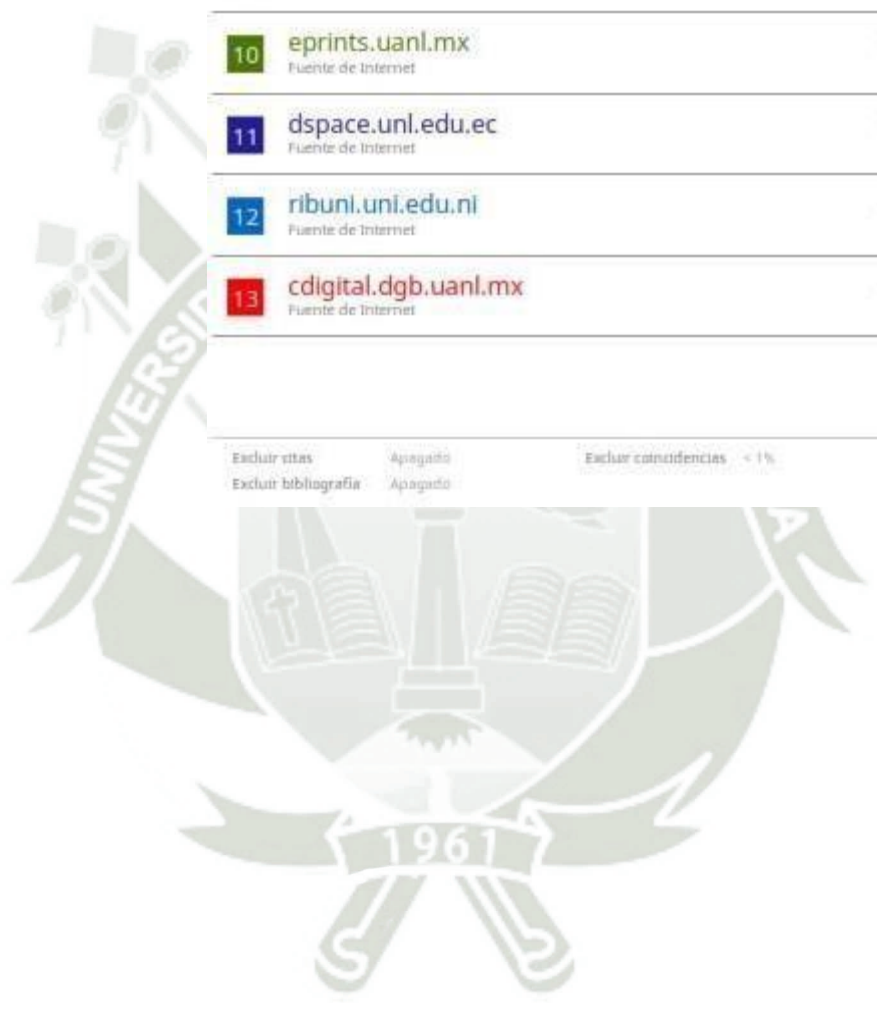
1	hdl.handle.net Fuente de Internet	2%
2	bdigital.uncu.edu.ar Fuente de Internet	2%
3	repositorio.unsaac.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	repositorio.upt.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	repositorio.uncp.edu.pe Fuente de Internet	1%
7	repositorio.unas.edu.pe Fuente de Internet	1%

es.scribd.com

8	Fuente de Internet	1 %
9	mriuc.bc.uc.edu.ve Fuente de Internet	1 %
10	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	1 %
11	dspace.unl.edu.ec Fuente de Internet	1 %
12	ribuni.uni.edu.ni Fuente de Internet	1 %
13	cdigital.dgb.uanl.mx Fuente de Internet	1 %

Excluir citas Apagado Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía Apagado



DEDICATORIA

Dedico mi tesis a Dios por haberme dado la fuerza y paciencia para la obtención de este logro. A mis padres por haberme inculcado valores y darme la fuerza para seguir adelante con mi carrera profesional, a mi amada esposa por su apoyo, comprensión y motivación para seguir adelante y no dejarme decaer; a mis padres políticos por su cariño y apoyo incondicional, a mi asesora Mg Roxana Bardales Álvarez por sus orientaciones y aprendizajes compartidos, por la paciencia y el tiempo brindado durante el desarrollo de la tesis. A nuestro Co-asesor Lic. Juan Chipana por el tiempo y paciencia que tuvo durante todo el desarrollo de nuestra tesis, muchas gracias a todos.

Karol Alberto Arenas Aranibar

Dedicado de manera especial a mi madre, Susana, quien, mediante su ejemplo, constancia y sacrificio, me demostró que no existe obstáculo que permita alcanzar nuestros ideales, inculcándome el amor por las ciencias, así como diversos valores que me permitieron llegar a concluir mis estudios.

A mis abuelos Sabino y Yolanda, que me guiaron desde niño por el camino correcto de la responsabilidad, el cual fue un pilar fundamental, a través de toda mi vida académica, gracias a sus consejos para seguir adelante sin importar cuanto nos cueste buscar el éxito.

A nuestra asesora, Mg Roxana Margarita Bardales Álvarez, por brindarnos su tiempo y sus consejos para llevar a cabo este proyecto, a pesar de todos los obstáculos por la coyuntura vivida, su apoyo fue invaluable.

Jonathan Irvin Begazo Soto

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento especial a mi Escuela profesional de Ingeniería Biotecnológica de la Universidad Católica Santa María de Arequipa la cual me abrió sus puertas para mi formación profesional

A mis profesores por sus diferentes formas de enseñar, quienes incentivaron en muchos sentidos a seguir adelante y sin su apoyo esto no hubiera sido posible.

Al Dr. Hugo Chise Apaza por su apoyo brindado en el desarrollo de mi carrera profesional.

Karol Alberto Arenas Aranibar

En primer lugar, agradecer a Dios por guiarnos en este camino permitiéndonos llegar hasta estas instancias con bien.

En Segundo lugar, A nuestros familiares quienes nos apoyaron en todos los aspectos de nuestras vidas, llenándonos de valores que permitieron cumplir nuestra meta de ser profesionales para aportar a la humanidad con nuestros conocimientos.

Finalmente, a todos nuestros docentes en especial a Q.F. Mercedes Jave Márquez, por sus enseñanzas en microbiología que motivaron el desarrollo de este tema, a la Dra. Jesús María Zambrano Salas, quien nos demostró como desenvolvemos correctamente en un laboratorio con pulcritud y orden.

Jonathan Irvin Begazo Soto

INDICE

DECRETO DE NOMBRAMIENTO DE JURADO Y EVALUACION DE SUSTENTACION TITULACION CON TESIS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
SIGLAS Y ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	xvi
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN	xx
HIPÓTESIS.....	1
TABLA DE VARIABLES E INDICADORES.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	2
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
CAPITULO I.....	3
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1. Equipo Destilador	3
1.2. Método de extracción por arrastre de vapor	3
1.3. Ingeniería de proyecto del equipo de destilación optimizado	3
1.4. Diseño del equipo piloto de destilación optimizado	4
1.5. Orégano, origen y clasificación.....	4
1.5.1. Producción y rendimiento de orégano.....	5
1.6. Ecotipos de orégano y clasificación	6
1.6.1 Comparación morfológica de variedades de estudio	6
1.7. Aceite esencial y sus características morfológicas	10
1.8. La actividad antimicrobiana.....	11
1.9. Pruebas in vitro.....	12
1.10. Tinción de Gram	12
1.11. Cepas bacterianas	13
Clasificación de las bacterias.....	13

1.11.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.11.2. <i>Streptococcus agalactiae</i>	15
1.11.3. <i>Escherichia coli</i>	16
1.12. Resistencia antibacteriana	17
1.13. Antibiograma	17
1.14. Clasificación de resistencia antimicrobiana en Microorganismos	18
1.15. Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana	18
1.15.1. <i>Concentración Mínima Inhibitoria</i>	19
1.15.2. <i>Concentración Mínima Bactericida</i>	19
1.16. Antibióticos.....	20
1.16.1. <i>Amikacina</i>	20
1.16.2. <i>Ceftriaxona</i>	21
1.16.3. <i>Estreptomicina</i> :.....	21
CAPÍTULO II	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS	22
2.1. Lugar de Ejecución	22
2.2. Materiales	22
2.2.1. <i>Material biológico (Cepas microbianas, líneas celulares, organismos)</i> 21	
2.2.2. <i>Insumos</i>	22
2.2.3. <i>Reactivos químicos</i>	23
2.2.4. <i>Materiales de laboratorio (vidrio, porcelana, metal, etc.)</i>	23
2.2.5. <i>Aparatos y equipos</i>	24
2.2.6. <i>Software</i>	24
2.2.7. <i>Otros</i>	24
2.3. Métodos.....	24
2.3.1. <i>Evaluación de los tiempos de extracción y costos de diseño de un prototipo de destilador mediante arrastre de vapor</i>	24
2.3.2. <i>Evaluación el rendimiento y material aprovechable de aceites esenciales tres ecotipos de orégano: Origanum x aplii Domin Boros Chinito; Origanum majoricun Cambessedes Nigra y Origanum majorana L Mejorana</i>	31
2.3.3. <i>Comparación y evaluación de la sensibilidad antibacteriana (in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: Origanum x aplii Domin Boros Chinito; Origanum majoricun Cambessedes Nigra y Origanum majorana L Mejorana con antibióticos convencionales en cepas de amplio espectro</i>	36
2.3.4. <i>Comparación y evaluación de la sensibilidad antibacteriana (in vitro) de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano con antibióticos convencionales en cepas de amplio espectro</i>	45
2.3.5. <i>Comparación y evaluación de la concentración antibacteriana (CMI y CMB in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: Origanum x aplii Domin Boros Chinito; Origanum majoricun Cambessedes Nigra y Origanum majorana L Mejorana en cepas de amplio espectro</i>	47
2.4. Diagrama de flujo	51

CAPÍTULO III.....	52
3. RESULTADOS Y DISCUSION	52
3.1. Diseño y construcción de un prototipo de destilador para la extracción de aceite esencial de orégano mediante arrastre de vapor	52
3.2. Evaluación el rendimiento de aceites esencial y material vegetal de tres ecotipos de orégano: <i>Origanum x aplii Domin Boros</i> Chinito; <i>Origanum majoricun Cambessedes Nigra</i> y <i>Origanum majorana L</i> Mejorana.....	56
3.3. Comparación y evaluación de la sensibilidad antibacteriana (in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: <i>Origanum x aplii Domin Boros</i> Chinito; <i>Origanum majoricun Cambessedes Nigra</i> y <i>Origanum majorana L</i> Mejorana con antibióticos convencionales en cepas de amplio espectro	61
3.4. Comparación y evaluación la concentración antibacteriana (CMI y CMB in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: <i>Origanum x aplii Domin Boros</i> Chinito; <i>Origanum majoricun Cambessedes Nigra</i> y <i>Origanum majorana L</i> Mejorana en cepas de amplio espectro	65
Análisis de Resultados	69
Evaluación del rendimiento de aceites esenciales y material aprovechable de tres ecotipos de orégano: <i>Origanum x aplii Domin Boros</i> Chinito; <i>Origanum majoricun Cambessedes Nigra</i> y <i>Origanum majorana L</i> Mejorana.....	70
Comparación y evaluación de la sensibilidad antibacteriana (in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: <i>Origanum x aplii Domin Boros</i> Chinito; <i>Origanum majoricun Cambessedes Nigra</i> y <i>Origanum majorana L</i> Mejorana con antibióticos convencionales en cepas de amplio espectro	73
Comparación y evaluación la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: <i>Origanum x aplii Domin Boros</i> Chinito; <i>Origanum majoricun Cambessedes Nigra</i> y <i>Origanum majorana L</i> Mejorana en cepas de amplio espectro	74
Comparación y evaluación la concentración antibacteriana (CMB in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: <i>Origanum x aplii Domin Boros</i> Chinito; <i>Origanum majoricun Cambessedes Nigra</i> y <i>Origanum majorana L</i> Mejorana en cepas de amplio espectro.....	75
CONCLUSIONES	76
RECOMENDACIONES	78
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	79

ANEXOS.....	81
INFORME DE ORIGINALIDAD DE TURNITIN.....	86



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variable independiente	1
Tabla 2. Variable dependiente.....	1
Tabla 3. Clasificación taxonómica del orégano y descripción morfológica	5
Tabla 4. Moquegua, Producción, Superficie cosechada, rendimiento y precio de chacra de orégano	6
Tabla 5. Cuadro comparativo de características morfológicas de ecotipos de orégano.....	7
Tabla 6. Cuadro comparativo de características morfológicas de ecotipos de orégano.....	11
Tabla 7. Cuadro comparativo de características morfológicas de ecotipos de orégano.....	13
Tabla 8. Materia vegetal bruta y aprovechable por ecotipos de orégano.....	33
Tabla 9. Caracterización de microorganismos y/o cepas bacterianas	36
Tabla 10. Características Microscópicas	39
Tabla 11. Pruebas bioquímicas de cepas bacterianas.....	43
Tabla 12. Preparación de inóculos para cada cepa bacteriana	45
Tabla 13. Preparación de medios de cultivo (Muller-Hinton)	46
Tabla 14. Aplicación de inóculo sobre el agar Muller-Hinton	47
Tabla 15. Batería de tubos para los aceites esenciales de las tres ecotipos de orégano	49
Tabla 16. Especificaciones técnicas del equipo destilador optimizado	52
Tabla 17. Comparativo de tiempo de extracción de aceite en equipo convencional y prototipo de destilador.....	54
Tabla 18. Comparativo de costos de destilador convencional y costos destilador prototipo	55
Tabla 19. Rendimiento promedio de aceite esencial y material aprovechable según ecotipos de orégano.....	57
Tabla 20. Rendimiento de aceite esencial y material aprovechable según ecotipos de orégano por etapas de cosecha.....	57
Tabla 21. Rendimiento detallado de aceite esencial y material aprovechable de ecotipos de orégano por etapa de cosecha	58

Tabla 22. Categoría de interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos	61
Tabla 23. Resultados comparativos de Halos Inhibición de Aceites y antibióticos sobre Cepas Bacterianas, según ecotipo Chinito, Nigra y Mejorana	61
Tabla 24. Batería de tubos para los aceites esenciales de los tres ecotipos de orégano para CMI.....	65
Tabla 25. Placas Petri con agar nutritivo para los aceites esenciales de las tres ecotipos de orégano para determinación de la CMB	67
Tabla 26. Regresión factorial: Rto Chto fl, Rto Mjna fl, Rto Ngra fl; Rto Chto vg, Rto Mjna vg, Rto Ngra vg.....	70
Tabla 27. Regresión factorial: %M.v Chto vg %M.v Mjna vg; %Mv Ngra vg; %Mv Chto fl; %Mv Mjna fl; %Mv Ngra fl.....	71
Tabla 28. Regresión factorial: >Hi Ngra vs Rdto; Efectv; M.v; >Hi Mjna vs Rdto; Efectv; M.v y >Hi Chto vs Rdto; Efectv; M.v.....	73
Tabla 29. Regresión factorial: Chto CMI vs Rto; Efectv; Ngra CMI vs Rto; Efectv; Mjna CMI vs Rto; Efectv	74
Tabla 30. Regresión factorial: Ngra CMB vs Rto; Efectv; Mjna CMB vs Rto; Efectv; Chto CMB vs Rto; Efectv.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Características morfológicas de ecotipos de orégano, de izquierda a derecha: Nigra, Mejorana y Chinito	10
Figura N°2. Diagrama de Proceso de producción de aceite esencial	25
Figura N°3. Diseño de principales equipos y especificaciones técnicas a escala 1/3 de Caldero.....	26
Figura N°4. Diseño y especificaciones técnicas a escala 1/3 de Caldero.....	26
Figura N° 5. Diseño y especificaciones técnicas a escala 1/3 de Cápsula de extracción de material vegetal.....	27
Figura N°6. Diseño y especificaciones técnicas a escala 1/3 de sistema de Conducción de vapor.....	27
Figura N°7. Diseño de principales equipos y especificaciones técnicas a escala 1/3 de sistema de enfriamiento.....	27
Figura N°8. Construcción y armado de prototipo de destilador	29
Figura N°9. Construcción y soldadura de las partes externas con soldadura TIG, en el taller	30
Figura N°10. Imagen de equipo piloto de destilación construido para estudio	31
Figura N° 11. Recolección, selección y clasificación de material vegetal de los ecotipos de orégano	32
Figura N°12. Pesado de material vegetal antes de iniciar la extracción	32
Figura N°13. Condensación de mezcla y recolección en pera de decantación.....	33
Figura N°14. Proceso de separación del aceite esencial por decantación	34
Figura N°15. El almacenamiento y conservación en frío de aceite.....	34
Figura N°16. Pesado de aceite esencial de ecotipo de orégano Chinito	35
Figura N°17. Especificaciones de bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i> y <i>Escherichia coli</i>	37
Figura N°18. Estructura Macroscópica de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> (izquierda) <i>Streptococcus agalactiae</i> (derecha).....	37
Figura N°19. Estructura macroscópica <i>Escherichia coli</i>	38
Figura N° 20. Estructuras microscópicas <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> y <i>Escherichia coli</i>	39
Figura N°21. Kit de Coloración Gram (de izquierda a derecha: cristal violeta, Lugol mordiente, alcohol acetona, safranina).	39

Figura N°22. Prueba Catalasa Positiva para cepa bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Figura N°23. Prueba de Coagulasa positiva para cepa bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Figura N°24. Prueba Agar manitol salado positivo para cepa bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Figura N°25. Prueba de Test de Camp Positiva para cepa bacteriana de <i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i>	42
Figura N°26. Pruebas de TSI, Urea y Citrato Simons para <i>Escherichia coli</i>	43
Figura N°27. Preparación del inóculo para cepas bacterianas mediante método de disco difusión en placa Kirby-Bauer	44
Figura N°28. Prueba de Comparación de los inóculos con escala de Mac Farland 0.5M....	44
Figura N°29. Preparación de tubos e Inóculos de cepas bacterianas a la concentración 10 ⁸ UFC (Derecha) 10 ⁶ UFC (Izquierda).....	49
Figura N°30. Placa Petri con inóculos sembrados listos para incubación.....	50
Figura N°31. Diseño y construcción con especificaciones técnicas de sistema de extracción: Caldero, Capitel modificado y cápsula de material vegetal.....	53
Figura N°32. Diseño y construcción con especificaciones técnicas: Sistema de enfriamiento(derecha) Sistema de conducción de vapores (centro) salida de aceite e Hidrolato (izquierda).....	53
Figura N°33. Imagen de equipo piloto de destilación construido para estudio.....	53
Figura N°34. Cotización de precios de destilador convencional de empresa corporación andina	56
Figura N°35. Resultados de la sensibilidad antibacteriana de los aceites esenciales del Ecotipo Chinito frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y su comparación con los antibióticos convencionales derecha a izquierda (Concentración de 30µL y 300µL y placa con antibióticos).....	64
Figura N°36. Resultados de la sensibilidad antibacteriana de los aceites esenciales del ecotipo Nigra frente a <i>Escherichia coli</i> y su comparación de los antibióticos convencionales. De derecha a izquierda (concentración de 30µL y 300µL, placa con antibióticos)...	64

Figura N°37. Resultados de la sensibilidad antibacteriana de los aceites esenciales del Ecotipo Mejorana frente a *Streptococcus agalactiae* y su comparación de los antibióticos convencionales. De derecha a izquierda (concentración de 30 μ L y 300 μ L, placa con antibióticos)64



Figura N°38. Determinación de la CMI del aceite de ecotipo Chinito frente a las cepas bacterianas cepas bacterianas <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i>	66
Figura N°39. Determinación de la CMI del aceite de ecotipo Nigra frente a las cepas bacterianas <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i>	66
Figura N°40. Determinación de la CMI del aceite de ecotipo Mejorana frente a las cepas bacterianas <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i>	66
Figura N°41. Determinación de CMB del Ecotipo Chinito frente al <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptococcus agalactiae</i> mediante método en placa	68
Figura N°42. Determinación del CMB del Ecotipo Nigra frente al <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. agalactiae</i> mediante método en placa	68
Figura N°43. Determinación de CMB del Ecotipo Mejorana frente <i>Staphylococcus aureus</i> mediante método en placa.	68
Figura N°44. Gráfico de intervalos de Rendimientos en material vegetal y en floración	70
Figura N°45. Gráfico de Porcentajes de Material Vegetal de tres ecotipos de orégano.....	71
Figura N° 46. % Rendimiento promedio de aceite esencial y material aprovechable según ecotipos de orégano.....	81
Figura N°47. Porcentaje promedio de material aprovechable según ecotipos de orégano por etapas de cosecha	81
Figura N° 48. Porcentaje de Rendimiento de aceite esencial según ecotipos de orégano por etapas de cosecha	82
Figura N°49. Resultados comparativos de Halo Inhibición de Aceite ecotipo Chinito y antibióticos convencionales.....	82
Figura N°50. Resultados comparativos de Halo Inhibición de Aceite ecotipo Nigra y antibióticos convencionales.....	85
Figura N° 51. Resultados comparativos de Halo Inhibición de Aceite ecotipo Mejorana y antibióticos convencionales.....	85
Figura N° 52. Resultados comparativos de la CMI de los tres ecotipos de orégano en tres bacterias de estudio.....	86

Figura N°53. Resultados comparativos de la CMB de ecotipos de orégano en tres bacterias de estudio.....

86



SIGLAS Y ABREVIATURAS

ANOVA: Analysis of Variance (Análisis de Varianza) Agar S/Bacterias: Agar sin Bacterias

AK: Amikacina

BaCl₂: Cloruro de Bario

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria CMB: Concentración Mínima Bactericida CRO:

Ceftriaxona

°C: Grados centígrados

CAMP-Test: Christie- Atkins- Munch-Peterson test (test rápido para identificación *Streptococcus agalactiae*) *E. coli*: *Escherichia coli*

Efectv: Efectividad

Ec. Ngra: Ecotipo Nigra

Ec. Mjrna: Ecotipo Mejorana

Ec. Chnto: Ecotipo Chinito

G.L: Grados de libertad

g: Gramos

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

H.i: Halo de inhibición

>H.i Ngra: Mayor Halo Inhibición del ecotipo Nigra

>H.i Mjrna: Mayor Halo Inhibición del ecotipo Mejorana

>H.i Chnto: Mayor Halo Inhibición del ecotipo Chinito

L.I.A Agar: Lysine Iron Agar (agar lisina hierro)

mm: Milímetros mL:

Mililitro

mg/mL: Miligramo por mililitro

M.v: Material vegetal

%M.v Chto vg: Porcentaje material vegetal del ecotipo Chinito vegetativo

%M.v Mjna vg: Porcentaje material vegetal del ecotipo Mejorana vegetativo

%M.v Ngra vg: Porcentaje material vegetal del ecotipo Nigra vegetativo

%M.v Chto fl: Porcentaje material vegetal del ecotipo Chinito en floración

%M.v Mjna fl: Porcentaje material vegetal del ecotipo Mejorana en floración

%M.v Ngra fl: Porcentaje material vegetal del ecotipo Nigra en floración

OMS: Organización Mundial de la Salud

%: Porcentaje

Rdto: Rendimiento

Rdto Chto fl: Rendimiento del ecotipo Chinito en floración Rdto

Mjna fl: Rendimiento del ecotipo Mejorana en floración Rdto

Ngra fl: Rendimiento del ecotipo Nigra en floración Rdto Chto

vg: Rendimiento del ecotipo Chinito vegetativo Rdto Mjna vg:

Rendimiento del ecotipo Mejorana vegetativo Rdto Ngra vg:

Rendimiento del ecotipo Nigra vegetativo

S: Estreptomicina

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

S. agalactiae: *Streptococcus agalactiae*

S: Desviación estándar

T.S.I Agar: Triple Sugar Iron Agar (agar triple azúcar hierro)

TSA Agar: Tryptic Soy Agar (agar de soja tréptica)

Tubo S/Turbidez: Tubo sin Turbidez

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colonias por mililitro

μL: microlitro

<Vb Ngra: Menor Valor Bactericida del ecotipo Nigra

<Vb Mjrna: Menor Valor Bactericida del ecotipo Mejorana

<Vb Chto: Menor Valor Bactericida del ecotipo Chinito

RESUMEN

La presente investigación utilizó 21 métodos, para seguir cada una de las etapas de la investigación, por lo tanto, esto nos permitió responder a la hipótesis de investigación de evaluar cual de los tres ecotipos de orégano (*Origanum x aplii Domin Boros*) Chinito; (*Origanum x majoricum Cambessedes*) Nigra; (*Origanum majorana L.*) Mejorana tiene el aceite esencial con mejor efectividad antibacteriana frente a tres cepas de amplio espectro. La misma que fue planteada en el presente estudio de investigación denominado “Evaluación de la efectividad antibacteriana de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano (*Origanum x aplii Domin Boros*) Chinito; (*Origanum x majoricum Cambessedes*) Nigra; (*Origanum majorana L.*) Mejorana.

Este estudio de investigación a centrado su análisis en los objetivos específicos : 1) Diseñar y construir un prototipo de destilador; 2) Determinar el rendimiento del aceite esencial y material aprovechable de tres ecotipos de orégano; 3) Comparar y evaluar la sensibilidad antibacteriana (in vitro), de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano frente a antibióticos convencionales en tres cepas bacterianas; 4) Evaluar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI in vitro) de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano. En tres cepas bacterianas y 5) Evaluar la Concentración Mínima Bactericida (CMB in vitro) de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano en tres cepas bacterianas.

En el Capítulo I, hace referencia al Marco Teórico, en el que se destaca todos los aspectos conceptuales y operacionales de la temática del estudio como los ecotipos de orégano, aceites, métodos, sensibilidad antibacteriana entre otros; en el Capítulo II de materiales y métodos, hace referencia al material biológico, reactivos y materiales de laboratorio entre otros, así como los métodos a implementar para el presente estudio. En el Capítulo III hace referencia a los resultados y discusiones, en la que se destacan los procesos seguidos y los resultados operacionales de cada método seguido, asimismo un análisis de resultados con las respectivas pruebas de análisis de varianza según los modelos de regresión lineal y factorial previstos por el ANOVA. Luego se establecen las conclusiones y recomendaciones.

De los resultados obtenidos en las distintas pruebas, según los análisis de varianza nos permite determinar que, con respecto al rendimiento, es el Aceite esencial del ecotipo Chinito en etapa floración, el que muestra un mejor rendimiento con una media de $M=0.18605$ con respecto a los ecotipos de orégano Nigra $M=0.17832$ y Mejorana $M=0.18412$, resultado

que es ratificado en el análisis de varianza de ANOVA, donde muestra que el valor P obtenido es de 0.000, siendo menor que nivel de significancia de 0.05. Así mismo con respecto al porcentaje de material vegetal existen diferencias entre los ecotipos de orégano, siendo el ecotipo de orégano Nigra 47.60% el que presenta mejor porcentaje de material vegetal respecto a los ecotipos Mejorana 44.59% y Chinito 35.34%, resultado que es ratificado en el análisis de varianza según el modelo de regresión lineal que establece que el valor P es de 0.000.

Respecto a las pruebas de Sensibilidad Antibacteriana, se concluyó que el aceite del ecotipo Chinito presentó una mayor efectividad antibacteriana sobre las tres cepas de estudio, con halos de inhibición de 35 mm a 85 mm ratificado en el análisis de varianza, que señala valores P de la razón F de las pruebas de rendimiento* efectividad (AB) de $>H.i$ es de 0.001. Por otro lado, en la CMI, el ecotipo Chinito, presentó una buena inhibición bacteriana del aceite esencial, presentando una concentración de 1.95 mg/mL en el 8vo tubo de ensayo, comparativamente con los resultados obtenidos del CMI del ecotipo Nigra y Mejorana. Por otro lado, en la CMB, se puede concluir que el ecotipo Chinito, tuvo mejor concentración bactericida con respecto a los ecotipos Nigra y Mejorana, al presentar valores de 1.95 mg/mL frente a las cepas bacterianas *S. aureus*, *E. coli* y *S. agalactiae*, quienes presentaron valores indistintos de 15.63, 31.3 y 1.95 mg/mL para las cepas *S. aureus*, *E. coli* y *S. agalactiae*, ubicando su acción bactericida en los espacios 5to, 4to y 8vo, de las placas utilizadas.

Asimismo, el presente estudio de investigación, hace referencia al proceso de diseño y construcción del prototipo de destilador por el método de arrastre de vapor, el cual permitió cumplir la finalidad de obtener aceites esenciales de ecotipos de orégano y saber cuál de los tres es más efectivo en rendimiento, material vegetal y sensibilidad antibacteriana.

Palabras claves: Ecotipos, Orégano, Rendimiento, Sensibilidad Antibacteriana.

ABSTRACT

The present investigation used 21 methods to follow each of the stages of the investigation, therefore, this allowed us to respond to the research hypothesis of evaluating which of the three ecotypes of oregano (*Origanum x aplii Domin Boros*) Chinito; (*Origanum x majoricum Cambessedes*) Nigra; (*Origanum majorana L.*) Marjoram has the essential oil with the best antibacterial effectiveness against broad-spectrum strains. The same that was raised in the present research study called "Evaluation of the antibacterial effectiveness of essential oils from three ecotypes of oregano (*Origanum x aplii Domin Boros*) Chinito; (*Origanum x majoricum Cambessedes*) Nigra; (*Origanum majorana L.*) Mejorana.

This research study has focused its analysis on the specific objectives: 1) Design and build a distiller prototype; 2) Determine the yield of the essential oil and usable material of three ecotypes of oregano; 3) Compare and evaluate the antibacterial sensitivity (in vitro) of essential oils from three ecotypes of oregano against conventional antibiotics in three bacterial strains; 4) Evaluate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC in vitro) of essential oils of three ecotypes of oregano. In three bacterial strains and 5) Evaluate the Minimum Bactericidal Concentration (CMB in vitro) of essential oils of three ecotypes of oregano in three bacterial strains.

In Chapter I, it refers to the Theoretical Framework, which highlights all the conceptual and operational aspects of the subject of the study such as oregano ecotypes, oils, methods, antibacterial sensitivity among others; in Chapter II of materials and methods, it refers to the biological material, reagents and laboratory materials among others, as well as the methods to be implemented for the present study. In Chapter III, reference is made to the results and discussions, in which the processes followed and the operational results of each method followed are highlighted, as well as an analysis of the results with the respective analysis of variance tests according to the linear and factorial regression models. predicted by the ANOVA. Then the conclusions and recommendations are established.

From the results obtained in the different tests, according to the analysis of variance, it allows us to determine that, with respect to yield, it is the essential oil of the Chinito ecotype in the flowering stage, which shows a better yield with an average of $M=0.18605$ with respect to the ecotypes of oregano Nigra $M=0.17832$ and Marjoram $M=0.18412$, a result that is ratified in the ANOVA analysis of variance, where it shows that the P value obtained is 0.000, being less than the significance level of 0.05. Likewise, with respect to the percentage of plant material, there are differences between the oregano ecotypes, with the Nigra 47.60% oregano ecotype being the one that presents the best percentage of plant material compared to the Marjoram 44.59% and Chinito 35.34% ecotypes, a result that is ratified in the analysis of variance according to the linear regression model that establishes that the P value is 0.000%.

Regarding the Antibacterial Sensitivity tests, it was concluded that the Chinito ecotype oil presented greater antibacterial effectiveness over the three study strains, with inhibition halos from 35mm to 85mm ratified in the analysis of variance, which indicates P values of the ratio F of performance tests* effectiveness (AB) of $>H_i$ is 0.001. On the other hand, in the CMI, the Chinito ecotype, presented a good bacterial inhibition of the essential oil, presenting a concentration of 1.95 mg/mL in the 8th test tube, compared to the results obtained from the CMI of the Nigra and Marjoram ecotype. On the other hand, in the CMB, it can be concluded that the Chinito ecotype had a better bactericidal concentration compared to the Nigra and marjoram ecotypes, presenting values of 1.95 mg/mL against the bacterial strains *S. aureus*, *E. coli* and *S. agalactiae*, who presented indistinct values of 15.63, 31.3 and 1.95 mg/mL for the strains *S. aureus*, *E. coli* and *S. agalactiae*, locating their bactericidal action in the 5th, 4th and 8th spaces of the plates used.

Likewise, the present research study refers to the design and construction process of the distiller prototype by the steam dragging method, which allowed the purpose of obtaining essential oils from oregano ecotypes to be fulfilled and to know which of the three is more effective in yield, plant material and antibacterial sensitivity.

Key words: Oregano, Ecotypes, Yield, Antibacterial Sensitivity.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la producción de los aceites esenciales está en crecimiento generando diversos usos que son utilizados para el desarrollo de nuevas aplicaciones en múltiples industrias, como la farmacéutica, alimentaria y la salud. Según, Salavert (1), señala “La resistencia antimicrobiana de los microorganismos o patógenos, dificulta el tratamiento de estas enfermedades y causa una mayor morbilidad y mortalidad en estos pacientes” en tal sentido, el uso indiscriminado de antibióticos en la práctica médica, ha generado que se busquen soluciones alternativas para atacar la resistencia antibacteriana, en el presente estudio estas pruebas serán a través de pruebas in vitro frente a cepas de amplio espectro, las mismas que son promovidas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), donde promueven la realización de estudios e investigaciones en el desarrollo de nuevos antimicrobianos para tratar agentes patógenos que aparecen producto de mutaciones y/o resistencias de diferentes enfermedades, entre ellas el uso de aceites esenciales.

Partiendo de esta premisa, el presente trabajo de investigación, busca obtener aceites esenciales de tres ecotipos de orégano que son más cultivados en la región sur del país, para evaluar la calidad de estos, en la efectividad antibacteriana (en cepas patógenas de contagio ambulatorio y multiresistentes). Para ello partiremos del proceso de construcción de un prototipo piloto de destilador para obtener aceites esenciales de tres ecotipos de orégano y posteriormente determinar y evaluar el mejor aceite en la aplicación de pruebas de sensibilidad y concentración antibacteriana en cepas de amplio espectro (bacterias Gram negativas y Gram positivas) comparando dicha efectividad con los antibióticos convencionales: Estreptomina, Amikacina y Ceftriaxona.

El contexto de la pandemia efectuada en el 2020 al 2022, nos ha limitado las condiciones de estudio de tipo experimental, sobre todo en el uso de laboratorios y equipamiento necesario, motivándonos buscar nuevas formas de experimentar y validar estudios, utilizando la innovación tecnológica como base, para diseñar un prototipo piloto de destilador que nos permita obtener aceite esencial, el mismo que posterior a su extracción nos permita evaluar sus resultados en pruebas de sensibilidad, CMI y CMB frente a tres cepas de amplio espectro, las cuales deben permitir un análisis comparativo de otros ecotipos de orégano existentes en el sur peruano, esto es una clara evidencia de realizar un aporte a nivel investigativo para estudios posteriores.

Por otro lado, la Universidad Católica de Santa María, viene impulsando la investigación tecnológica, experimental y también ha venido desarrollando estudios de la efectividad antibacteriana, de diversos aceites y extractos de orégano y blueberry, entre otros pero también se han propiciado el estudio de su actividad antibacteriana en distintas bacterias como *Porphyromona gingivalis*, entre otros; sin embargo, el carácter de nuestra investigación busca evaluar la efectividad antibacteriana de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano (*Origanum x aplii Domin Boros*) Chinito; (*Origanum x majoricum Cambessedes*) Nigra; (*Origanum majorana L.*) Mejorana frente a tres cepas de amplio espectro, extraídos mediante un prototipo de destilador.



HIPÓTESIS

Debido a que los aceites esenciales son poderosos agentes antimicrobianos, es posible evaluar el rendimiento de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano que son los de mayor producción en la sierra sur del país (*Origanum x aplii Domin Boros*) Chinito; (*Origanum x majoricum Cambessedes*) Nigra; (*Origanum majorana L.*) Mejorana y su efectividad antibacteriana frente a tres cepas de amplio espectro, multirresistentes y de contagio ambulatorio, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae*.

TABLA DE VARIABLES E INDICADORES.

La presente investigación denominada “Evaluación de la efectividad antibacteriana de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano (*Origanum x aplii Domin Boros*) Chinito; (*Origanum x majoricum Cambessedes*) Nigra; (*Origanum majorana L.*) Mejorana, tienen las siguientes variables e indicadores establecidas en la Tabla 1 y Tabla 2, según detalle a continuación:

Tabla 1. Variable Independiente

Variables	Variable	Indicadores	Medida
Independiente	Aceite esencial según ecotipo de orégano	Rendimiento de aceite esencial de tres ecotipos de Orégano (Material aprovechable para la extracción)	% rendimiento % Material vegetal
	Cepas bacterianas:	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> .	
	Antibióticos:	Amikacina, Estreptomina Ceftriaxona	
	Tres ecotipos de Orégano:	Chinito, Nigra y Mejorana	

Tabla 2. Variable Dependiente

Variables	Variable	Indicadores	Medida
Dependiente	Efectividad antibacteriana (in vitro):	Sensibilidad: Halos de inhibición CMI CMB	mm mg/ mL

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la efectividad antibacteriana de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano (*Origanum x aplii Domin Boros*) Chinito; (*Origanum x majoricum Cambessedes*) Nigra; (*Origanum majorana L.*) Mejorana frente a tres cepas de amplio espectro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Diseñar y construir un prototipo de destilador para la extracción de aceite esencial mediante el método por arrastre de vapor.
2. Determinar el rendimiento del aceite esencial y material aprovechable de tres ecotipos de orégano: *Origanum x aplii Domin Boros* Chinito; *Origanum Majoricum Cambessedes* Nigra y *Origanum majorana L.* extraídos en un prototipo de destilador
3. Comparar y evaluar de la sensibilidad antibacteriana (in vitro), de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano: *Origanum x aplii Domin Boros* Chinito; *Origanum Majoricum Cambessedes* Nigra y *Origanum majorana L* Mejorana frente a antibióticos convencionales en tres cepas bacterianas.
4. Evaluar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI in vitro) de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano: *Origanum x aplii Domin Boros* Chinito; *Origanum Majoricum Cambessedes* Nigra y *Origanum majorana L* Mejorana en tres cepas bacterianas.
5. Evaluar la Concentración Mínima Bactericida (CMB in vitro) de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano: *Origanum x aplii Domin Boros* Chinito; *Origanum Majoricum Cambessedes* Nigra y *Origanum majorana L* Mejorana en tres cepas bacterianas.

CAPITULO I

1.-MARCO TEÓRICO

1.1. Equipo Destilador

Los materiales de construcción de los destiladores (acero inoxidable, aluminio, cobre y lámina galvanizada) si afectaron las propiedades organolépticas y características fisicoquímicas del aceite esencial de orégano, principalmente en el color, solubilidad en etanol y residuo a la evaporación. Así mismo, dichos materiales también afectan la composición química del aceite esencial de orégano, especialmente los provenientes de los equipos de cobre y lámina galvanizada como lo demuestra el perfil cromatográfico, ya que cada uno de los aceites presenta un número diferente de componentes. Solamente el aceite esencial extraído en equipo de acero inoxidable tiene similitud con los parámetros de calidad del equipo estándar y puede recomendarse ampliamente para realizar extracciones a mayor escala. (2).

1.2. Método de extracción por arrastre de vapor

Según Ruiz, Jesús (3) , señala que método de arrastre de vapor, es uno de los métodos de extracción existentes (por hidrodestilación, por vapor saturado y por arrastre de vapor) para la obtención de aceite esencial. Consiste en separar por medio del aumento de temperatura las sustancias volátiles denominadas esencias de otras sustancias más fijas, para hacer pasar una corriente de vapor por un lecho de material vegetal, previamente picado. El vapor suele inyectarse por unos tubos inferiores al material vegetal provenientes de una caldera externa. El vapor provoca que los aceites esenciales migren desde la membrana de la célula hasta el exterior. Para que el valor de agua se evapore y regrese en fase líquida, para después separarse.

1.3. Ingeniería de proyecto del equipo de destilación optimizado

El proyecto de investigación, también busca diseñar un prototipo destilador optimizado para la obtención de aceites esenciales mediante el método por arrastre de vapor, para ello se planteó la construcción de los componentes principales y auxiliares, según las especificaciones técnicas establecidas. La implementación del equipo de destilación optimizado, tuvo una inversión estimada de S/. 686.5.

1.4. Diseño del equipo piloto de destilación optimizado

Para el diseño de prototipo de destilador optimizado, se consideró el dimensionamiento del equipo a escala 1/3, así como la optimización del proceso de extracción. Para ello, se hizo una descripción de cada uno de los equipos y/o componentes principales y auxiliares del equipo piloto, así como el diagrama de procesos que se siguió para la obtención del aceite esencial:

- Diseño y construcción de caldero
- Sistema de conducción a vapor
- Cápsula de extracción de material vegetal
- Sistema de enfriamiento

1.5. Orégano, origen y clasificación

En su estudio Chambe, Elizabeth (4)., señala *El Origanum vulgare*, es una planta herbácea vivaz, de la familia de las Labiadas, con tallos erguidos, prismáticos, vellosos, de cuatro a seis decímetros de altura, hojas pequeñas, ovaladas, verdes por el haz y lanuginosas por el envés, flores purpúreas en espigas terminales, y fruto seco y globoso. Por otro lado, Salas Fabio y Alagón Pluvia (5) señalan que el orégano es una planta herbácea sembrada mayormente en la costa y en la sierra peruana, despiden un aroma agradable debido a los aceites esenciales, contiene unas pequeñas glándulas donde está contenida la esencia aromática, compuesta por un estereo-terpeno y dos tipos de fenoles, principalmente carvacrol y en menor proporción timol. Según su tipo de corte, este se puede dar de 2 a 3 cortes dependiendo de la actividad agrícola que se aplica y según la floración que oscila entre el 15 y 20%. En este contexto, según la Tabla 3, una clasificación taxonómica del orégano y descripción morfológica, según detalle a continuación

Tabla 3. Clasificación taxonómica del orégano y descripción morfológica

Nombre científico:	<i>Origanum majorana</i> L.	<i>Origanum x aplii</i> Domin Boros	<i>Origanum majoricum</i> Cambessedes
Reino	Plantae	Plantae	Plantae
Subreino	Tracheobionta	Tracheobionta	Tracheobionta
División	Magnoliophyta	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida	Magnoliopsida	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae	Asteridae	Asteridae
Orden	Lamiales	Lamiales	Lamiales
Familia	Lamiaceae	Lamiaceae	Lamiaceae
Subfamilia	Nepetoideae	Nepetoideae	Nepetoideae
Tribu	Mentheae	Mentheae	Mentheae
Género	Origanum	Origanum	Origanum
Especie	Origanum majorana (20)	<i>Origanum x aplii</i> Domin Boros, (híbrido proveniente del cruzamiento de <i>Origanum majorana</i> x <i>O. vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i> .) (21)	<i>Origanum majoricum</i> Cambessedes, (Híbrido proveniente del cruzamiento de <i>Origanum majorana</i> x <i>O. vulgare</i> ssp. <i>virens</i> .)

1.5.1. Producción y rendimiento de orégano

La unidad de estadística del Ministerio de Agricultura y Riego, registra información hasta el año 2017, dando cuenta una superficie cosechada de 3865 hectáreas y su producción de 17445 toneladas en el país con una tendencia ascendente en los últimos quince años. El rendimiento de kg por hectáreas, llegan a 4514 kg/ha.

En el Perú la superficie cultivada y distribución geográfica del orégano, está presente principalmente en las Regiones del Sur como Tacna, Arequipa y Moquegua. En la región Moquegua, según el Minagri, señala que, en el 2017, la superficie cosechada de orégano, alcanzó 878 hectáreas y su producción alcanzó a 2,337.2 toneladas con una tendencia ascendente en los últimos quince años. El rendimiento de kg por hectáreas, llegan a 2662 kg/ha. La Superficie cultivada y distribución geográfica del orégano, nos señala que se encuentra en Torata y San Cristóbal, según el anuario estadístico

agropecuario de Moquegua (6). Por otro lado, por el rendimiento (Kg/ha), podemos destacar que se encuentra con San Cristóbal, Coalaque y Carumas respectivamente por cómo se observa en la Tabla 4.

Tabla 4. Moquegua, Producción, Superficie cosechada, rendimiento y precio de chacra de orégano

Región/ Provincia/Distrito	Superficie (ha)	Rendimiento (kg/ha)	Producción (Tn)	Precio (S/./kg)
Nacional	3865	4514	17445	9,17
Región Moquegua	878	2662	2,337.2	10.46
Provincia Mariscal Nieto	630	2605	1,641.3	10.61
Torata	193	1711	330.2	11.15
Carumas	141	3011	424.5	9.28
Cuchumbaya	129	2743	353.9	10.69
San Cristóbal	167	3190	532.7	11.29
Provincia Gral. Sánchez Cerro	248	2806	696.0	10.09
Coalaque	64	3048	195.1	9.65
Puquina	121			

1.6. Ecotipos de orégano y clasificación

Según Villanueva Karla, en su estudio “Caracterización molecular de los principales ecotipos de "Orégano" (*Origanum sp.*) en la región de Tacna”, (7) define que los ecotipos de especies del orégano, son fundamental para nuestro país, para determinar su proceso evolutivo en nuestro país y que tiene una acepción definida como variedades de orégano. Es decir, las especies difieren fisiológicamente y en ocasiones morfológicamente en distintas partes de dicho intervalo, formando ecotipos que presentan diferencias que le dan una particularidad debido a la presencia de factores exógenos (temperatura o altitud, intensidad de luz, tipo de suelo, pH, entre otras condiciones).

1.6.1. Comparación morfológica de variedades de estudio

En el presente estudio, abordaremos tres ecotipos de orégano, existentes y de mayor predominancia en el distrito de San Cristóbal, jurisdicción donde obtendremos las muestras de estudio, siendo la clasificación siguiente prevista en la Tabla 5, según detalle a continuación:

Tabla 5. Cuadro comparativo de características morfológicas de ecotipos de orégano

Características morfológicas (8)	Nigra: <i>"Origanum majoricun Cambessedes"</i>	Mejorana: <i>"Origanum majorana l."</i>	Chinito: <i>"Origanum x aplii Domin Boros"</i>
Tallos	Tallos erectos, delgados, ascendentes mayores a 50 cm de longitud, de color marrón claro, hirsutos, con tricomas astrosos de 0,3 mm de longitud, con poca pilosidad (53 tallos por planta).	Tallos erectos, Gruesos y abundantes ascendentes, menores de 50 cm y de color marrón claro (70 tallos por planta), densamente cubiertos por tricomas antrorsos, de 0,5 mm de longitud, incoloros (comunican coloración plateada a toda la planta).	Tallos erectos, delgados ascendentes, mayores de 50 cm de longitud, de color marrón, hirsutos, con tricomas antrorsos menores de 0.2 mm de longitud lo que hace que tenga escasa presencia de pilosidad (48 tallos por planta).
hojas	Las hojas son opuestas, ovadas, vellosas, pecioladas, medianas y pequeñas de 9 x 5mm, de color verde claro, Hojas más de 10 pares por tallo, sésiles o cortamente pecioladas (peciolos de 2 mm), Las espigas generalmente son cilíndricas llegando a los 20 mm de largo por 5 mm de ancho.	Hojas obovadas, estrechándose hacia el pecíolo, margen liso, ondulándose levemente hacia el ápice grandes, de color verde claro, enteras, pecioladas, de 5-25 mm de largo, obtusas. Hojas más de 10 pares por tallo, con tricomas antrorsos, de 0,3 mm de longitud, escasos pelos glandulosos.	Hojas brevemente pecioladas, ovadas, de margen con pecíolos de hasta 4mm de longitud, láminas enteras a subdentadas, ovadas a elípticas, obtusas de 8-20mm de long. X 3-9mm de ancho. Hojas más de 15 pares por tallo, de color verde intenso con tricomas simples y glandulosos abundantes en ambas caras de alrededor de 0,5

			mm de longitud como máximo.
ramas	Ramas de primer ordenes presentes, más de 16 pares por tallo, de 3 a 15 cm de longitud, ramas de segundo orden presentes, muy cortas de 2 a 3 cm de longitud.	Ramas de segundo ordenes presentes, más de 10 pares por tallo, de 11 (3-20) cm de longitud y las de tercer orden, generalmente ausentes.	Ramas de primer orden presentes hacia la mitad superior del tallo, más de 10 pares por tallo de 6 (1-10) cm de longitud, ramas desegundo orden generalmente ausentes; si están presentes son muy cortas.
Inflorescencia.	Inflorescencia de cima corimbiforme con espicastro globoso, con brácteas verdes, de 4,5 (3,3-4,8) mm de longitud, aproximadamente y $\frac{3}{4}$ partes de la corola. poco compacta y con flores de color blanco.	Inflorescencias de aspecto racimoso, con espigas casi esféricas. Brácteas florales imbricadas, verdes de 3,5 (3-4) mm de longitud por 1,5 (1,3-1,7) mm de ancho, aproximadamente $\frac{3}{4}$ de la corola, no compacta, con flores de color blanco o rosasas, rojizas o violáceas.	Inflorescencia en epicastro o cima muy contraídas, a modo de espigas terminales densas, con brácteas verdes, punteadas, con glándulas y pilósulas (tricomas simples, menores de 2 mm de longitud) margen apical coloreado y cóncavo, con 3,8 - 3,5 mm de longitud por 2-2,5 mm de ancho, aprox. $\frac{1}{2}$ de la corola, con flores de color blanco, poco compacta y aparece en 6 meses.
cáliz	Cáliz de 2,8 a 3 mm de longitud, bilabiado, con los dos lóbulos superiores sensiblemente	Cáliz profundamente hendido longitudinalmente, 2-lobulado, 2 mm de long. Por 2,5 mm de ancho con margen	Cáliz de 2,6 a 2,4 mm de longitud, aproximadamente $\frac{1}{3}$ de la corola, bilabiado, los dos lóbulos del labio

Figura N° 1. Características morfológicas de ecotipos de orégano, de izquierda a derecha: Nigra, Mejorana y Chinito



1.7. Aceite esencial y sus características morfológicas

En su estudio Martínez Alejandro (9), señala que el aceite volátil y oloroso de la planta, producido por glándulas secretoras o células especializadas dentro del tejido vegetal o bien en la superficie de esta. Los aceites esenciales son el resultado del metabolismo secundario de las plantas. Son mezclas muy complejas que juegan un papel imprescindible en la naturaleza como antibacterianos, antivirales, antifúngicos e insecticidas. Los aceites esenciales son extraídos utilizando distintos métodos como: hidro destilación, destilación por arrastre de vapor, para el presente estudio, enfatizaremos el método de destilación por arrastre de vapor.

Por otro lado, Bakkali F., et al (10), en su estudio, refiere que los aceites esenciales se caracterizan por tener 2 o 3 tipos de componentes en mayor proporción (20% a 70%) en comparación con otros componentes, que se encuentran en trazas, generalmente, estos compuestos mayoritarios determinan las propiedades biológicas del aceite esencial. El grupo mayoritario de componentes de los aceites esenciales son los terpenos (generalmente monoterpenos y sesquiterpenos), mientras que otros grupos,

están constituidos por compuestos aromáticos y alifáticos con grupos funcionales como alcoholes, aldehídos, ésteres y cetonas.

Un aspecto importante de la producción de orégano en el sur del Perú, es que se da con énfasis en las regiones de Tacna, Arequipa y Moquegua, según refiere Villavicencio, Jorge (11). Asimismo, podemos señalar que es en el distrito de San Cristóbal en Moquegua, donde se da la mayor producción y exportación en los últimos años. En vista de ello, en esta investigación, se ha procurado caracterizar los perfiles químicos y fisicoquímicos de genotipos existentes en dicha jurisdicción, tomando otros antecedentes de estudios, según la clasificación de genotipos de orégano.

Tabla 6. Cuadro comparativo de características morfológicas de ecotipos deorégano

Nombre Científico	Principales componentes
" <i>Origanum majoricum Cambessedes</i> "	<i>terpineno, o-cimeno, cis-terpineol, acetato de linalol, timol, carvacrol, -cariofileno, -elemeno</i>
" <i>Origanum majorana L.</i> "	<i>-terpineno, -terpineol, terpinen-4-ol, carvacrol metil éter, Timol</i>
" <i>Origanum x aplii Domin Boros</i> "	<i>o-cimeno, -terpineno, cis-terpineol, timol, carvacrol, -cariofileno y elixeno.</i>

1.8. La actividad antimicrobiana

Un antimicrobiano es un agente que interrumpe una función microbiana presentando a la vez una toxicidad selectiva. Estos agentes (antibióticos) son producidos por microorganismos, tienen diferentes espectros de inhibición, muchos son efectivos solo contra una variedad limitada de patógenos mientras otros son de amplio espectro, es decir atacan diferentes clases de patógenos. El modo de acción de los AE también dependerá del tipo de microorganismos y está principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos.

Según afirma Salinas, Roger, en su estudio (12), que los efectos antimicrobianos estos efectos están relacionados con los componentes químicos presentes, la mayoría de los



estudios han encontrado que los AE son efectivos contra numerosas bacterias patógenas Gram (+) y Gram (-), mohos, levaduras, siendo los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos los posibles responsables de las propiedades aromáticas, antioxidantes y antimicrobianas de los aceites esenciales.

Existen dos técnicas básicas usadas, el método de difusión en agar y el método de diluciones. Actualmente se sabe que los aceites esenciales derivados de las plantas y especias tienen efectos antimicrobianos.

1.9. Pruebas in vitro

Las pruebas in vitro, son técnicas realizadas para determinar pruebas organismos vivos en un ambiente controlado, usualmente se utiliza tubos de ensayo y placas Petri. Su definición proviene del latín: In vitro (dentro del vidrio), su definición complementaria se refiere a la experimentación hecha dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo. Es a menudo más apropiado para la observación de efectos finales y totales para un experimento en el sujeto viviente. Aunque en la biología molecular, in vivo se refiere a experimentación a nivel celular, donde estas pueden ser rotas y analizadas.

1.10. Tinción de Gram

Consiste en un método de identificación de microorganismos mediante un tratamiento con colorantes determinados. Este método permite la diferenciación de los microorganismos en dos grupos: Gram positivos y Gram negativos. Se basa en la diferencia del color de las membranas de las células sometidas al proceso de tinción.

Según online, Lab tests (13), señala dentro del fundamento del protocolo de tinción, es que ciertas bacterias retienen un colorante complejo (Azul de Metileno o Cristal Violeta) cuando son expuestas a disolventes orgánicos como la Acetona o el Alcohol. El complejo es formado entre el yodo (Lugol) y un colorante de anilina (Cristal Violeta). Los tejidos no retienen este complejo y necesitan de una contra tinción, o tinción de contraste, con un tinte rojo para ayudar a la visualización.

1.11. Cepas bacterianas

Una cepa es un conjunto de células homogéneas, o clones, que deriva de la reproducción de una célula inicial única, seleccionada y aislada. También suele referirse a las cepas como colonias puras de bacterias.

Tabla 7. Cuadro comparativo de características morfológicas de Cepas Bacterianas

Gram positivos	Gram negativos
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Streptococcus hemolitico (A,B,G)</i>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<i>Streptococcus grupo viridans</i>	<i>Acinotenacter sp.</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Brucella sp.</i>
<i>Enterococcus pneumonine</i>	<i>Campylobacter fetus</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Haemophilus influenza</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Klebsiella pneumonia</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Legionella pneumonia</i>
	<i>Proteus mirabilis</i>
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
	<i>Salmonella typhi</i>
	<i>Serratia marcescens</i>
	<i>Shigella sp.</i>
	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Yersinia pestis</i>

Clasificación de las bacterias

Las bacterias pueden clasificarse como bacterias Gram positivas y Gram negativas y cada una de ellas tiene distintas clasificaciones, y/o familias, el objeto del presente estudio, tomaremos en cuenta las bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*.

a. Bacterias Gram Positivas

Las bacterias Gram positivas, son un grupo de organismos procariotas que se tiñen de azul oscuro o de violeta cuando se emplea la tinción de Gram Según. Villalobos Karla, (7) en su estudio, señala que las bacterias Gram positivas, tienen como característica principal, que se tiñen de azul oscuro o de violeta cuando se le somete a la tinción de Gram. Esto es debido a que presentan varias capas de peptidoglicanos entrecruzadas

entre ellas formando un fuerte andamiaje que es el que retiene el tinte durante dicho proceso, y que conforma la pared celular.

Dentro del género de bacterias Gram positivas contienen patógenos: *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Bacillus* y *Clostridium*.

b. Bacterias Gram Negativas

Según Farrar-Stoakes, Shelley (14), señala que las bacterias Gram negativas son a menudo patógenas y contienen las endotoxinas dentro de sus membranas exteriores. La estructura de la pared celular de bacterias Gram negativas tienen la capacidad creciente de resistir los antibióticos. *Escherichia coli* es un ejemplo de una bacteria Gram negativa común.

Por otro lado, Larry M, Bush (15), refiere que las bacterias Gram negativas, están encerradas en una cápsula protectora. Esta cápsula ayuda a evitar que los glóbulos blancos (que combaten las infecciones) ingieran las bacterias. Bajo la cápsula, las bacterias Gram negativas tienen una membrana externa que las protege contra ciertos antibióticos, como la penicilina. Al deteriorarse, esta membrana libera sustancias tóxicas llamadas endotoxinas, que contribuyen a la gravedad de los síntomas en las infecciones por bacterias Gram negativas.

Las bacterias Gram negativas pueden causar muchas infecciones graves, como neumonía, peritonitis (infecciones en la herida o el sitio quirúrgico) y meningitis.

1.11.1. *Staphylococcus aureus*

Según Gabancho, Pablo (15), en su estudio señala que los *Staphylococcus spp*; son células esféricas o cocos Gram positivos (de 0,5 a 1.5 μm de diámetro) inmóviles, no forma esporas; generalmente están dispuestas en forma de racimo irregulares parecido a racimo de uvas. Los estafilococos, crecen con facilidad en todos los medios de cultivo en condiciones aeróbicas o microaerófilas.

El género *Staphylococcus* contiene al menos más de 32 especies y varias subespecies, las especies de importancia clínica solo son algunos. Los

estafilococos según produzcan o no la enzima coagulasa, se dividen en dos grandes grupos: *Estafilococos* Coagulasa Positivos (ECP) y *Estafilococos* Coagulasa Negativos (ECN). Existe una buena correlación entre la producción de coagulasa y la capacidad patógena de los *estafilococos* de tal manera que, en general, se considera que los ECP son patógenos y que los ECN no lo son. No obstante, algunas especies de ECN se han relacionado con procesos patológicos tanto en animales como en el hombre.

El género *Staphylococcus* dentro de su importancia clínica se clasifica en tres sub especies principales: *Staphylococcus aureus* (ECP), *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus* (ECN) asociadas a enfermedades humanas.

Es una bacteria con una fácil adaptación por lo mismo infecta al hombre por que se encuentra en el mismo medio ambiente, ciertas áreas de la flora normal de mucosa y piel. La Taxonomía de esta bacteria es = Filo: *Firmicutes*, Orden: *Bacillales*, Familia: *Staphylococcaceae*, Clase: *Schyzomicetes*, Género: *Staphylococcus*, Especie: *aureus*.

Es un coco Gram (+) con ausencia de movilidad, tampoco forma esporas. Son anaerobias, pero se desarrollan mejor en condiciones aerobias y se reproducen rápidamente en medios con agar sangre. Las colonias llegan a medir 1 a 3 mm y tienden a presentar un color amarillento por la presencia de carotenoides y produce hemolisis 24 a 36 horas.

Por otro lado, Choque-Yapu, Mariela (16), en su estudio señala que la patogenicidad del *Staphylococcus aureus* está ampliamente relacionada con los componentes del patógeno como el ácido teicoico, péptidoglicanos y proteínas A. es así que la combinación de la disminución de las defensas más los factores de virulencia, condiciona que el estafilococo tenga características de virulencia y causa daño.

1.11.2. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae, es un coco Gram positivo, catalasa y oxidasa negativo, anaerobio facultativo, que se presenta formando cadenas de longitud variable. El *Streptococcus agalactiae* puede crecer en medios simples, aunque los medios suplementados con sangre o suero favorecen su

crecimiento. Tras 18-24 horas de incubación en agar sangre, las colonias son de unos 2 mm de diámetro, lisas y rodeadas por un halo de Beta-hemólisis, aunque existen algunas cepas no hemolíticas.

Asimismo, Sánchez- Loza, Jessica (17), señala que etimológicamente “Streptus” significa flexible y “coccus” significa grano o baya. Los géneros *Streptococcus* están formados por bacterias esféricas u ovoides que crecen en pares o cadenas de longitud variable. La mayoría se caracteriza por ser anaerobios facultativos, existiendo algunas especies anaerobios obligados. Además, son Gram positivos, no formadores de esporos, catalasa negativa e inmóvil, y tienen complejos y variables requerimientos nutricionales.

1.11.3. *Escherichia coli*

Según, Larry M, Bush (15), Señala que *Escherichia coli* (*E. coli*) es un grupo de bacterias Gram negativas que residen habitualmente en el intestino de personas sanas, pero algunas de sus cepas pueden provocar infección del tubo digestivo, las vías urinarias o muchas otras partes del organismo.

E. coli pueden causar infecciones fuera del intestino si este está desgarrado (perforado) o dañado, por ejemplo, por una lesión o una enfermedad, como la enfermedad inflamatoria del intestino. En ese caso, las bacterias pueden abandonar el intestino y extenderse a las estructuras cercanas, que no tienen defensas contra ellas, o pueden entrar en el torrente sanguíneo.

Por otro lado, Flores-Palacios, Katia et al, (18), señala que es el microorganismo procariota más estudiado por el ser humano, se trata de una bacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales, por ende, en las aguas negras. Fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore Von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente la taxonomía le adjudicó el nombre *Escherichia coli*, en honor a su descubridor.

Ésta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de producir las vitaminas B y K. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción de Gram (Gram negativo).

Es un anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), con un tamaño promedio de 1,1 - 1,5 μm de ancho y 2,0 - 6,0 μm de largo, no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. Es una bacteria utilizada frecuentemente en experimentos de genética y biotecnología molecular.

1.12. Resistencia antibacteriana

La resistencia a los antibióticos es la capacidad de un microorganismo de resistir los efectos de un antimicrobiano. La resistencia puede ser producida por selección natural, como producto de mutaciones ocurridas al azar, o puede inducirse mediante la aplicación de presión selectiva a una población, según los refiere Abreu O et al. (19).

Asimismo, Torrades, Sandra (20), señala que las bacterias estas pueden adquirir resistencias ante un antibiótico por dos mecanismos: mediante mutaciones específicas del genoma del propio microorganismo, o mediante la adquisición de nuevos genes procedentes de otras bacterias. Por otro lado, es necesario precisar que en una población bacteriana sensible a este antibiótico aparece una bacteria mutante resistente o una de las bacterias adquiere un gen de resistencia; la presencia del antibiótico provoca la muerte de las bacterias sensibles, favoreciendo el crecimiento de las bacterias resistentes, que pasan a ser la población dominante.

Por otro lado, Fernández, Fernando (21), señala que desde el punto de vista clínico se considera que una bacteria es sensible a un antibacteriano cuando la concentración de este en el lugar de la infección es al menos 4 veces superior a la concentración inhibitoria mínima (CIM). Una concentración por debajo de la CIM califica a la bacteria de resistente y los valores intermedios como de moderadamente sensibles.

1.13. Antibiograma

Los antibiogramas son ensayos in vitro realizados en laboratorio bajo condiciones específicas y estandarizadas. Independiente del método seleccionado, se debe escoger un medio de cultivo que permita un buen desarrollo del microorganismo, determinar con facilidad su sensibilidad y además no debe ejercer ninguna secuela de inhibición sobre la actividad antibacteriana de los antibióticos. (22).

1.14. Clasificación de resistencia antimicrobiana en Microorganismos

Los microorganismos pueden clasificarse en:

- a) **Sensibles:** Cuando la concentración mínima inhibitoria de un antibiótico para una bacteria se puede conseguir in vivo con dosis terapéuticas y la experiencia ha demostrado su eficacia.
- b) **Resistentes:** Cuando el microorganismo no es inhibido por las concentraciones que normalmente se pueden obtener en el sitio de la infección.
- c) **Intermedios:** Cuando las bacterias se inhiben con concentraciones que no se alcanzan con dosis habituales, pero que pueden alcanzarse con dosis más altas sin que sean alteradas.

1.15. Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Los métodos de dilución, son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) y son pruebas de sensibilidad antimicrobiana a través de concentraciones del compuesto a evaluar, las cuales son mezcladas con el caldo, que posteriormente es inoculado con el microorganismo e incubado.

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana, pueden clasificarse en métodos cualitativos (métodos de difusión) y cuantitativos (métodos de dilución). Los métodos de difusión se basan en la inhibición del crecimiento bacteriano en el agar al estar presente una sustancia con actividad biológica frente al microorganismo. En los métodos de difusión se emplea un medio de cultivo con agar, el cual, previo a su solidificación, es inoculado con el microorganismo.

Según Rodríguez - Valencia, Irene, (23). en su estudio, señala que la actividad antimicrobiana se observará como ausencia de turbidez que indica inhibición del crecimiento. Este ensayo puede ser realizados mediante micro y macro dilución, que son adversas concentraciones del compuesto colocados en microplacas o tubos, en las que se añade el microorganismo. El crecimiento de los microorganismos se indica por la presencia de turbidez microplacas o tubos.

1.15.1. Concentración Mínima Inhibitoria

Según, Neira-Llerena, Javier (24), en su estudio, señala que la CMI, o concentración mínima inhibitoria, es la concentración más baja (en $\mu\text{g/ml}$) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana, según refiere en su estudio Neira-Llerena, Javier.

Por otro lado, Suquilanda, Irene (25), señala que la CMI, es la base de la medida de la susceptibilidad de una bacteria a un determinado antimicrobiano. Se define como la menor concentración de una gama de diluciones del antimicrobiano que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteria no visible. Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antimicrobiano frente a las bacterianas.

La CMI presenta una interpretación de la sensibilidad: S (sensible), I (intermedia) o R (resistente), seguido de la CMI en $\mu\text{g/ml}$. "Sensible" significa que el crecimiento del microorganismo está inhibido a la concentración sérica del fármaco que se alcanza utilizando la dosis habitual; "intermedia" significa que el crecimiento del microorganismo está inhibido solamente a la dosis máxima recomendada y "resistente" significa que el microorganismo es resistente a los niveles séricos del fármaco que se alcanzan normalmente. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C .

1.15.2. Concentración Mínima Bactericida

La Concentración Mínima Bactericida (CMB), se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas).

Por otro lado, De los Ángeles-Méndez, Emilce (26), señala que la CMB, se determina subcultivando, todos los tubos por encima de la CMI, sobre un medio de cultivo agarizado libre de antibióticos (generalmente el agar nutritivo). Por otro lado, un agente es considerado bactericida cuando la CMB para ese Agente Antimicrobiano es 2 a 4 veces la CMI. Sin embargo, la CMB

está sujeta a variaciones surgidas de la aplicación de las técnicas y tiene algunas limitaciones teóricas.

1.16. Antibióticos

Los antibióticos son sustancias producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que suprimen la proliferación de otros gérmenes y al final pueden destruirlo; el uso común ha ampliado el término antibióticos a los antibacterianos sintéticos (no son sintetizados por microbios) como las sulfonamidas y las quinolonas. Asimismo, Molina- Vallejos, Gloria Mercedes (27), en su estudio, refiere que los antibióticos, tienen diferentes propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como diferentes mecanismos de acción y espectros antibacterianos; se han identificado cientos de antibióticos y muchos de ellos sirven para tratar enfermedades infecciosas.

El antibiótico actúa por mecanismos diferentes en función de su naturaleza, y su objetivo es bloquear la proliferación de las bacterias inhibiendo alguno de los pasos de su desarrollo. Los antibióticos se prescriben en caso de infecciones bacterianas únicamente, y pueden utilizarse más de uno para tratar algunas infecciones severas. Los antibióticos se deben prescribir de forma correcta, ya que las bacterias desarrollan mecanismos de resistencia a los antibióticos que reducen su eficacia, según refiere el Ministerio de Salud (28).

Para el presente objeto del estudio, se tomará en cuenta los antibióticos que, por su estructura química, se clasifican en Betalactámicos: Cefalosporinas (Ceftriaxona) y Aminoglucósidos: Estreptomina y Amikacina.

1.16.1. Amikacina:

El sulfato de Amikacina es un antibiótico de la familia de los aminoglucósidos semisintético, derivado de la kanamicina.

El espectro de actividad antimicrobiana de Amikacina es el más amplio de los amino glucósidos, tiene una resistencia a la enzima que inactiva a este grupo. La Amikacina está indicada para el tratamiento de infecciones causadas por gérmenes susceptibles como: Gram negativos (*Escherichia coli*, *Proteus*,

Providencia sp, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia sp*, *Acinetobacter sp* y *Citrobacter freundii*.) Gram positivos: Amikacina es activa, in vitro, en contra de especies de *estafilococos* productores y no productores de penicilinas, incluyendo las cepas resistentes a la meticilina. (*Streptococcus pyogenes*, *enterococos* y *Streptococcus pneumoniae* (anteriormente *Diplococcus pneumoniae*).

1.16.2. Ceftriaxona:

Ceftriaxona es un antibiótico que forma parte de la familia Cefalosporinas, de tercera generación, con acción bactericida contra numerosos microorganismos Gram negativos y Gram positivos. Su actividad bactericida se debe a la inhibición de la síntesis de la pared celular.

En general, es menos activa contra cocos Gram positivos que las cefalosporinas de primera generación, pero es mayor su actividad contra las Enterobacterias, dentro de ellas destacan: *Neisseria gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp* y *Klebsiella sp*.

1.16.3. Estreptomycin:

Es un antibiótico que forma parte de la familia de aminoglucósido, es activo frente a gran número de bacterias Gram negativas, tales como *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Proteus spp*, *Providencia spp*, *Serratia spp*, *Citrobacter spp*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Brucella spp*, *Neisseria meningitides*, *N. gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *H. ducreyi*, *Pasteurella multocida*, *Campylobacter spp*, *Yersina spp* (incluyendo *Yersina pestis*), y *Yersina enterocolica*.

	menores que los 3 superiores, aprox. ½ de la corola.	apenas ondulado en la zona apical, aproximadamente ½ de la corola.	superior algo menor que los tres del labio inferior.
corola	Corola bilabiada blanca, aprox. 5-5,4 mm de longitud. Androceo, con estambres ligeramente exertos, de 3,8 y de 5,5 mm de longitud. Gineceo de 5,5 mm de longitud. Se reproduce por división de mata.	Corola de 4,2 (3-5) mm de longitud blanco o rosado pálida, con el labio superior con 2 lóbulos y el inferior con 3. Androceo con estambres cortamente exertos, con filamentos mayores de 4 y 5 mm de longitud. Gineceo de más de 9 mm de long. Se reproduce por semilla.	Corola rosado pálida a rojo-vinoso aguado, aproximadamente 7 mm de longitud. labio superior emarginado, labio inferior trebolado con lóbulos obtusos Androceo con estambres brevemente exertos, de 7,5 mm y 9 mm. Gineceo 9 mm de longitud, es producto de la hibridación y no se encuentra semilla.
Propósito	Simple es decir solo se puede utilizar para la producción de hoja seca.	Doble, es decir, produce tanto hoja seca como flor seca.	simple es decir solo para la cosecha de hoja seca a los 5 meses.
Aroma	Su aroma es característico persistente.	Su aroma es característico persistente.	su aroma es muy suave y agradable al gusto.
Cosecha	A los 4 meses.	A los 4 meses las hojas y a los 5 meses las flores.	a los 4 meses.
Otras características	Sensible al ataque de la enfermedad de <i>Oidium sp</i> , <i>Fusarium sp</i> y <i>Alternaria alternata</i> .	Resistente al ataque de la enfermedad de <i>Oidium sp</i> , pero no soporta las bajas temperaturas.	Sensible al ataque de <i>Oidium</i> , sus flores tienen menor peso y presenta poca inflorescencia.

Por otro lado, Villalobos, Karla en su estudio (7), señala que los oréganos que se producen en el Perú (Chinito o Zambito y Nigra) son híbridos que provienen del cruzamiento de la Mejorana (*Origanum majorana L.*) con las

subespecies del orégano *vulgare* y *virens*. Por lo tanto, el orégano Chinito o Zambito sería el *Origanum x aplii Domin Boros*, proveniente del cruzamiento de *Origanum Majorana L.* con *Origanum L. vulgare ssp vulgare*; y el orégano Nigra sería el *Origanum majoricun Cambessedes*, proveniente del cruzamiento de *Origanum majorana L.* con *Origanum vulgare ssp. virens*. (Véase figura N° 1).



CAPÍTULO II

2.-MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar de Ejecución

El presente trabajo de investigación denominado “Evaluación de la efectividad antibacteriana de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano frente a tres cepas de amplio espectro”, presenta tres locaciones para su desarrollo: 1) El recojo de material vegetal se realizó en el distrito de San Cristóbal de Calacoa ubicada a 3458 m.s.n.m, Provincia Mariscal Nieto, Región Moquegua. 2) Los ambientes utilizados para el proceso del análisis experimental del estudio están ubicados en las instalaciones del laboratorio del Instituto Médico “Imed Carrión”, ubicado en la Av. Simón Bolívar S/N Urb. El Huayco Mz C-Lote 04, del distrito de Moquegua, Provincial Mariscal Nieto. 3) Los ambientes para el proceso de construcción y ensamblaje del diseño a escala del equipo de destilación optimizado, se realizó en los ambientes de la empresa “estructuras metálicas” ubicada en la calle Elías Aguirre N° 501 – Distrito Mariano Melgar

2.2. Materiales

Los materiales que fueron usados para cumplir con la finalidad del estudio denominado “Evaluación de la efectividad antibacteriana de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano (*Origanum x aplii* Domin Boros) Chinito; (*Origanum x majoricum* Cambessedes) Nigra; (*Origanum majorana* L.) Mejorana, frente a tres cepas de amplio espectro, se detallan a continuación:

2.2.1. Material biológico (Cepas microbianas, líneas celulares, organismos) Cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*: 01 cepa/agente.

Antibióticos convencionales: 0.03g (30 μ L) Amikacina, 0.3 g (300 μ L) Estreptomina, 0.03 g (30 μ L) Ceftriaxona: 03 discos/antibiótico.

2.2.2. Insumos

11190 g de ecotipo de orégano: *Origanum x aplii* Domin Boros Chinito.

7670 g de ecotipo de orégano: *Origanum majorana* L. Mejorana.

9570 g de ecotipo de orégano: *Origanum majoricum* Cambessedes Nigra.

2.2.3. *Reactivos químicos*

En el instrumento de comparación del inóculo para cada bacteria, se utilizó la escala de Escala de McFarland, dentro de los cuales incluye los siguientes reactivos químicos:

Ácido Sulfúrico (1%) Cloruro
de Bario (1,175%) Peróxido
de hidrogeno (30%) Glicerina
(3%)
Alcohol isopropílico (99,9%) 2-propanol o isopropanol

2.2.4. *Materiales de laboratorio (vidrio, porcelana, metal, etc.)*

Pera Decantación x 250mL
Matraz Erlenmeyer x 500mL
Tubos de ensayo 13x100 mm
Tips amarillos (20-200 µL)
Tips azules (100-1000 µL)
Micropipetas (0.5-1000 µL)
Probetas (250 -500 mL)
Baguetas
Placas Petri de 100 x 15mm
Asa siembra Kolle
Vasos precipitados (Beaker)100 mL
Gradilla
Discos Sensibilidad (amikacina, estreptomicina, ceftriaxona)
Kit Coloración Gram
Alcohol isopropílico x 1L
Papel Crapf
Papel para lentes microscopio
Aceite Inmersión x 50mL
Placas Agar Sangre x 10 und.
Placas Manitol Salado x 10 und. Agar Muller-Hinton x 500 g Agar Mac-
konkey x 500 g
Caldo Peptonado x 500 g
Escala Mac-Farland
Tubos c/ Agar TSI, U, CS. x 90 und.

2.2.5. *Aparatos y equipos*

- Baño María Marca Kintel (1 unidad) *
- Incubadora Marca digisystem (1 unidad) *
- Refrigeradora Marca Indurama (1 unidad) *
- Microscopio óptico Marca Greetmed (1 unidad)
- * Destilador de Agua Biolab (1 unidad) *
- Autoclave Marca Greetmed (1 unidad)
- * Termómetro Kyntel (1 unidad) *
- Balanza Electrónica Marca Henkel (1 unidad) *
- Diseño y ensamblado de Prototipo Destilador Arrastre Vapor

2.2.6. *Software*

El software estadístico que usamos para la presente investigación, es el Minitab 17: software estadístico, que permite examinar datos actuales y pasados, establecer tendencias, predecir patrones y relaciones de variables de estudio.

2.2.7. *Otros Ventilador*

- Mechero
- Bunsen
- Balón de Gas

2.3. *Métodos*

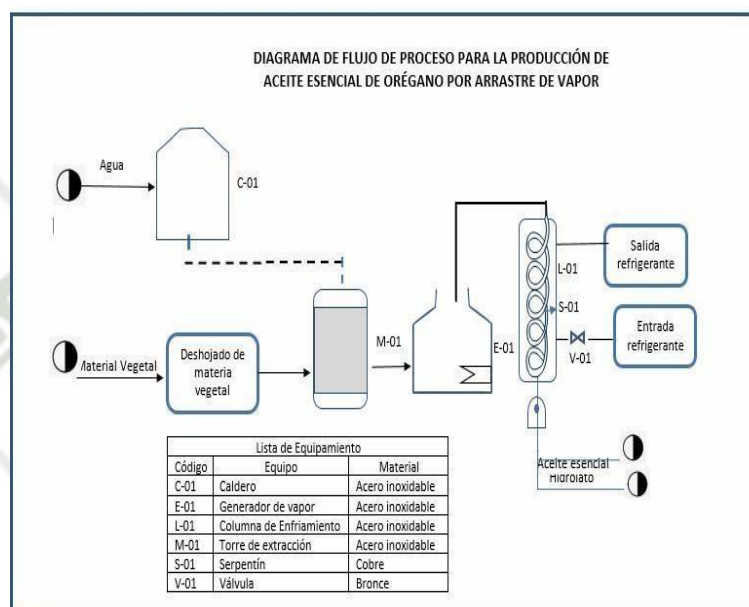
2.3.1. *Evaluación de los tiempos de extracción y costos de diseño de un prototipo de destilador mediante arrastre de vapor*

a) **Diseño de equipo de escala a partir fundamentos de la operación unitaria de destilación por arrastre de vapor:**

Partiendo de la definición de Hidalgo, Gilda & Romero, Ana 2016 (29) señala que “la planta piloto, detallan las características de operación, función, especificaciones del equipo principal y secundarios que deben cumplir cada uno en el proceso”.

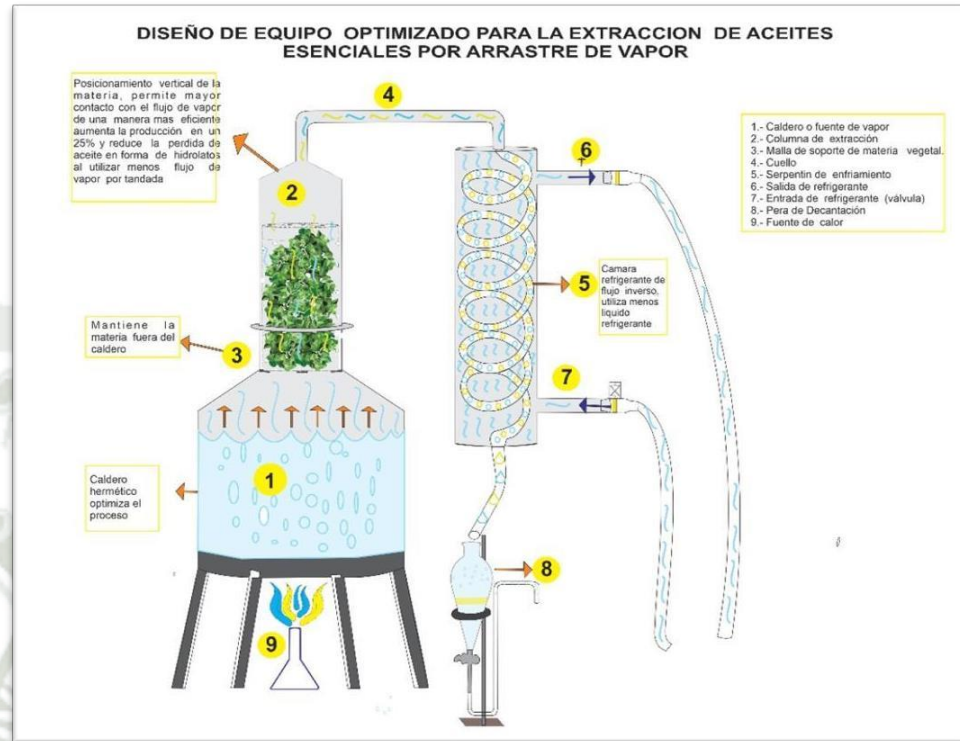
Se determinó un diagrama de flujo de proceso de producción de aceite esencial para explicar el proceso a seguir para la obtención del aceite esencial objeto del estudio. Que va desde el deshojado del material vegetal y su proceso seguido en cada componente del equipo destilador hasta la obtención del hidrolato y el aceite esencial. (Véase figura N° 2).

Figura N° 2. Diagrama de Proceso de producción de aceite esencial



Asimismo, se diseñó la estructura del equipo destilador y de sus componentes, determinando las especificaciones técnicas y su codificación: C01- Caldero; E01: Generador de Vapor; L01: Columna de enfriamiento; M01: Torre de extracción; S01: Serpentín; V01: Válvula. (Véase figura N° 3).

Figura N° 3. Diseño de principales equipos y especificaciones técnicas a escala 1/3 de Caldero



Asimismo, en este proceso se realizó el diseño a escala de 1/3 cm, de cada uno de los componentes del prototipo destilador: Caldero; Sistema de Conducción de vapor; Cápsula de extracción de material vegetal y Sistema de enfriamiento, con sus respectivas especificaciones técnicas. (Véase figura N° 4, figura N° 5, figura N° 6 y figura N° 7).

Figura N° 4. Diseño y especificaciones técnicas a escala 1/3 de Caldero



Especificaciones técnicas del Caldero

Material: Acero inoxidable de grado alimenticio AISI 316L de 1mm de espesor
 Diámetro de base de caldero :250 mm.
 Altura total del caldero: 250 mm.
 Diámetro de cuello de caldero: 100 mm.
 Altura de cuello de caldero:50 mm

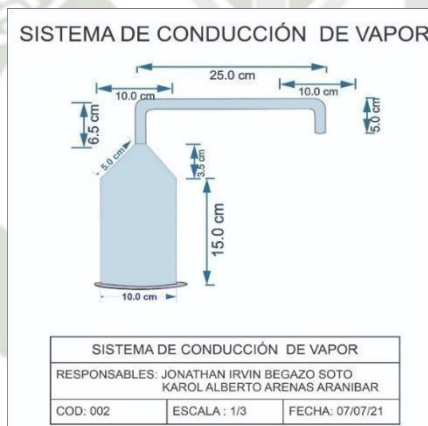
Figura N° 5. Diseño y especificaciones técnicas a escala 1/3 de Cápsula de extracción de material vegetal



Especificaciones técnicas de capsula de extracción

Material: Acero inoxidable de grado alimenticio AISI 316L de 1.0 mm de espesor
 Diámetro de base de capsula :95 mm
 Altura total de capsula: 160 mm
 Diámetro superior de capsula: 89 mm
 Diámetro interno de tapa de superficie: 90mm
 Diámetro externo de tapa de superficie: 97mm
 Altura de tapa de superficie: 20 mm

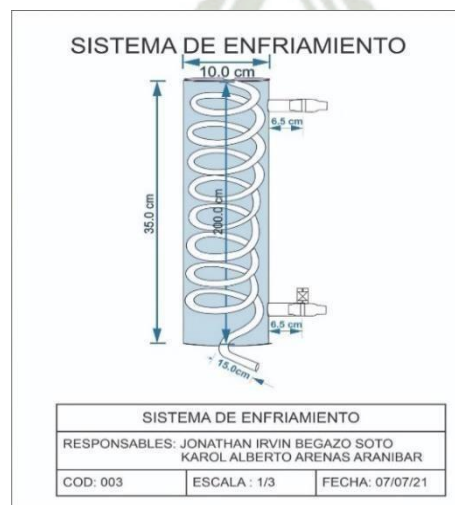
Figura N° 6. Diseño y especificaciones técnicas a escala 1/3 de sistema de Conducción de vapor



Especificaciones técnicas Sistema de conducción de vapor (capitel modificado)

Material: Acero inoxidable de grado alimenticio AISI 316L de 3.0mm de espesor
 Diámetro de base del capitel modificado:100 mm
 Altura del capitel modificado: 185 mm
 Altura total del sistema de conducción de vapor: 65 mm
 Longitud del sistema de conducción de vapor :250 mm

Figura N° 7. Diseño de principales equipos y especificaciones técnicas a escala 1/3 de sistema de enfriamiento



Especificaciones sistema de enfriamiento

Material: Acero inoxidable de grado alimenticio AISI 316L de 2.0mm de espesor
 Diámetro de la base :100 mm
 Altura total de sistema: 350 mm
 Serpentin de sistema: 2000 mm
 Material de serpentin: tubo de cobre de media pulgada y 1 mm de espesor
 Tubo de salida: 150 mm
 Distancia válvula de entrada: 65 mm
 Distancia válvula de salida: 65 mm
 Llave de ingreso de refrigerante: ¼
 Salida de refrigerante Acople de bronce 3/8 x 3/8
 Entrada de refrigerante (válvula) Acople de bronce 3/8 x 3/8, con válvula de ¼.
 Niple mixto de 3/8 x 1/4

Asimismo, se hizo un registro detallado de los accesorios auxiliares a utilizar en el funcionamiento del equipo destilador.

Mechero Bunsen / fuente de calor de Acero/ llama permanente/ Altura total: 150 mm.

Bomba de agua Sumergible: JEBO/ AP 333/AC 230-240V 50 Hrz 2.5W de 4cm x 4 x 3 cm.

Pera de decantación: NORMAX 250 mL.

Soporte universal: Varilla de acero cromado. /Soporte con varilla de 500 mm de longitud: Base rectangular dimensiones 100x175 mm.

Soporte de caldero de Acero / 25 cm. x 20 cm.

Mangueras de silicona: Polietileno/ 1.5 m.

b) Selección los materiales para la construcción del equipo de destilación (inox y cobre):

Se seleccionó el material de acero inoxidable de grado alimenticio AISI

316L de 3mm, 2mm y 1mm, asimismo el tubo de cobre ½in de 1 mm de espesor. La selección de estos materiales, se sustentó porque no alteran las propiedades del aceite esencial y resista el calor generado en el proceso.

c) Para la fabricación del prototipo destilador, se estableció dos criterios:

Diseño mecánico: Comprende el dimensionamiento a escala y las especificaciones técnicas de todas las partes fundamentales y los instrumentos auxiliares del mismo, que en su conjunto permiten las pruebas respectivas y el funcionamiento del equipo destilador.

Diseño funcional: Comprende los detalles de lo que debe hacer el prototipo destilador identificando su objeto de diseño, el cual es la extracción de aceites esenciales, especificando el proceso óptimo para la extracción, para tal fin, consideramos el tiempo de extracción y los costos de la construcción del prototipo.

El proceso de construcción del equipo destilador piloto, responde a la necesidad de hacer algunos ajustes y mejoras en el diseño de destilador convencional, y eso pasa por el diseño del capitel, Para ello se ha

realizado algunos procesos: 1) la modificación de la estructura superior del caldero, para conducir el flujo de vapor a través del material vegetal, para disminuir su tiempo de extracción. Asimismo 2) el diseño de la cápsula de extracción de material vegetal, permitirá optimizar el proceso de extracción por arrastre de vapor del aceite esencial del material vegetal,

3) se modificó el cuello de cisne para que en este se encuentre la cápsula que contiene el material vegetal y forzar a que el vapor traspase por la cápsula y material vegetal contenido en un flujo constante, 4) se diseñó un intercambiador de calor vertical con serpentín de cobre en su interior, debido a la disminución de la densidad con el aumento de temperatura nos permite mantener el agua fría en la parte inferior y el agua caliente en la parte superior aprovechando mejor toda el agua de refrigeración, ya que se calienta uniformemente arriba hacia abajo aprovechando mejor la capacidad calorífica del agua. 5) asimismo se ha realizado el diseño de un sistema de cierre de caldero adaptado al cuello de cisne optimizado, que permita mantener el agua caliente en el caldero en el momento de colocar nuevo material vegetal. (Véase figura N° 8).

Figura N° 8. Construcción y armado del prototipo de destilador



d) Construcción del equipo de destilación en base a las modificaciones con soldadura TIG

Después de observar y rediseñar el equipo de destilación por arrastre de vapor, para la construcción se utilizó la soldadura TIG (tungsten inert gas), este proceso fue realizado en el taller “Todo Inox” en la calle Elías Aguirre 503 – Mariano Melgar, Arequipa. (Véase figura N° 9).

Figura N° 9. Construcción y soldadura de las partes externas con soldadura TIG, en el taller.



e) Curado de equipo con ácido cítrico.

Después de la construcción del equipo, quedan residuos de soldadura e impurezas adheridas a la superficie del equipo, también dentro de los conductos, esto puede causar contaminación en el futuro producto, por eso utilizamos el ácido cítrico para limpiarlo, después de un lavado con detergente sumergimos el equipo en ácido cítrico con un pH de 2 durante media hora, en este proceso los residuos e impurezas que quedan se depositan en el fondo y el equipo queda limpio para su posterior uso.

f) Montaje del equipo y selección de fuente de calor externa Finalmente, el equipo es armado para una prueba, se determinó que una fuente de calor útil sería la utilización de un mechero Bunsen, conectado a un tanque de GLP, por su fácil manejo sobre la intensidad de la flama, se descartó el uso de una fuente de calor eléctrica por el elevado costo que representaría para el proyecto. (Véase figura N° 10).

Después de haber realizado la selección y adquisición de materiales, procedimos a la construcción del equipo destilador, con el diseño y especificaciones técnicas, asimismo mediante un servicio de tercero, previa supervisión del equipo investigador. El tiempo de construcción utilizado por el servicio de tercero, fue de aproximadamente de 10 días con las respectivas pruebas para su uso en base a los materiales utilizados.

Figura N° 10. Imagen de equipo piloto de destilación construido para estudio.



2.3.2. Evaluación el rendimiento y material aprovechable de aceites esenciales tres ecotipos de orégano: *Origanum x aplii* Domin Boros Chinito; *Origanum majoricun* Cambessedes Nigra y *Origanum majorana* L Mejorana

Para la obtención del aceite esencial de los tres ecotipos de orégano, usando el método gravimétrico, se siguieron las siguientes etapas:

a) Recolección y selección ecotipos de orégano

Para la presente investigación, se seleccionó 03 ecotipos de orégano cultivadas en el distrito de San Cristóbal a 3458 m.s.n.m.: *Origanum x aplii* Domin Boros Chinito; *Origanum majoricun* Cambessedes Nigra y *Origanum majorana* L Mejorana. Dentro de esta recolección de materia bruta vegetal, se cosechó un total de 11.190 kg del ecotipo Chinito, 7.670 kg del ecotipo Mejorana y 9.570 kg del ecotipo Nigra,

de los cuales se obtuvo el peso de material vegetal aprovechable a partir de la selección de hojas y flores determinando su porcentaje, asimismo se realizó un total de 08 pesajes de cada ecotipo. (Véase figura N° 11).

Figura N° 11. Recolección, selección y clasificación de material vegetal de los ecotipos de orégano



b) Pesado de material vegetal fresco y determinación del porcentaje de material vegetal aprovechable

Para el pesado de material vegetal, se consideró la selección de hojas y flores de las plantas de orégano seleccionada para el presente estudio, utilizando la siguiente fórmula:

Fórmula de porcentaje de material vegetal aprovechable:

$$= \frac{\% \text{ Material vegetal aprovechable}}{\text{Peso de material seleccionado}} = \frac{\text{Peso total de material acopiado}}{\text{Peso total de material acopiado}} * 100$$

Se realizó un total de 24 pesajes de material vegetal, es decir 08 por cada ecotipo (Véase figura N° 12), se tomó en cuenta 04 pesajes en etapa de floración y 04 en etapa vegetativa por cada ecotipo, aplicando la fórmula de porcentaje de material vegetal, se obtuvo los siguientes resultados según detalle de Tabla 08 a continuación:

Figura N° 12. Pesado de material vegetal antes de iniciar la extracción



Ecotipo	Materia vegetal bruta (g)	Materia vegetal aprovechable(g)	Porcentaje del material vegetal aprovechable	Número de pesaje
Chinito	11190	3955	35.34	08
Mejorana	7670	3420	44.59	08
Nigra	9570	4555	47.60	08
Total	28430	11930	41.96	24

Nota: 24 pruebas de recolección de materia vegetal bruta y porcentaje de material vegetal aprovechable.

c) Obtención de aceite esencial mediante método de arrastre de vapor

Se colocó tres litros de agua en el caldero, 100 g de material vegetal en la cápsula, cerrándola herméticamente, se llenó el intercambiador de calor con agua de enfriamiento, procediendo a su calentamiento con calor constante utilizando un mechero Bunsen iniciando la destilación, el vapor generado atravesó el material vegetal contenido en la cápsula extrayendo los compuestos volátiles, pasando por el sistema de refrigeración intercambiador de calor), arrojando las mezclas líquidas inmiscibles (Aceite + agua) de los aceites de distintos ecotipos de orégano, los cuales se colocaron en un pera de decantación. (Véase figuraN°13).

Figura N° 13. Condensación de mezcla y recolección en pera de decantación



d) Separación de aceite esencial por método de decantación

La mezcla obtenida, pasó por un sistema continuo conformado por una pera de decantación y un tubo U, que permitió la separación por diferencia de sus densidades, durante el tiempo de operación de 45min. Terminado el proceso se dejó reposando el sistema (Véase figura N°14). Posteriormente pasado 8 horas de reposo, se eliminó el Hidrolato y el aceite obtenido fue almacenado correctamente.

Figura N° 14. Proceso de separación del aceite esencial por decantación



e) Preservado del aceite esencial a 4°C

Para mantener las propiedades del aceite esencial de los ecotipos de estudio, se almacenó en frascos color ámbar, diferenciándolos con su respectivo rotulado, y colocándolos en refrigeración apropiadamente a

una temperatura de 4°C, hasta su aplicación en las pruebas microbiológicas. (Véase figura N° 15).

Figura N° 15. Almacenamiento y conservación en frío del aceite.



f) Pesado de aceite esencial obtenido de variedad de orégano

Para la obtención del peso del aceite obtenido, se utilizó la fórmula de la densidad:

$$\text{Densidad} = \frac{M}{V}$$

Donde:

M= Masa = Peso de aceite obtenido en gramos

V= Volumen= Mililitros de aceite

Para la determinación de la densidad, se tomó como referencia los datos obtenidos en 02 primeras pruebas realizadas en octubre 2020 para los tres ecotipos. Según figura 16, muestra un peso de 2.47g y volumen de 2.5ml del ecotipo Chinito, dando como resultado una densidad de 0.988 g/ml para dicho ecotipo, el cual se promedió con las densidades de los resultados de los otros dos ecotipos, en las 22 pruebas. (Véase figura N°16).

Figura N° 16. Pesado de aceite esencial de ecotipo de orégano Chinito.



g) Obtención del rendimiento del aceite esencial de tres ecotipos de orégano

Para la determinación del rendimiento de los aceites esenciales de los tres ecotipos de orégano, extraídos en un prototipo destilador, se utilizó la siguiente fórmula:

Fórmula de porcentaje del rendimiento de aceite esencial:

$$\%RE = \frac{\text{Peso de aceite esencial obtenido g}}{\text{Peso de material vegetal destilado g}} \times 100$$

2.3.3 Comparación y evaluación de la sensibilidad antibacteriana (in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: *Origanum x aplii* Domin Boros Chinito; *Origanum majoricun Cambessedes Nigra* y *Origanum majorana L Mejorana* con antibióticos convencionales en tres cepas de amplio espectro

a) Obtención de tres cepas bacterianas de estudio.

Para el presente estudio se determinó el uso de tres cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, consideradas por sus características como bacterias multirresistentes a antibióticos y de gran contagio ambulatorio. Las cepas bacterianas, se obtuvieron del Laboratorio Veterinario del Sur (Véase figura N° 17), quienes realizaron las pruebas de identificación de cada muestra a) Pruebas de características Macroscópicas; b) Pruebas de características Microscópicas y c) Pruebas Bioquímicas de Identificación Bacteriana. Presentando resultados según Tabla 09:

Tabla 9. Caracterización de microorganismos y/o cepas bacterianas

Microorganismo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus Agalactiae</i>	<i>Escherichia Coli.</i>
Características Macroscópicas			
Medio	Agar sangre Colonias color crema claro oscuro, convexas, brillantes, Alfa-beta hemolíticas	Agar sangre Colonias transparentes, convexas, 1mm de diámetro, Beta-Hemolíticas	Agar sangre Colonias grandes grises, aprox. de 2 a 3mm, convexas, circulares, brillantes
Medio	Agar TSA Colonias grandes, aprox. 2 a 3 mm, convexas, brillantes, suaves, cremosas	Agar TSA Colonias grandes, aprox. 0.5 a 1mm, convexas, circulares, brillantes, suaves cremosas	Agar TSA Colonias grandes, aprox. De 2 a 3mm, circulares, convexas

Figura N° 17. Especificaciones de bacterias *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*

The image shows three laboratory specification forms from LABVETSUR. Each form contains the following sections:

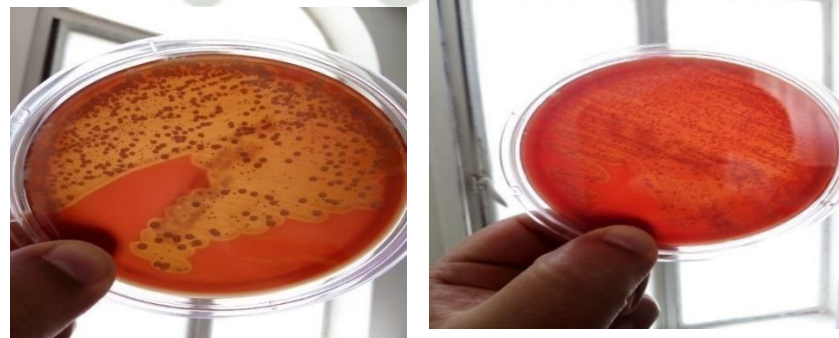
- ESPECIFICACIONES:** Includes the name of the microorganism, the number of assays, the date, and the responsible person.
- CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS:** Lists the media used (e.g., ASAG SANGRE, ASAG TSA) and describes the expected colony morphology.
- CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS:** Describes the appearance of the colonies under a microscope.
- PRUEBAS BIOQUÍMICAS:** Lists various biochemical tests and their expected results (e.g., Catalasa, Hemólisis, Prueba de CAMP).

b) Obtención e identificación de cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus Agalactiae*, *Escherichia coli*

Para este proceso se ha seguido los siguientes pasos:

Se repicó de 03 a 04 colonias de cepas bacterianas Gram positivas, de los microorganismos de estudio (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*), posteriormente se sembró en una placa con agar sangre, incubada por 24-48 Horas a 37°C. Hasta lograr la coloración de la bacteria y formación de hemólisis. (Véase figura N° 18).

Figura N° 18. Estructura Macroscópica de la bacteria *Staphylococcus aureus* (izquierda) *Streptococcus agalactiae* (derecha).



Se repicó de 03 a 04 colonias de cepa bacterianas Gram negativa, *Escherichia coli*, en una placa con agar Mac-konkey la cual se procedió a incubar por 18-24 Horas a 37°C. teniendo como resultado la formación de la colonia rosado intenso, que significa que ha degradado la lactosa. (Véase figura N° 19).

**Figura N° 19. Estructura macroscópica
Escherichia coli.**



c) Pruebas Bioquímicas de identificación para Coloración Gram para cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*

Consiste en un método de identificación de microorganismos mediante un tratamiento con colorantes determinados. Este método permite la diferenciación de los microorganismos en dos grupos: Gram positivos y Gram negativos. Se basa en la diferencia del color de las membranas de las células sometidas al proceso de tinción, esta identificación se muestra en la Tabla 10.

Por otro lado, los procedimientos que se siguieron, fueron:

Se colocó 01 gota de agua destilada, se tomó de 1 a 2 colonias bacterianas y se realizó un extendido sobre una lámina porta-objetos, posteriormente se sobrepasó con calor de mechero bunsen para fijar las muestras de cada una de las tres cepas bacterianas.

Con la muestra fijada de cada cepa bacteriana, se colocó en un soportede tinciones, cubriéndolos con un colorante primario Cristal violeta por 01 min, posteriormente se eliminó el colorante, se procedió a lavar. Asimismo, se cubrió con mordiente Lugol por 01 min, solución decolorante Alcohol Acetona, por 15s, colorante secundario.

Safranina por 1 min, en cada proceso seguido, se procedió a lavar. Se puso a secar la lámina a temperatura ambiente y se observó al microscopio con el objetivo 100x y con una gota de aceite de inmersión, los resultados de la estructura microscópica de cada cepa bacteriana (Véase figura N° 20 y N° 21), según detalle a continuación:

Tabla 10. Características Microscópicas

Microorganismo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i> .
Características Macroscópicas			
Coloración Gram	Cocos Gram (+) Agrupados en racimos, pares, o solos	Cocos Gram (+) Agrupados en cadenas	Bacilos Gram (-) pequeños Método de coloración de Gram
Tiempo y temperatura de incubación	24-48 Horas a 37°C.	24-48 Horas a 37°C	18-24 Horas a 37°C

Figura N° 20. Estructuras microscópicas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*

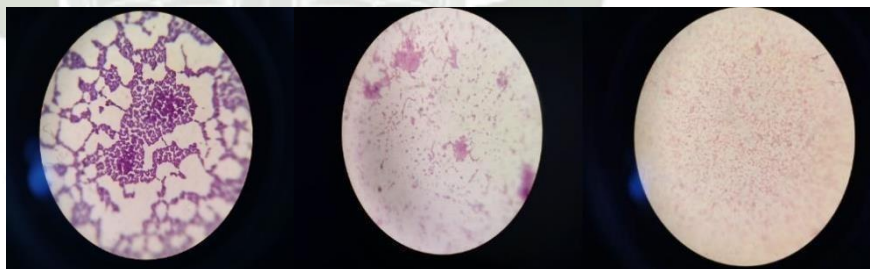


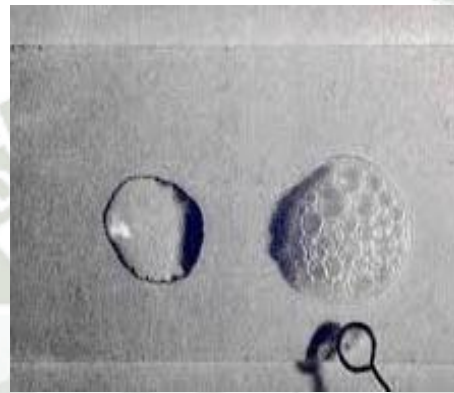
Figura N° 21. Kit de Coloración Gram (de izquierda a derecha: cristal violeta, Lugol mordiente, alcohol acetona, safranina).



d) Prueba de catalasa para cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*

Se colocó una gota de H₂O₂ al 3% sobre una lámina porta-objetos y luego se transfirió una porción de colonia sobre el H₂O₂ realizándose una emulsión y de inmediato el desprendimiento de burbujas hace considerar una prueba positiva. (Véase figura N° 22).

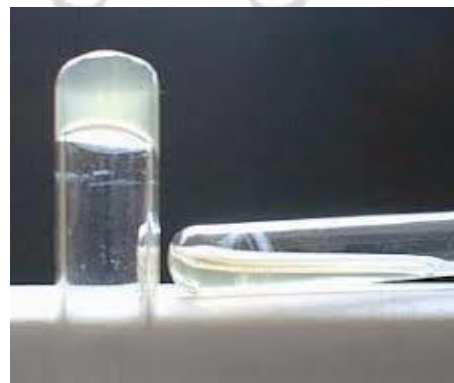
Figura N° 22. Prueba Catalasa Positiva para cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*



e) Prueba de Coagulasa para cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*

Se colocó una gota de plasma citratado, sobre una lámina porta-objetos y de inmediato se transfirió una colonia bacteriana dentro los primeros 10s, un resultado positivo se evidencia por la formación de grumos que vendrían hacer los hilos de fibrina. (Véase figura N° 23).

Figura N° 23. Prueba de Coagulasa positiva para cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*



f) **Prueba Agar manitol Salado para cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus***

Se procedió a sembrar en agar manitol salado de 04 a 05 colonias bacterianas que crecieron en agar sangre y de inmediato se llevó a incubación por 24-48 Horas a 37°C., dando un resultado positivo que se evidenció por el cambio de la coloración del agar, de rojo anaranjado a amarillo. (Véase figura N° 24).

Figura N° 24. Prueba Agar manitol salado positivo para cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*.



g) **Prueba de catalasa para cepa bacteriana de *Streptococcus agalactiae***

Se colocó una gota de H₂O₂ al 3% sobre una lámina porta-objetos y luego se transfirió una porción de colonia sobre el H₂O₂ realizándose una emulsión y de inmediato se observó la no formación de burbujas lo que hace considerar como prueba negativa.

h) **Prueba de Test de Camp para cepa bacteriana de *Streptococcus agalactiae***

Se procedió a estriar una colonia del *Streptococcus Beta-hemolítico* en forma perpendicular, a una estría de estafilococo productor de *Beta-lisina* en agar sangre y se llevó a incubación de 18-24 Horas a 37°C. Luego de este tiempo se evidenció la presencia de una zona de hemólisis en forma de puntas de flecha en el lugar donde se contactan las dos estrías, lo que significa un resultado positivo. (Véase figura N° 25).

Figura N° 25. Prueba de Test de Camp Positiva para cepa bacteriana de *Streptococcus agalactiae*



i) Prueba en Medio TSI para cepa bacteriana *Escherichia coli*

Con un asa en punta y previamente estéril, se tomó una colonia bacteriana y se sembró en el tubo que contenía el medio TSI por punción y estría, se llevó a incubación por 24-48 Horas a 37°C. El cambio de color del medio de rojo a amarillo, dando una reacción positiva, asimismo la presencia de burbujas indica la acidez del medio y formación de CO₂ que es propio de la bacteria en estudio.

j) Prueba en Medio Citrato Simons para cepa bacteriana *Escherichia coli*

De igual manera con un asa en punta y previamente estéril se tomó una colonia bacteriana y se sembró en el tubo que contenía el medio Citrato Simons por punción y estría y se llevó a incubación por 24-48 Horas a 37°C. Después del tiempo de incubación se observó que el medio no cambio de color lo que indica que se tipifico la bacteria en estudio, dando una reacción con resultado negativo.

k) Prueba en Medio Urea para cepa bacteriana *Escherichia coli*

Se tomó una colonia bacteriana y se sembró en el tubo que contenía el medio Urea por estría y se llevó a incubación por 24-48 Horas a 37°C. En esta esta prueba no hubo un cambio de color en el medio Urea, dando reacción como resultado negativo. (Véase figura N° 26 y resultados de Tabla 11).

**Figura N° 26. Pruebas de TSI,
Urea y Citrato Simons para
Escherichia Coli.**



Tabla 11. Pruebas bioquímicas de cepas bacterianas

Microorganismo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i> .
Pruebas Bioquímicas			
Gram	Cocos Gram (+)	Cocos Gram (+)	Bacilos Gram (-)
Catalasa	Positivo	Negativo	Positivo
Coagulasa	Positivo	Beta hemólisis	No corresponde
Hemolisis	Alfa Beta Hemolisis	Alfa Beta Hemolisis	No corresponde
Agar TSI	No corresponde	No corresponde	A/A producción de gas
Crecimiento de Manitol Salado	Positivo, colonias doradas	No corresponde	No corresponde
Prueba de CAMP	No corresponde	Positivo	No corresponde
Prueba de Medio Urea	No corresponde	No corresponde	Negativo
Prueba Citrato Simons	No corresponde	No corresponde	Negativo

1) Preparación del inóculo para cepas bacterianas mediante método de disco difusión en placa Kirby-Bauer

Se preparó tres tubos de ensayo uno para cada cepa bacteriana, se agregó 6 ml de Caldo Peptonado, seguidamente con un hisopo estéril se tomó de

3 a 4 colonias de cada cepa en estudio. Y luego fue introducido al tubo de ensayo para descargar y depositar todo el material bacteriano (Véase figura N° 27).

Figura N° 27. Preparación del inóculo para cepas bacterianas mediante método de disco difusión en placa



m) Prueba de Comparación de los inóculos con escala de Mac Farland 0.5M

Con los tres inóculos preparados se procedió a hacer la comparación de cada uno ellos con la escala de Mac Farland 0.5M para corroborar que la concentración de cada inóculo este dentro del margen de la concentración de 108 UFC/mL. (Véase figura N° 28).

Figura N° 28. Prueba de Comparación de los inóculos con escala de Mac Farland 0.5M.



- n) Sobre la preparación de los inóculos para cada cepa bacteriana de estudio, podemos señalar los siguientes procesos adaptados para su medición, como se puede observar en la Tabla 12, según detalle a continuación:

Tabla 12. Preparación de inóculos para cada cepa bacteriana

Microorganismo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i> .
Preparación de inóculos para cada Cepa bacteriana			
Instrumento	01 tubo de ensayo	de 01 tubo de ensayo	de 01 tubo de ensayo
Volumen	6 ml de caldo peptonado	6 ml de caldo peptonado	6 ml de caldo peptonado
Colonias bacterianas	3 a 4 colonias de cada cepa en estudio	3 a 4 colonias de cada cepa en estudio	3 a 4 colonias de cada cepa en estudio
Comparación con Escala de Mac Farland 0.5M	Volumen de 0.5 mL de BaCl ₂ Concentración de 0.048 M a 99.5 mL de H ₂ SO ₄ 0.36 N.	Volumen 0.5 mL BaCl ₂ Concentración de 0.048 M a 99.5 mL de H ₂ SO ₄ 0.36 N.	Volumen 0.5 mL BaCl ₂ Concentración de 0.048 M a 99.5 mL de H ₂ SO ₄ 0.36 N.
Concentración final	10 ⁸ UFC/mL.	10 ⁸ UFC/mL.	10 ⁸ UFC/mL.

2.3.4. Comparación y evaluación de la sensibilidad antibacteriana (in vitro) de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano con antibióticos convencionales en tres cepas de amplio espectro

Para el desarrollo de la comparación y evaluación de sensibilidad antibacteriana de los aceites de los tres ecotipos en las cepas bacterianas de estudio, se siguieron los siguientes pasos:

- Se preparó Placas Petri con Agar Muller Hinton con medidas de esterilidad del ambiente de trabajo.
- Se esterilizo en autoclave los discos de papel filtro y de placas de Petri con agar Muller Hinton.
- Se comparó los inóculos con la escala de Mac Farland 0.5M a concentración de 10⁸ UFC/mL para las cepas bacterianas de estudio.
- Se inoculo con un hisopo estéril en 09 placas Petri con cada cepa de

estudio (*S. aureus*, *E. coli*, *S. agalactiae*) en diferentes direcciones de arriba hacia abajo, derecha a izquierda y en dirección de las agujas del reloj logrando que todo el material bacteriano sea absorbido por el Agar preparado con un volumen de 20ml. Según Tabla 13.

Tabla 13. Preparación de medios de cultivo (Muller Hinton)

Microorganismo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli</i> .
Preparación de medios de cultivo (Muller Hinton) por cada cepa			
Placas preparadas	09 placas Petri	09 placas Petri	09 Placas Petri
Volumen de Agar preparado Muller Hinton	20 mL Agar preparado/ Placa	20 mL Agar preparado/ Placa	20 mL Agar preparado/ Placa
Proceso de esterilización utilizado	Auto clavado	Auto clavado	Auto clavado

Se colocó 02 discos estériles en una primera placa Petri manteniendo distancia entre los discos para la propagación respectiva del halo de inhibición, así mismo un tercer disco estéril se colocó en una 2da placa Petri, en el centro de diámetro. Esperando fijación respectiva de las mismas, repitiendo el mismo procedimiento para las tres cepas bacterianas.

En los dos primeros discos estériles de la primera placa Petri, se dispensó 30µL de aceite esencial de ecotipo Mejorana y en el tercer disco de la segunda placa Petri, se dispensó 300µL, ambas pruebas se taparon y se llevaron a incubación por 18 a 24 horas a 37° C. este procedimiento se aplicó para los otros aceites esenciales de ecotipo de orégano Nigra y Chinito, según Tabla 14.

Se procedió a comparar la sensibilidad antibacteriana de las cepas de estudio con el aceite esencial de los tres ecotipos de orégano frente a tres antibióticos convencionales Ceftriaxona, Amikacina y Estreptomicina. Para este proceso, se dispensó el inóculo sobre el agar, tras posterior secado en 5 min, este proceso se repitió tres veces por cada cepa; posteriormente, se colocó los discos de los antibióticos convencionales (concentración comparativa respecto a la concentración de los aceites esenciales), sobre el agar Muller-Hinton, luego de esto se procedió a incubar las placas por 18-24 horas a 37°C.

Tabla 14. Aplicación de inóculo sobre el agar Muller Hinton

Descripción del proceso	del <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Escherichia coli.</i>
Preparación de medios de cultivo (Muller-Hinton) por cada cepa			
Discos utilizados	03 discos estériles de papel filtro	03 discos estériles de papel filtro	03 discos estériles de papel filtro
Concentración aceite 1	30	30	30
Amikacina (µL)	–		
Concentración Aceite 2	300	300	300
Estreptomina (µL)	–		
Concentración Aceite 3	30	30	30
Ceftriaxona (µL)	–		
Periodo de incubación	de 18-24 horas a 37°C	a 18-24 horas a 37°C	a 18-24 horas a 37°C

Después la incubación de la muestra por 24 horas, se procede a realizar una observación de halo de inhibición formado en el agar Muller-Hinton, posteriormente se procedió a medir el diámetro (mm) formado, para determinar el grado de sensibilidad alcanzado por los aceites y los antibióticos. Para este proceso se determina los grados de sensibilidad: sensible(S), intermedia (I) y resistente (R).

Una vez terminada la incubación de las placas, se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición que se formaron sobre el agar Muller Hinton y así determinar si los aceites son más eficientes que los antibióticos.

2.3.5. Comparación y evaluación de la concentración antibacteriana (CMI y CMB in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: *Origanum x aplii* Domin Boros Chinito; *Origanum majoricun* Cambessedes Nigra y *Origanum majorana* L Mejorana en tres cepas de amplio espectro

Para el presente proceso, se siguieron los siguientes procedimientos:

a) Preparación de concentración madre de aceite de ecotipos de orégano

Para la preparación del extracto madre de aceite esencial de cada ecotipo de orégano, se utilizó el método de dilución en Caldo Peptonado, se mezcló

0.5g de aceite esencial de cada ecotipo de orégano con 1.0 mL de glicerina, obteniendo una concentración final de 500mg/mL. El uso de la glicerina en la dilución del aceite esencial, permitirá que la concentración mínima inhibitoria (CMI) no presente interferencia en sus resultados.

b) Procedimiento para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria mediante el método de dilución en Caldo Peptonado.

Se procedió a determinar la CMI en Caldo Peptonado, a través de una dilución 1:10 de la cepa bacteriana en estudio, obteniendo un inóculo a la concentración de 10^6 UFC/mL.

En un tubo de ensayo, se depositó 0.1 mL del inóculo principal de 10^8 UFC/mL, posteriormente se agregó 9,9 mL de Caldo Peptonado, repitiéndose el procedimiento para cada cepa bacteriana.

Para el caso del aceite esencial de cada ecotipo de orégano se partió de una concentración madre de 500 mg/mL.

Se preparó una batería de 10 tubos, 08 de ellos fueron designados como pruebas de ensayo y 02 fueron pruebas de control: positivo y negativo, este procedimiento se realizó para cada aceite esencial de ecotipo de orégano y cepa bacteriana de estudio. (Véase Figura N°29)

Se colocó 1 mL de Caldo Peptonado a los 10 tubos,

En esta etapa, se inicia la dilución en Caldo Peptonado, se colocó 1mL aceite esencial al tubo de ensayo N° 01, se mezcló y agregó 1mL al tubo de ensayo N° 02 y así sucesivamente hasta haber completado el tubo de ensayo N° 08. Este procedimiento se aplicó para cada aceite y cada cepa bacteriana objeto de estudio.

Luego se colocó 1 mL del inóculo a la concentración 10^6 UFC/mL a cada tubo hasta el tubo de ensayo N° 09 (control positivo) al tubo de ensayo N° 10 solo se le agregó Caldo Peptonado (control negativo). Este procedimiento se aplicó para cada cepa bacteriana, (Véase figura N°29)

Se procedió a la incubación de la batería de tubos de ensayo con las tres cepas bacterianas de estudio a 37°C por 24 horas.

Figura N° 29. Preparación de tubos e Inóculos de cepas bacterianas a la concentración 10⁸ UFC/mL (Derecha) 10⁶ UFC/mL (Izquierda).



Pasado las 24 horas, se observó que algunos tubos de ensayo presentaron turbidez, evidenciando un crecimiento bacteriano, por otro lado, los tubos de ensayo que no presentaron turbidez, permiten concluir que el aceite esencial inhibió la bacteria. Esta interpretación se aplicó para cada aceite y cada cepa bacteriana objeto de estudio. Luego de las observaciones hechas se procedió a determinar el punto de ruptura de la CMI para cada bacteria en estudio, estableciendo una concentración final de 250 mg/mL para el tubo 01, 125 mg/mL para el tubo 02; 62.5 mg/mL para el tubo 03; 31.3 mg/mL para el tubo 04 hasta el 1.95 mg/mL para el tubo 08, y los tubos 09 y 10 como tubos de control positivo y negativo respectivamente, según Tabla 15.

Como sabemos antes de reportar los resultados de la concentración mínima inhibitoria para cada aceite esencial de las ecotipos de orégano se planteó la Tabla 15 de los pasos a seguir para la técnica a ejecutar.

Tabla 15. Batería de tubos para los aceites esenciales de las tres ecotipos de orégano

Concentración Inicial 500 mg/mL	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	C (+)	C (-)
Caldo Peptonado(mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Aceite(mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	--	--
Inoculo 10 ⁶ (UFC/mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
Concentración Final (mg/mL)	250	125	62.5	31.3	15.63	7.81	3.91	1.95	--	--

c) Procedimiento para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida de los aceites esenciales de los ecotipos de orégano mediante método de dilución en Placa

Para la determinación de la CMB, se siguieron los siguientes procedimientos: Se procedió a sembrar en agar nutritivo los inóculos de la batería de tubos de ensayo, esto se realizó para cada cepa bacteriana con los aceites de cada ecotipo de orégano.

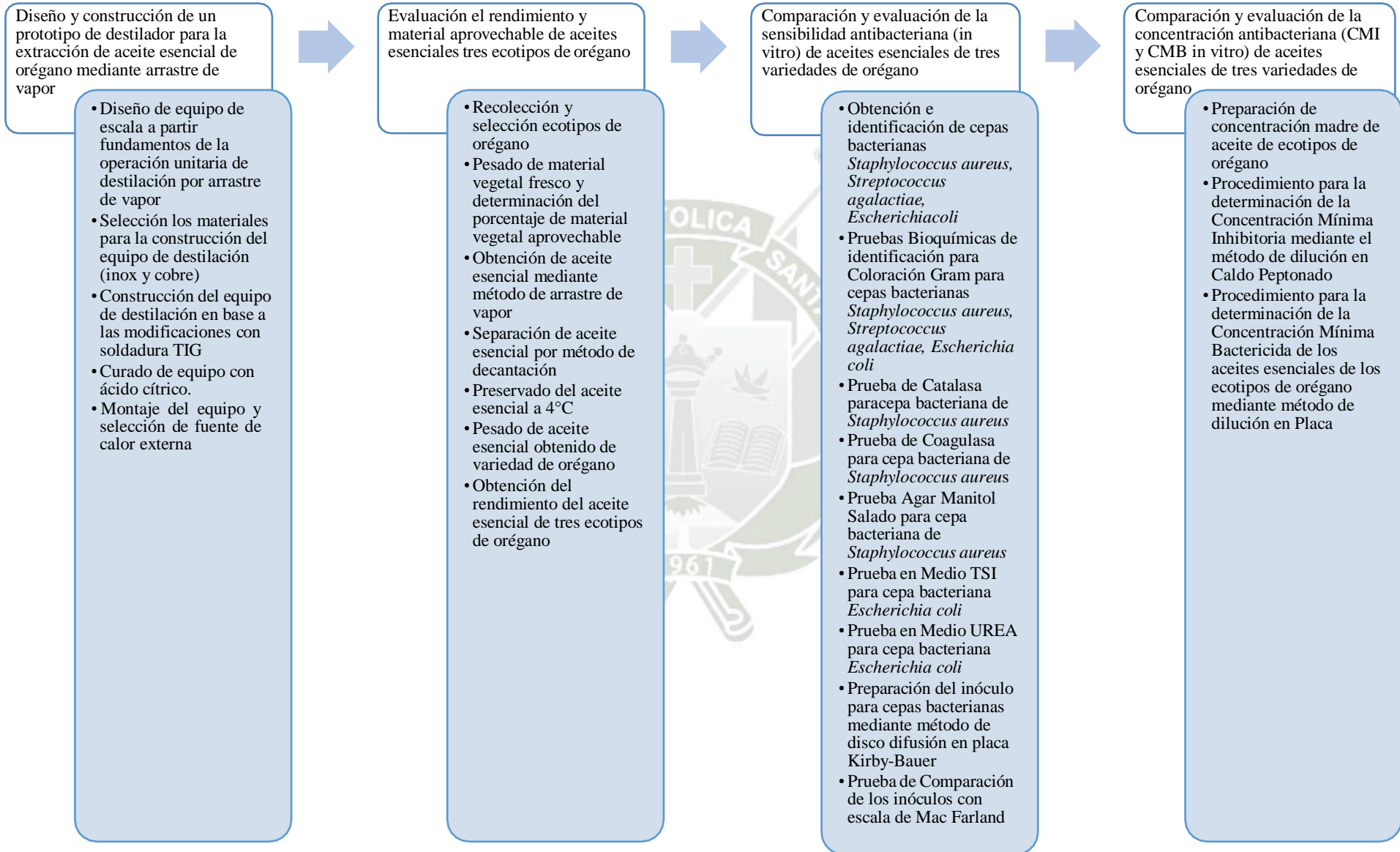
Se llevó a incubación a 37° C las placas Petri por 24 horas de las tres bacterias de estudio para cada repetición, las cuales se distribuyeron en 04 campos de ensayo para la incubación de cada bacteria (Véase figura N° 30). Pasado el periodo de incubación, se procedió a la observación de crecimiento de colonias bacterianas.

Se procedió a determinar el punto de ruptura de la CMB en las tres cepas de estudio y en los aceites de cada ecotipo de orégano.

Figura N° 30. Placa Petri con inóculos sembrados listos para incubación.



2.4. Diagrama de flujo



CAPÍTULO III

3.-RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Diseño y construcción de un prototipo de destilador para la extracción de aceite esencial de orégano mediante arrastre de vapor

Como resultado del diseño del prototipo de destilador optimizado se obtuvo un equipo con las siguientes especificaciones técnicas, según Tabla 16, en el que se destaca el uso del acero inoxidable AISI 316L para la estructura del equipo, por ser un material inerte que no altera las propiedades del aceite esencial, de igual manera el uso de tubo de cobre de media pulgada y 1 mm de espesor para el serpentín de enfriamiento.

Para el proceso de construcción del prototipo destilador, se consideró variables de medición de la factibilidad del equipo destilador: Tiempo de extracción de aceite y costos de construcción del equipo.

Tabla 16. Especificaciones técnicas del equipo destilador optimizado

Rubro	Cantidad	Capacidad / especificaciones
Equipos principales		
Caldero o fuente de vapor	01	Acero inoxidable AISI 316L/ 25 cm. x 30 cm.
Sistema de enfriamiento	01	Acero inoxidable AISI 316L/10 cm. x 35 cm. Tubo de cobre de media pulgada y 1 mm
Sistema de conducción de vapor/ cuello	01	Acero inoxidable AISI 316L/25 cm. x 25 cm.
Cápsula de extracción de material vegetal	01	Acero inoxidable de grado alimenticio AISI 316L de 1mm de espesor/9.5 cm. x 16 cm.
Material de vidrio		
Pera de decantación	01	250 mL
Instrumentos		
Soporte de material vegetal	01	Acero inoxidable de grado alimenticio AISI 316L de 1mm de espesor
Bomba de agua sumergible	01	JEBO/ AP 333/AC 230-240V 50 Hrz 2.5W de 4cm x 4 x 3 cm/
Mechero Bunsen / fuente de calor	01	Acero/ llama permanente/ Altura total: 150 mm.
Salida de refrigerante	01	Acople de bronce 3/8 x 3/8
Entrada de refrigerante (válvula)	01	Acople de bronce 3/8 x 3/8, con válvula de ¼. Niple mixto de 3/8 x 1/4
Soporte de caldero	01	Acero / 25 cm. x 20 cm.
Magueras de silicona	01	Polietileno/ 1.5 m

Debido al estado de emergencia se optó por un diseño de acero inoxidable ya que este material no afecta las propiedades del aceite esencial.

Figura N° 31. Diseño y construcción con especificaciones técnicas de sistema de extracción: Caldero, Capitel modificado y cápsula de material vegetal



Figura N° 32. Diseño y construcción con especificaciones técnicas: Sistema de enfriamiento (derecha) Sistema de conducción de vapores (centro) salida de aceite e hidrolato (izquierda)



Figura N° 33. Imagen de equipo piloto de destilación construido para estudio.



Para el proceso de construcción del prototipo destilador, se consideró variables de medición de la factibilidad del equipo destilador: Tiempo de extracción de aceite y costos de construcción del equipo.

a) Relación Tiempo de extracción

Para este estudio, en el diseño del equipo piloto destilador, se planteó la modificación la estructura superior del capitel, añadiéndole una sección cilíndrica con terminación cónica, con inclinación de 45° con una altura total de 185mm, que permitió aumentar el flujo de vapor en el material vegetal, para disminuir su tiempo de extracción, teniendo un tiempo promedio de 45 min a 60 min, reduciendo el tiempo de extracción respecto a otros equipos convencionales señalados en Tabla 17.

Para este criterio de medición, tomamos como referencia el tiempo de extracción comparativo de otros equipos destiladores utilizados en otras investigaciones con el mismo fin, según Téllez M. Lena & Nolasco C. Diana (2017) (30), en su estudio de Estudio de la composición química del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare spp.*) de Tacna, refieren que el tiempo de extracción utilizado en la extracción llega hasta los 120 min, usando equipo de destilación convencional. Asimismo, según Escobar H, Andrés (2012) (31) precisa que el tiempo de extracción fue de 90 min., así como otros autores citados (32) (33); todos ellos hacen referencia que el tiempo de extracción de aceite esencial, oscila entre 60min a 120 min.

Tabla 17. Comparativo de tiempo de extracción de aceite en equipo convencional y prototipo de destilador.

Descripción	Tiempo de extracción
Evaluación del rendimiento de extracción del aceite esencial crudo de orégano (<i>Lippia graveolens</i>) proveniente de dos zonas de distinta altitud, por medio del método de arrastre de vapor a nivel planta piloto (33)	90 min
Diseño de una planta piloto para la extracción de aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor (32)	60min a 90min
diseño y puesta en marcha de una planta piloto de arrastre con vapor para la obtención de aceites esenciales (31)	90 min
Estudio de la composición química del aceite esencial de orégano (<i>Origanum vulgare spp.</i>) de Tacna (30)	120 min o 90 min
*Diseño de equipo destilador optimizado	45 a 60 min

Como se pudo observar el tiempo de extracción en nuestro prototipo fue de 45 a 60 min a diferencia y como se observa en los otros trabajos de investigación fueron de 90 a 120 min.

b) Relación costos de elaboración de prototipo

Se recolectó información referente a los precios de otros equipos de destilación por arrastre de vapor, para la obtención de estos precios se utilizó cotización directa en unos casos y estimación de costos para otros equipos. (Véase figura N° 34).

Las cotizaciones de costos no incluyen los asociados a la operación del equipo, servicio e instalación, ni puesta en marcha. El costo se relacionó con el beneficio que representa construcción de este equipo destilador el cual se encuentra acorde con el área de investigación y la innovación desde el ajuste del diseño, así como el beneficio social de su uso, aún más en la coyuntura social que pasamos en el periodo 2020- 2022.

Respecto a la relación costo beneficio, según la Tabla 18; se pudo determinar que los costos de diseño y fabricación en el equipo destilador construido para el presente estudio, alcanzó un valor estimado de S/. 686.5 soles, mientras que en dos cotizaciones de equipos convencionales de laboratorios según cotización de N.º 00020915, Importadora Andina, fue de S/. 1049.50 soles, teniendo un incremento del 52.9% del total de valor referencial del equipo destilador diseñado y armado en el presente estudio, asimismo en la cotización de N.º CO07220115 ALDALAB PERU S.A.C, fue de S/. 862.00, teniendo un incremento de 25.6% con respecto al valor referencial propuesto en el estudio.

c) Costos de elaboración de Destilador

Tabla 18. Comparativo de costos de destilador convencional y costos destilador prototipo

Descripción	Costos Destilador convencionales	Costos Destilador piloto
Cotización N° 00020915 Importadora Andina	1049.54	686.5
Cotización N° CO07220115 ALDALAB PERU S.A.C	862.00	

Por lo visto a las comparaciones en la respectiva tabla nos salía más práctico y económico el diseño y construcción de un prototipo destilador.

Figura N° 34. Cotización de precios de destilador convencional de empresa corporación andina

Importadora Andina
Av. Emancipación 805
Jr. Huancavelica 876
Jr. Moquegua N° 909-301
CENTRAL TELEFÓNICA
424-2524
www.andinaeiri.com
HORA: 16:10:36
PÁGINA: 1

COTIZACIÓN N° 00020915

ALDALAB
RUC: 2664066415
ALDALAB PERU S.A.C.
Av. Emancipación N° 325 Int. 201
Lima - Lima Lima
(01) 765-0116 | 922-620-006
ventas@aldalab.com
www.aldalab.com

COTIZACIÓN N° 007220115
FECHA DE PRECIOS: Lunes, 11 Jun, 2012

SEÑORES: MED CARRÓN E I.R.L.
DIRECCIÓN: MAZ C/LT DA URB. EL HUAYCO-MOQUEGUA-MARRISCAL
R.U.C. 2063142292
ATENCIÓN: SRA. PATRICIA RODRIGUEZ PERALTA
VENDEDOR: CANDY - 003
DOC. REF: 103565 I.G.V. - Validez de la oferta: 30 días

FECHA: 11/07/2012
COND. PAGO: NO DEFINIDO
MONEDA: SOLES
TELÉFONO: 999150225
PRIORIDAD: NORMAL
F. ENTREGA: 11/07/2012

CÓDIGO	DESCRIPCIÓN	U.M.	CANTIDAD	PRECIO	TOTAL
KT0310030	ADAPTADOR ACODADO DE VIDRIO ESMERILADO OTOMA DE VACIO NS 2932 - KYNTEL	UND.	1,000	266.00	266.00
KT0310008	ADAPTADOR DE VIDRIO ESMERILADO CABEZAL DE DESTILACION NS 2932 - KYNTEL	UND.	1,000	248.00	248.00
KT0310062	BALON DE FONDO PLANO BOCA ESMERILADA NS 2932 X 1000 ML - KYNTEL	UND.	1,000	42.42	42.42
KT0310029	BALON DE FONDO PLANO C/ LARGO X 1000 ML - 1111 - KYNTEL - BORO 3.3	UND.	1,000	20.29	20.29
KT0310034	MATRAZ ERLENMEYER BIANGOSTA X 500 ML - 1121 - KYNTEL - BORO 3.3	UND.	1,000	17.29	17.29
KT0310036	MECHERO DE ALCOHOL DE VIDRIO TRANSPARENTE X 250 ML - 1361 - KYNTEL	UND.	2,000	5.71	11.42
MT0270085	PINZA UNIVERSAL CON NUEZ BALON, MATRAZ, REFRIGERANTE - INTELACIONAL	UND.	4,000	31.20	124.80
KT0310007	REFRIGERANTE DE GRHAM (CONDENSADOR SERPENTIN ESMERILADO 2932 DE 300 MM - KYNTEL	UND.	1,000	248.00	248.00
MT0270088	SOPORTE UNIVERSAL C/ BASE Y VARILLA PINTADA - INTELACIONAL	UND.	2,000	31.20	62.40
PT0370054	TAPON DE JERE BIHORADADO # 6 - NACIONAL	UND.	2,000	4.85	9.70
KT0310043	TERMOMETRO QUIMICO DE 0 A 200°C - AMARILLO MERCURIO - KYNTEL	UND.	1,000	9.22	9.22

OBSERVACIONES
PRECIOS FINALES - SOLO APLICA PARA PAGOS EN EFECTIVO O DEPOSITOS.
(NECESITAS OTROS PRODUCTOS?)
Estoy disponible para atender cualquier requerimiento, nuestras líneas de productos son:
o Maquetas y simuladores médicos,
o Equipos y material de laboratorio,
o Reactivos químicos y de Diagnóstico,
o Mobiliario hospitalario.

Atentamente:
Candy alenda
GERENTE DE VENTAS

TOTAL S/ 1 049.54

ALDALAB
RUC: 2664066415
ALDALAB PERU S.A.C.
Av. Emancipación N° 325 Int. 201
Lima - Lima Lima
(01) 765-0116 | 922-620-006
ventas@aldalab.com
www.aldalab.com

COTIZACIÓN N° 007220115
FECHA DE PRECIOS: Lunes, 11 Jun, 2012

DATOS DEL CLIENTE
CÓDIGO: 1 98707880 RUC: 000000000
SEÑORES: CLIENTE
DIRECCIÓN: LIMA
REFERENCIA: ATENCION DIRECTA
DIRECCIÓN: GERENCIA

DATOS ADICIONALES DE DOCUMENTO
VALIDEZ DE OFERTA: 15 días
CONDICION PAGO: CONTADO
MONEDA: SOLES
ATENCIÓN: AREA DE CONTABILIDAD
ELABORADO POR: TANIA PERALTA SANCHEZ

NO OLVIDAR NUNCA PRESENTAR LA META, COTIZACIÓN DE LOS SIGUIENTES ARTICULOS CON LOS MEJORES PRECIOS DEL MERCADO.

ITEM	CÓDIGO	CANT	UN	DESCRIPCIÓN DE ARTICULO	PRECIO	TOTAL
SOPORTE	2	UND	SOPORTE UNIVERSAL CON BASE 175 - 100 MM - MARCA 3S CIENTIFIC	INMEDIATA	29.00	58.00
PINZAS	2	UND	PINZA UNIVERSAL CON NUEZ DE 2 DEDOS (NEGRO)	INMEDIATA	38.00	76.00
LABOR	2	UND	PINZA UNIVERSAL CON NUEZ DE 3 DEDOS (NEGRO)	INMEDIATA	37.00	74.00
MECHERO	2	UND	MECHERO BUNSEN	INMEDIATA	75.00	150.00
BALON	1	UND	BALON DE VIDRIO FONDO REDONDO 250ML, 8/ ESMERILADA - BODALL-BL3 139.87	INMEDIATA	14.00	14.00

CARACTERÍSTICAS:
Frasco, fondo redondo, cuello ancho, 500
a) Fabricado a partir de 12 espesores, vidrio de borosilicato conforme a USP
b) Fabricado de Top 1 y ASTM E438, Top 1, Clase A
c) Cumple con ISO 13485 e ISO 24000
d) Con fondo de conete.

BALON
1 UND BALON DE VIDRIO FONDO REDONDO 250ML, 8/ ESMERILADA - BODALL-BL3 139.87
18.00 18.00

CARACTERÍSTICAS:
Frasco, fondo redondo, cuello ancho, 500
a) Fabricado a partir de 12 espesores, vidrio de borosilicato conforme a USP
b) Fabricado de Top 1 y ASTM E438, Top 1, Clase A
c) Cumple con ISO 13485 e ISO 24000
d) Con fondo de conete.

IMPRESO POR: TANIA PERALTA SANCHEZ Page 1 of 4 IMPRESO EL: 11/07/2012 2:32 pm

La construcción del prototipo destilador, permite ratificar la propuesta, ya que en la construcción de otros equipos destiladores utilizan acero inoxidable AISI/SAE 304. Asimismo, el método de arrastre con vapor de agua a presión normal, permite mantener los principios activos incólumes y con las características organolépticas naturales y propias de cada planta.

La construcción de este prototipo destilador debe permitir a realizar posteriormente evaluaciones y correcciones datos teóricos y de los asumidos para el presente diseño.

3.2. Evaluación el rendimiento de aceites esencial y material vegetal de tres ecotipos de orégano: *Origanum x aplii Domin Boros Chinito*; *Origanum majoricun Cambessedes Nigra* y *Origanum majorana L Mejorana*

Para la evaluación del rendimiento y material aprovechable, se utilizó un total de 28.430 g de ecotipos de orégano cosechado para las pruebas de destilación, los cuales

se destilaron en 118 secuencias según se muestra la Tabla 19 y 20.

Tabla 19. Rendimiento promedio de aceite esencial y material aprovechable según ecotipos de Orégano

Ecotipo	Materia bruta g	Peso del material vegetal aprovechable g	Número de destiladas x100g	Rendimiento % aceite esencial total promedio	% material vegetal
Chinito	11190	3955	39	0.179	35.34
Mejorana	7670	3420	34	0.178	44.59
Nigra	9570	4555	45	0.174	47.60
total	28430	11930	118		

Tabla 20. Rendimiento de aceite esencial y material aprovechable según ecotipos de Orégano por etapas de cosecha

Ecotipo	% Promedio total de material vegetal	% Promedio de material vegetal en etapa de floración	% Promedio de material vegetal en etapa vegetativo	% Promedio total de aceite esencial	% Promedio de rendimiento de aceite esencial de ecotipo en etapa de floración	% Promedio de rendimiento de aceite esencial de ecotipo en etapa vegetativo
Chinito	35.34	36.70	34.45	0.179	0.187	0.171
Mejorana	44.59	45.88	42.94	0.178	0.186	0.171
Nigra	47.60	50.21	44.05	0.174	0.180	0.169

Tabla 21. Rendimiento detallado de aceite esencial y material aprovechable de ecotipos de orégano por etapa de cosecha

Rendimiento de aceite y material aprovechable de ecotipo de orégano Chinito								
Etapa de desarrollo de orégano	Periodo de selección de material vegetal	Materia bruta (g)	Peso del material vegetal aprovechable (g)	Número de destiladas (x100 g)	Volumen en aceite (mL)	Peso del Aceite esencial (g)	Rendimiento % P/P	% Material vegetal aprovechable
Vegetativo	Nov-21	2080	700	7	1.2	1.186	0.169	33.65
	Nov-21	2150	750	7	1.3	1.284	0.171	34.88
	Nov-21	1330	460	5	0.8	0.790	0.172	34.59
	Nov-21	1500	520	5	0.9	0.889	0.171	34.67
Floración	Dic-21	900	325	3	0.6	0.592	0.182	36.11
	Dic-21	850	310	3	0.6	0.592	0.191	36.47
	Dic-21	890	320	3	0.6	0.592	0.185	35.96
	Dic-21	1490	570	6	1.1	1.086	0.191	38.26
Rendimiento de aceite y material aprovechable de ecotipo de orégano Mejorana								
Vegetativo	Ene-22	840	350	3	0.6	0.592	0.169	41.67
	Ene-22	850	340	3	0.6	0.592	0.174	40.00
	Ene-22	1000	460	5	0.8	0.790	0.172	46.00
	Ene-22	930	410	4	0.7	0.691	0.169	44.09
Floración	Ene-22	1100	540	5	1	0.988	0.183	49.09
	Ene-22	900	420	4	0.8	0.790	0.188	46.67
	Ene-22	1000	430	4	0.8	0.790	0.184	43.00
	Ene-22	1050	470	5	0.9	0.889	0.189	44.76
Rendimiento de aceite y material aprovechable de ecotipo de orégano Nigra								
Vegetativo	Feb-22	1050	470	5	0.8	0.790	0.168	44.76
	Feb-22	1000	460	5	0.8	0.790	0.172	46.00
	Feb-22	950	410	4	0.7	0.691	0.169	43.16
	Feb-22	970	410	4	0.7	0.691	0.169	42.27
Floración	Feb-22	1700	830	8	1.5	1.482	0.179	48.82
	Feb-22	1200	560	6	1	0.988	0.176	46.67
	Feb-22	1100	595	6	1.1	1.086	0.183	54.09
	Feb-22	1600	820	8	1.5	1.482	0.181	51.25

Como se puede observar el rendimiento de aceite esencial obtenido en el prototipo destilador utilizando material fresco se obtuvo un rendimiento similar y en algunos casos superior a los reportados en los trabajos. Según R.C. Moreno; M.A. Lara; L.E. Mariconda; L.E. Mariconda; N. H. Curzel; M. Biec: Rendimiento de aceites esenciales de orégano en secadero solar en el río seco. Buenos Aires: Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue. A su vez se pudo observar que el rendimiento de aceite esencial y porcentaje de material vegetal aumentan en el periodo de floración para los tres ecotipos de orégano.

Por consiguiente, tras los resultados de cada prueba, nos permite ratificar que el método de destilación por arrastre de vapor, ha tenido interesantes resultados como método de extracción de aceites esenciales, en nuestro caso los resultados obtenidos, ratifican estos antecedentes, siendo el ecotipo Chinito, el de mejor rendimiento promedio alcanzado, nos muestra un valor de 0.179% P/P de aceite esencial del total de las pruebas realizadas según Tabla 21, asimismo el rendimiento promedio de aceite esencial del ecotipo Mejorana alcanzó un valor de 0.178% P/P y el Nigra fue el de menor valor, con un rendimiento de aceite esencial promedio de 0.174% P/P. Asimismo, el porcentaje de material vegetal por ecotipo, concluye que el ecotipo Nigra, es el que presenta mejor resultado con un valor de 47.60%, el ecotipo Mejorana presenta un valor de 44.59% y el ecotipo Chinito con un valor de 35.34%. Resaltándose que el ecotipo Chinito, tiene mejor rendimiento de aceite muy a pesar de bajo % del material vegetal aprovechable obtenido, respecto a los valores obtenidos en los ecotipos Mejorana y Nigra.

Un aspecto importante a considerar, es que los resultados del rendimiento de aceite esencial no están proporcionalmente ligados a los resultados obtenidos de porcentaje de material vegetal aprovechable (hojas y flores) sino, a la diferencia de la cantidad de tricomas que presenta cada ecotipo. Siendo el Ecotipo Chinito, el que presenta mayor valor de rendimiento de aceite esencial, destacándose que se obtiene mayores resultados de rendimiento en la etapa de floración independientemente del ecotipo, según Tabla 20.

Estos resultados expuestos en el presente estudio, no hace más que ratificar lo previsto por Moreno et al (34) que, en su investigación, señala que las muestras en las que se determinaron los rendimientos de aceites esenciales correspondían a distintos estados fenológicos (con flor y sin flor) cosechadas en el mismo momento, abril de 2011, tomándose ejemplares de producto fresco y seco en secadero solar. Los resultados del trabajo indican que los mayores rendimientos de aceites esenciales en orégano criollo se obtienen en muestra desecada, cosechada en plena floración.

Un aspecto importante a considerar, es que los resultados del rendimiento de aceite esencial no están proporcionalmente ligados a los resultados obtenidos de porcentaje de material vegetal aprovechable (hojas y flores) sino, a la diferencia de la cantidad de tricomas que presenta cada ecotipo. Siendo el Ecotipo Chinito, el que presenta mayor valor de rendimiento de aceite esencial, destacándose que se obtiene mayores resultados de rendimiento en la etapa de floración independientemente del ecotipo, según Tabla 20.

Estos resultados expuestos en el presente estudio, no hace más que ratificar lo previsto por Moreno et al (34) que, en su investigación, señala que las muestras en las que se determinaron los rendimientos de aceites esenciales correspondían a distintos estados fenológicos (con flor y sin flor) cosechadas en el mismo momento, abril de 2011, tomándose ejemplares de producto fresco y seco en secadero solar. Los resultados del trabajo indican que los mayores rendimientos de aceites esenciales en orégano criollo se obtienen en muestra desecada, cosechada en plena floración.

Asimismo los resultados obtenidos en la Tabla 20, coincide con lo que refiere Farias et al (35) que en su estudio concluye que las conclusiones el híbrido *Origanum x aplii*, *Domin Boros* “orégano peruano”, es un cultivo cuyo rendimiento de biomasa y aceite esencial pueden considerarse como muy promisorios para las condiciones ecológicas de la zona oeste de Entre Ríos El rendimiento en aceite esencial, se incrementa a medida que se avanza en la etapa fenológica del cultivo, siendo mayor a fin de floración que no hace más que ratificarse en los resultados conseguido e nuestro trabajo de investigación.

3.3. Comparación y evaluación de la sensibilidad antibacteriana (in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: *Origanum x aplii* Domin Boros Chinito; *Origanum majoricun Cambessedes* Nigra y *Origanum majorana L* Mejorana con antibióticos convencionales en tres cepas de amplio espectro

Para la determinación e interpretación de las pruebas de sensibilidad y de Concentración Mínima Inhibitoria, se estableció como referencia de la Tabla 22, que establece la categoría de interpretación según los valores siguientes:

Tabla 22. Categoría de interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

	Halo Inhibición (mm)	CIM
Sensible	> 20	< 4
Intermedio	15 - 19	8-16
Resistente	< 14	> 36

Tabla 23. Resultados comparativos de Halos Inhibición de Aceites y antibióticos sobre Cepas Bacterianas, según ecotipo Chinito, Nigra y Mejorana

Resultados comparativos de Halo Inhibición de Aceite ecotipo Chinito y antibióticos convencionales						
Bacteria	Halo Inhibición (mm) aceite 30µL	Halo Inhibición (mm) Amikacina 30µL	Halo Inhibición (mm) aceite 30µL	Halo Inhibición (mm) Ceftriaxona 30µL	Halo Inhibición (mm) aceite 300µL	Halo Inhibición (mm) Estreptomina 300µL
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	25	42	35	85	30
<i>Escherichia coli</i>	35	25	35	27	85	30
<i>Streptococcus agalactiae</i>	50	0	50	50	55	30
Resultados comparativos de Halo Inhibición de Aceite ecotipo Nigra y antibióticos convencionales						
<i>Staphylococcus aureus</i>	42	25	42	35	85	30
<i>Escherichia coli</i>	45	25	40	27	85	30
<i>Streptococcus agalactiae</i>	45	0	40	50	85	30

Resultados comparativos de Halo Inhibición de Aceite ecotipo Mejorana y antibióticos convencionales

<i>Staphylococcus aureus</i>	42	25	42	35	85	30
<i>Escherichia coli</i>	35	25	35	27	65	30
<i>Streptococcus agalactiae</i>	45	0	40	50	65	30

Como se pudo observar en las tablas de arriba los resultados que se obtuvieron con respecto a la sensibilidad antibacteriana los halos de inhibición de los aceites esenciales de los tres ecotipos de orégano manifestaron buena sensibilidad sobre las tres cepas bacterianas de estudio. Según la investigación de Amadio et al (36), en los resultados de su estudio “ Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo alimentario”, ratifica la tendencia de nuestro investigación e hipótesis, al señalar que el Halo de Inhibición obtenido en la aplicación del Aceite esencial del *Origanum x aplii* o Chinito en cepas *Staphylococcus aureus*, y *Escherichia coli* cuyos halos de inhibición son 13 mm y 12.5 mm, ratifican la tendencia de los resultados obtenidos en el presente estudio al ser mayor los halos de inhibición en la aplicación del aceite del ecotipo Chinito obtenidos en el prototipo destilador, en los que presentan resultados de 35 mm y 85 mm de halos de inhibición respectivamente, siendo estos muy sensibles presentando una efectividad antibacteriana en las cepas aplicadas.

Según la Tabla N° 23, se evaluó la efectividad antibacteriana de los aceites esenciales comparados con los antibióticos convencionales (Amikacina, Ceftriaxona, Estreptomina) , mediante pruebas de efectividad antibacteriana; a través del crecimiento de los halos de inhibición, según la tabla podemos señalar que de las 27 pruebas de efectividad antibacteriana (09 por cada ecotipo) , realizadas con aceites esenciales de tres ecotipos de orégano, ya que los halos de inhibición van desde los 35 mm a 85 mm con resultados > a 20 mm, por tanto, las cepas bacterianas son sensibles a los aceites esenciales de los tres ecotipos en todas sus pruebas. Por otro lado, los resultados comparativos de la efectividad antibacteriana de los antibióticos convencionales frente a las cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*) presentaron valores de 27 mm hasta los 50 mm, habiéndose

detectado que en 03 de las pruebas de la bacteria *Streptococcus agalactiae* no presentaron sensibilidad al antibiótico Amikacina, al no presentar halos de inhibición. Finalmente, se puede concluir que el aceite esencial del ecotipo Chinito, presentó mayor efectividad antibacteriana sobre las tres cepas de estudio, comparado a los resultados obtenidos por los aceites esenciales de los ecotipos Nigra, Mejorana y los antibióticos convencionales.

Figura N° 35. Resultados de la sensibilidad antibacteriana de los aceites esenciales del Ecotipo Chinito frente a *Staphylococcus aureus* y su comparación con los antibióticos convencionales derecha a izquierda (Concentración de 30 μ L y 300 μ L y placa con antibióticos).

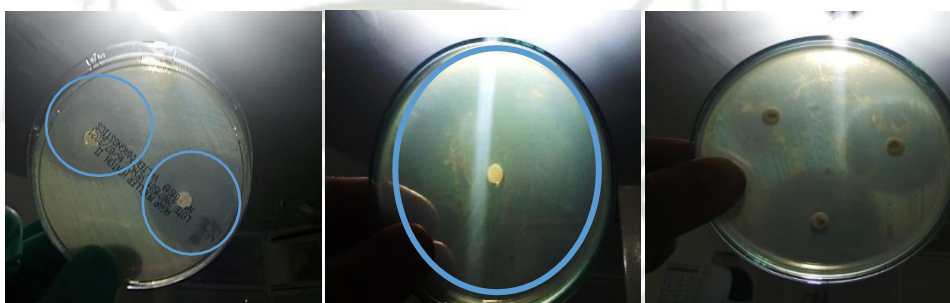


Figura N° 36. Resultados de la sensibilidad antibacteriana de los aceites esenciales del Ecotipo Nigra frente a *Escherichia coli* y su comparación de los antibióticos convencionales. De derecho a izquierda (concentración de 30 μ L y 300 μ L, placa con antibióticos)

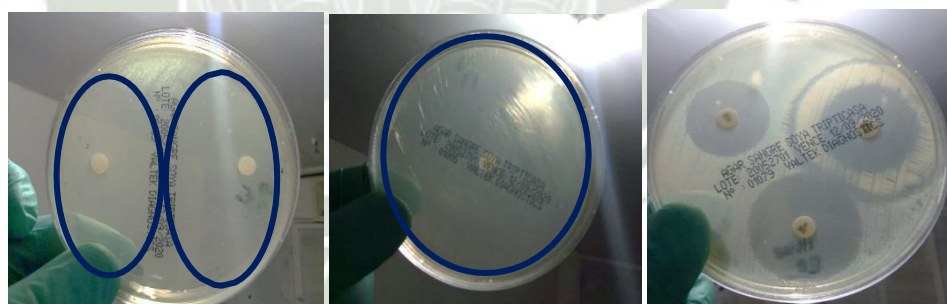


Figura N° 37. Resultados de la sensibilidad antibacteriana de los aceites esenciales del Ecotipo Mejorana frente a *Streptococcus agalactiae* y su comparación de los antibióticos convencionales. De derecho a izquierda (concentración de 30 μ L y 300 μ L, placa con antibióticos)



3.4. Comparación y evaluación la concentración antibacteriana (CMI y CMB in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: *Origanum x aplii* Domin Boros Chinito; *Origanum majoricun Cambessedes* Nigra y *Origanum majorana* L Mejorana, en tres cepas de amplio espectro

Para la comparación y evaluación de la CMI in vitro, se estableció un total de 30 pruebas de batería de tubos de ensayo por cada ecotipo.

Tabla 24. Batería de tubos para los aceites esenciales de los tres ecotipos de orégano para CMI

Bacteria	Ecotipo Chinito		Ecotipo Nigra		Ecotipo Mej rana	
	Tubo S/Turbidez	Resultado	Tubo S/Turbidez	Resultado	Tubo S/Turbidez	Resultado
<i>S. aureus</i>	8	1.95 mg/mL	6	7.81 mg/mL	8	1.95 mg/mL
<i>E. Coli</i>	8	1.95 mg/mL	4	31.3 mg/mL	5	15.63 mg/mL
<i>S. agalactiae</i>	8	1.95 mg/mL	8	1.95 mg/mL	8	1.95 mg/mL

Como se pudo observar el ecotipo Chinito presento menores valores de concentración por lo tanto es el ecotipo que manifestó mejor CMI, pero de igual manera los otros valores que se dieron a las diferentes concentraciones determinaron que hubo una ligera a moderada CMI con respecto a las bacterias.

Según la Tabla 24, podemos determinar que la CMI de los aceites de los tres ecotipos Chinito, Nigra y Mejorana frente a las cepas bacterianas *S. aureus*, *E. coli* y *S. agalactiae*, presentaron diversos resultados: En el ecotipo Chinito, el resultado de la CMI, presentó una concentración de 1.95 mg/mL en el 8vo tubo de ensayo, no presentando turbidez, lo que significó, que se dio una buena inhibición bacteriana del aceite esencial (Véase figura N° 38) Asimismo en el ecotipo Nigra, los resultados de la CMI presentados, fueron de 7.81, 31.3 y 1.95 mg/mL tanto para *S. aureus*, *E. coli* y *S. agalactiae*, no presentando turbidez en los tubos de ensayo 6to, 4to y 8vo, lo que significó, que se dio una ligera inhibición bacteriana del aceite esencial en las Cepas de *S. agalactiae* y *S. aureus*. (Véase figura N° 39). Finalmente, en el Ecotipo Mejorana, se presentó resultados de 1.95 mg/mL para las cepas *S. aureus* y *S. agalactiae* lo que significa que hubo una buena inhibición bacteriana y para el caso de *E. coli* se obtuvo un valor de 15.63 mg/mL lo que significa que hubo una ligera inhibición bacteriana. (Véase figura N° 40).

Figura N° 38. Determinación de la CMI del aceite de ecotipo Chinito frente a las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae*.

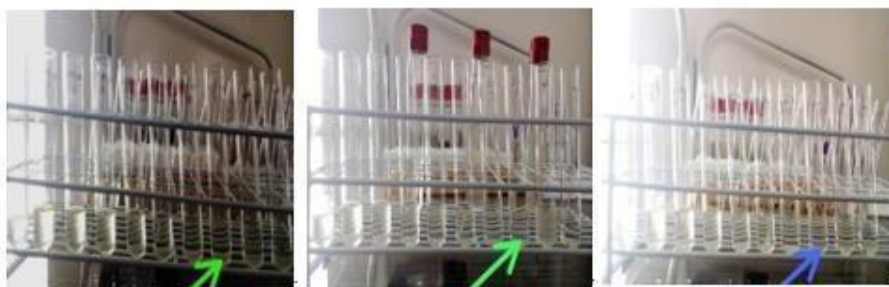


Figura N° 39. Determinación de la CMI del aceite de ecotipo Nigra frente a las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae*.



Figura N° 40. Determinación de la CMI del aceite de ecotipo Mejorana frente a las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae*.



Cabe precisar que se realizó un total de 30 pruebas de determinación de la CMI por cada ecotipo, 10 para cada Cepa Bacteriana: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae*. (08 de pruebas de CMI y 02 pruebas de control: positivo y negativo), haciendo un total de 90 pruebas aplicadas.

Resultados para la Concentración Mínima Bactericida mediante el método de dilución en placa.

Para la obtención de los resultados relacionado con la CMB, se partió de las muestras obtenidas en las baterías de tubos de ensayo, para ello se sembró en placas con agar nutritivo, que sirvieron para la determinación de la CMB y después de la incubación por 24 horas a 37°C se determinó el punto de ruptura.

Tabla 25. Placas Petri con agar nutritivo para los aceites esenciales de las tres ecotipos de orégano para determinación de la CMB

Bacteria	Ecotipo Chinito		Ecotipo Nigra		Ecotipo Mejorana	
	Agar S/Bacterias	Resultado	Agar S/Bacterias	Resultado	Agar S/Bacterias	Resultado
<i>S. aureus</i>	8	1.95 mg/mL	5	15.63 mg/mL	8	1.95 mg/mL
<i>E. coli</i>	8	1.95 mg/mL	4	31.3 mg/mL	5	15.63 mg/mL
<i>S. agalactiae</i>	8	1.95 mg/mL	8	1.95 mg/mL	8	1.95 mg/mL

Como se pudo observar el ecotipo Chinito presento menores valores de concentración por lo tanto es el ecotipo que manifestó mejor CMB, pero de igual manera los otros valores que se dieron a las diferentes concentraciones determinaron que hubo una ligera a moderada CMB con respecto a las bacterias.

Según la Tabla 25, podemos determinar que la CMB de los aceites de los tres ecotipos Chinito, Nigra y Mejorana frente a las cepas bacterianas *S. aureus*, *E. coli* y *S. agalactiae*, presentaron diversos resultados: En el ecotipo Chinito, el resultado de la CMB, presentó una concentración de 1.95 mg/mL en el 8vo espacio de la placa para las tres cepas, lo que significó, que tuvo una eficaz concentración bactericida del aceite esencial (Véase figura N° 41) Asimismo en el ecotipo Nigra, los resultados de la CMB presentados, fueron de 15.63, 31.3 y 1.95 mg/mL; para *S. aureus*, *E. coli* y *S. agalactiae*, en los espacios 5to, 4to y 8vo, de las placas utilizadas, lo que significó que tuvo una eficaz concentración bactericida (Véase figura N° 42) Finalmente, en el Ecotipo Mejorana, los resultados de la CMB presentados, fueron de 1.95, 15.63 y 1.95 mg/mL; para *S. aureus*, *E.coli* y *S. agalactiae*, en los espacios 8vo, 5to y 8vo, de las placas utilizadas, lo que significó que tuvo una eficaz concentración bactericida (Véase figura N° 43) Por tanto, podemos concluir que el aceite de ecotipo Chinito, tuvo mejor

concentración bactericida con respecto a los ecotipos Nigra y Mejorana, al presentar valores de 1.95 mg/mL frente a las tres cepas bacterianas *S. aureus*, *E. coli* y *S. agalactiae*.

Figura N° 41. Determinación de CMB del Ecotipo Chinito frente al *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae* mediante método en placa



Figura N° 42. Determinación del CMB del Ecotipo Nigra frente al *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae* mediante método en placa



Figura N° 43. Determinación de CMB del Ecotipo Mejorana frente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae* mediante método en placa.



Cabe precisar que se realizó un total de 30 pruebas de determinación de la CMB por cada ecotipo, 10 para cada Cepa Bacteriana: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae*. (08 de pruebas de CMB y 02 pruebas de control: positivo y negativo), tal como se muestra en la figura N°41, N°42 y N°43, haciendo un total de 90 pruebas aplicadas. Asimismo, se utilizó 06 placas Petri con agar nutritivo para las pruebas del ecotipo Chinito, 03 para el ecotipo Nigra y 06 placas Petri con agar nutritivo para el ecotipo Mejorana.

Análisis de Resultados

Los resultados obtenidos en el presente estudio, según los objetivos propuestos, se analizó en el programa estadístico MINITAB 17, software estadístico, que permitió examinar datos actuales y pasados, establecer tendencias, relaciones de variables de estudio.

Para el análisis de los resultados del presente estudio, se planteó dos tipos de pruebas de resultados de diseño experimental:

Anova unidireccional, (Análisis de varianza) que compara las medias de tres o más grupos independientes para determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la población correspondiente. como prueba de análisis de varianza, que se utilizará para las pruebas de rendimiento y Material vegetal de cada ecotipo de orégano. Este análisis de varianza permitió realizar el grado de significancia de las variables Rendimiento y material vegetal.

Anova de regresión factorial 2^3 (Análisis de varianza) en el que el diseño experimental factorial utilizado, es modelo de regresión factorial 2^3 , indica que el 1º factor tiene dos niveles y el 2º factor tiene tres niveles. En este caso el número de combinaciones (tratamientos) es $2^3 = 8$., las que se utilizaran para las pruebas de sensibilidad, CMI y CMB.

En este proceso de análisis de resultados se utilizará la prueba del modelo lineal de la tabla ANOVA, permitirá evaluar el análisis varianza, así como el análisis de regresión de factores e interacciones, donde el valor-P de la prueba es menor que 0.05, lo que significa que tiene una diferencia estadísticamente significativa en los resultados obtenidos, con un nivel del 95% de confianza.

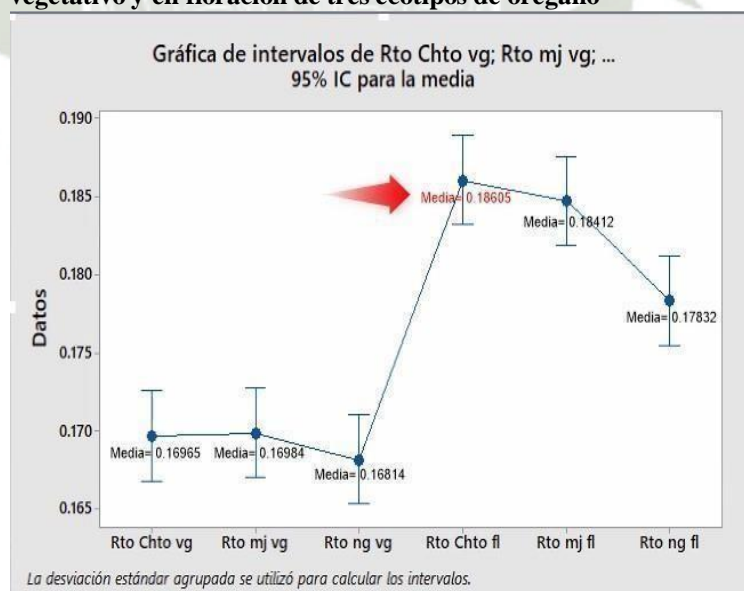
Evaluación del rendimiento de aceites esenciales y material aprovechable de tres ecotipos de orégano: *Origanum x aplii* Domin Boros Chinito; *Origanum majoricun Cambessedes* Nigra y *Origanum majorana* L. Mejorana

Tabla 26. Regresión factorial: Rdto Chto fl, Rdto Mjna fl, Rdto Ngra fl; Rdto Chto vg, Rdto Mjna vg, Rdto Ngra vg

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	0.00129	0.000258	34.29	0.000
Error	18	0.000135	0.000008		
Total	23	0.001425			

En el análisis de varianza del rendimiento de aceite esencial de los ecotipos de orégano, según la Tabla 26, se puede determinar que el Valor F de las pruebas de rendimiento de aceite esencial de los ecotipos, mostraron un valor P de 0.000, lo que significa que tiene un nivel de significancia, es decir se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis de investigación, porque presenta medias diferentes respecto a los obtenidos por los otros rendimientos.

Figura N° 44 Gráfico de intervalos de Rendimientos en etapas vegetativo y en floración de tres ecotipos de orégano



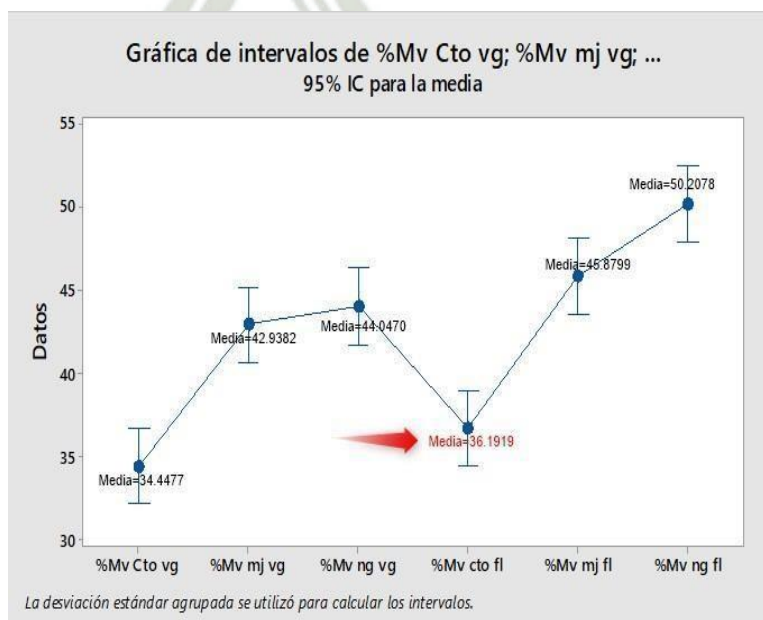
De los resultados obtenidos según la figura N° 44, Gráfico de intervalos de Rendimientos en material vegetal y en floración, se concluye que las medias obtenidas en los factores de Rdto Chto fl, Rdto Mjna fl, Rdto Ngra fl tienen medias diferentes, mostrando resultados de $M=0.18605$; $M=0.18412$ y $M=0.17832$, puesto que, en el análisis de varianza de ANOVA, el valor P obtenido es de 0.000, siendo menor que nivel de significancia de 0.05 por tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis de investigación, concluyéndose que el Rendimiento del Aceite esencial del ecotipo Chinito, es el que muestra un mejor rendimiento con una media de $M=0.18605$, en el número de pruebas realizadas, con respecto a los otros ecotipos.

Tabla 27. Regresión factorial : %M.v Chto vg %M.v Mjna vg; %M.v Ngra vg; %M.v Chto fl; %M.v Mjna fl; %M.v Ngra fl

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	687.28	137.456	29.25	0.000
Error	18	84.58	4.699		
Total	23	771.86			

Como se puede observar en la Tabla 27, del análisis de varianza de material vegetal por ecotipos de orégano, se puede determinar que el Valor F de las pruebas de porcentajes de material vegetal de ecotipos de orégano, mostraron un valor P de 0.000, siendo menor al nivel de significancia de 0.05, lo que nos permite rechazar la hipótesis nula, y aceptar la hipótesis de investigación porque presenta medias diferentes respecto a los obtenidos por los otros porcentajes de material vegetal.

Figura N° 45. Gráfico de Intervalos de Material vegetal de tres ecotipos de orégano



De los resultados obtenidos, en la figura N° 45, en la gráfica de porcentajes de material vegetal, se concluye que las medias obtenidas en los factores de %M.v Chto fl; %M.v Mjna fl; %M.v Ngra fl, tienen medias diferentes, mostrando resultados de $M=36.1919$; $M=45.8799$ y $M=50.2078$, concluyéndose que el porcentaje de material vegetal del ecotipo Nigra, es el que muestra un mejor porcentaje de material vegetal con una media de $M=50.2078$, en el número de pruebas realizadas sin embargo en el ecotipo Chinito presenta una media de 36.1919.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, ratifican los resultados obtenidos, tal como precisa en su estudio de Elena Rouquaud y María Eugenia Videla (37), que señala que el *Origanum x aplii* (Orégano Criollo), señala que tricomas son abundantes en ambas caras. Algunos pelos simples son unicelulares cortos de base ancha y los más abundantes son enseriados de dos a cuatro células con pedestal a veces bicelular.

Por otro lado, Martínez N. Daniela et al, (38) , en su estudio, señala que la cantidad de aceite esencial que se extrae, así como su composición química, es altamente variable entre las diferentes especies de plantas aromáticas (Calvo-Irabién 2012, Stefanakis et al. 2022) Quienes tienen la función de producir una gran diversidad de moléculas químicas volátiles, además de constituir sus sitios de almacenamiento y liberación al ambiente, son los tricomas glandulares, en la que señala que dentro de la epidermis del *Origanum x aplii* (Orégano Criollo) presenta Más de 2000 tricomas simples por cm^2 , de 0.5 mm de longitud y aprox. 1000 tricomas glandulares/ cm^2 . La cabeza de los pelos glandulosos está constituida por doce células, en los híbridos, ambos tipos de tricomas se presentan en las dos caras de la hoja repartidos uniformemente.

Comparación y evaluación de la sensibilidad antibacteriana (in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: *Origanum x aplii* Domin Boros Chinito; *Origanum majoricun Cambessedes* Nigra y *Origanum majorana L* Mejorana con antibióticos convencionales en tres cepas de amplio espectro

Para establecer la comparación de la efectividad antibacteriana (in vitro) de aceites esenciales de tres ecotipos de orégano: *Origanum x aplii* Domin Boros Chinito; *Origanum majoricun Cambessedes* Nigra y *Origanum majorana L* Mejorana, se siguieron los siguientes procesos:

Tabla 28. Regresión factorial: >H.i Nigra vs. Rdto; Efectv; M.v; >H.i Mjna vs. Rdto; Efectv; M.v y >H.i Chto vs. Rdto; Efectv; M.v

Factores e interacciones	Nigra		Mejorana		Chinito	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
Rendimiento(A)	0.10	0.761	0.22	0.646	0.03	0.865
Efectividad(B)	0.51	0.485	1.23	0.284	0.35	0.565
Material Vegetal(C)	3.41	0.083	0.22	0.646	0.58	0.458
Rendimiento*Efect (AB)	6.21	0.024	4.29	0.055	15.79	0.001

Como se pudo observar, en la Tabla 28, del análisis de varianza de la Sensibilidad antibacteriana de los tres ecotipos de orégano, se puede determinar que el Valor F de las pruebas de rendimiento* efectividad (AB) de >H.i del ecotipo Mejorana, mostró un valor P de 0.055, lo que nos permite señalar que el valor P de la razón F, es mayor que 0.05, por tanto no presenta una diferencia estadísticamente significativa, ya que sus resultados en las pruebas presentaron mayor dispersión con respecto a las medias de los otros factores. Asimismo con respecto al análisis de varianza de la sensibilidad antibacteriana de >H.i del ecotipo Nigra y Chinito, se puede determinar que el Valor F de las pruebas de rendimiento* efectividad (AB) de >H.i de ambos ecotipos, mostraron un valor P de 0.024 y 0.001, lo que permite señalar que los valores P de la razón F, son menores de 0.05, por tanto ambos presentan diferencia estadísticamente significativas, lo que nos permite rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis de investigación lo que significa que los ecotipos Nigra y Chinito son los que presentan mejor efectividad (sensibilidad) sin embargo se precisa que de ellos el >H.i del ecotipo Chinito es mucho mejor en sus pruebas de resultados aplicados en el presente estudio.

Comparación y evaluación la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: *Origanum x aplii* Domin Boros Chinito; *Origanum majoricun Cambessedes* Nigra y *Origanum majorana* L Mejorana en tres cepas de amplio espectro

Tabla 29. Regresión factorial: Ngra (CMI) vs. Rdto; Efectv; Mjna (CMI) vs. Rdto; Efectv; Chto (CMI) vs. Rdto; Efectv

Factores e interacciones	Nigra		Mejorana		Chinito	
	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P	Valor F	Valor P
Lineal	0.75	0.527	3.94	0.113	4.88	0.084
Rendimiento (A)	0.00	0.995	2.54	0.186	5.40	0.081
Efectividad (B)	0.06	0.287	5.33	0.082	4.37	0.105
Rendimiento*Efectividad (AB)	0.06	0.811	1.17	0.340	7.76	0.05

Como se pudo observar, en la Tabla 29, del análisis de varianza de la Concentración Mínima Inhibitoria de los tres ecotipos de orégano, se puede determinar que el Valor F de las pruebas de rendimiento* efectividad (AB) del modelo Regresión factorial: Chto (CMI) Rdto; Efectv; Ngra (CMI) vs. Rdto; Efectv; Mjna (CMI) vs. Rdto; Efectv, nos permite señalar que el valor P de la razón F, de la CMI de los ecotipos de Nigra y Mejorana, presentan valores de 0.811 y 0.340, lo que nos permite señalar que el valor P de la razón F, es mayor que 0.05, por tanto no presentan una diferencia estadísticamente significativa, ya que sus resultados en las presentaron mayor dispersión con respecto a las medias de los otros factores. pruebas Asimismo con respecto al análisis de varianza de la CMI del ecotipo Chinito, mostro un valor P de 0.05, lo que permite señalar que los valor P de la razón F, es igual al 0.05, por tanto este resultado presenta una diferencia estadísticamente significativa, lo que nos permite rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis de investigación lo que significa que el ecotipo Chinito presenta mejor Concentración Mínima Inhibitoria, a diferencia de los resultados obtenidos en los aceites Nigra y Mejorana, con respecto al número de pruebas aplicadas en el presente estudio.

Comparación y evaluación la concentración antibacteriana (CMB in vitro) de aceites esenciales de tres variedades de orégano: *Origanum x aplii* Domin Boros Chinito; *Origanum majoricun* Cambessedes Nigra y *Origanum majorana* L Mejorana en tres cepas de amplio espectro

Tabla 30. Regresión factorial: Ngra (CMB) vs. Rdto; Efectv; Mjna (CMB) vs. Rdto; Efectv; Chto (CMB) vs. Rdto; Efectv

Factores e interacciones	Nigra		Mejorana		Chinito	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor
	F	P	F	P	F	P
Lineal	0.41	0.69	1.52	0.332	4.88	0.084
Rendimiento (A)	0.41	0.558	2.65	0.179	5.40	0.081
Efectividad (B)	0.41	0.558	0.39	0.565	4.37	0.105
Rendimiento*Efectividad (AB)	0.16	0.713	0.65	0.465	7.76	0.05

Como se pudo observar, en la Tabla 30, del análisis de varianza de la Concentración Mínima Bactericida de los tres ecotipos de orégano, se puede determinar que el Valor F de las pruebas de rendimiento* efectividad (AB) del modelo Regresión factorial: Ngra (CMB) vs. Rdto; Efectv; Mjna (CMB) vs. Rdto; Efectv; Chto (CMB) vs. Rdto; Efectv nos permite señalar que el valor P de la razón F, de la CMB de los ecotipos de Nigra y Mejorana, presentan valores de 0.713 y 0.465, lo que nos permite señalar que los valores P de la razón F, son mayores que 0.05, por tanto no presentan una diferencia estadísticamente significativa, ya que sus resultados en las pruebas presentaron mayor dispersión con respecto a las medias de los otros factores. Asimismo con respecto al análisis de varianza de la CMB del ecotipo Chinito, mostró un valor P de 0.05, lo que permite señalar que los valor P de la razón F, es igual al 0.05, por tanto este resultado presenta una diferencia estadísticamente significativa, lo que nos permite rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis de investigación lo que significa que el ecotipo Chinito presenta mejor Concentración Mínima Bactericida, a diferencia de los resultados obtenidos en los aceites Mejorana y Nigra, con respecto al número de pruebas aplicadas en el presente estudio.

CONCLUSIONES

PRIMERA

Que el presente estudio concluye que el diseño del prototipo de destilador cumplió la finalidad de obtener aceites esenciales de tres ecotipos de orégano por el método de arrastre de vapor, y que los resultados de tiempo de operación y rendimiento de aceites obtenidos para cada ecotipo, muestran valores comparativos cercanos a otros antecedentes de estudios, guardando relación respecto a la finalidad del proceso constructivo del prototipo destilador.

SEGUNDA:

Se determinó que existen diferencias en el rendimiento, concluyendo que el ecotipo Chinito, presentó mayor rendimiento de aceite esencial con un valor de 0.179% respecto a los rendimientos del ecotipo Nigra de 0.174% y del ecotipo Mejorana de 0.178%, se observó que el Aceite esencial del ecotipo Chinito en etapa floración mostro un mejor rendimiento con una media de $M=0.18605$.

TERCERA:

Se determinó que existen diferencias en el Porcentaje de Material Vegetal obtenido por cada ecotipo de orégano, concluyendo que el ecotipo Nigra presentó mayor porcentaje de material vegetal con un valor de 47.60% respecto a los porcentajes del ecotipo Mejorana de 44.59% y del ecotipo Chinito de 35.34%, se observó que el material vegetal del ecotipo Nigra en etapa floración, mostro un mejor porcentaje con una media de $M=50.2078$.

CUARTA

Se concluyó que el aceite esencial del ecotipo Chinito presentó una mayor sensibilidad antibacteriana sobre las tres cepas de estudio, esto se ratifica en que las pruebas de sensibilidad de los tres ecotipos mostraron valores P de 0.024, 0.055 y 0.001 para los ecotipos Nigra, Mejorana y Chinito aceptándose la hipótesis alternativa y concluyendo que existe diferencia entre el uso de aceites esenciales frente a antibióticos convencionales.

QUINTA

Se concluyó que las pruebas de la CMI de los aceites de tres ecotipos de orégano, Chinito, Nigra y Mejorana frente a las cepas bacterianas presentaron diversos resultados (vistos en la Tabla 24) podemos concluir que el ecotipo Chinito presentó inhibición a la concentración de 1.95 mg/ml en el 8vo tubo de ensayo para las tres cepas, Confirmando en el análisis de varianza del modelo de Regresión factorial: Chto (CMI) vs. Rdto; Efectv; Ngra (CMI) vs. Rdto; Efectv; Mjna (CMI) vs. Rdto; Efectv, nos permite señalar que el valor P del ecotipo Chinito es igual a 0.05, presentando una diferencia estadísticamente significativa, respecto a los resultados de CMI obtenidos por los aceites de los ecotipos Nigra y Mejorana.

SEXTA

De acuerdo a los resultados obtenidos de la CMB, se concluyó que el aceite de ecotipo Chinito, tuvo mejor concentración bactericida con respecto a los ecotipos Nigra y Mejorana, al presentar valores de 1.95 mg/ml frente a las cepas bacterianas *S. aureus*, *E. coli* y *S. agalactiae*. Confirmando en el análisis de varianza del modelo de Regresión factorial: Ngra (CMB) vs. Rdto; Efectv; Mjna (CMB) vs. Rdto; Efectv; Chto (CMB) vs. Rdto; Efectv, nos permite señalar que el valor P del ecotipo Chinito es igual a 0.05, presentando una diferencia estadísticamente significativa, respecto a los resultados de CMB obtenidos por los aceites de los ecotipos Nigra y Mejorana.

RECOMENDACIONES

1. Ampliar estudios de investigación sobre otros ecotipos de orégano existentes cultivados en distintos climas y pisos ecológicos de nuestro territorio (oreja de elefante, china nativa, china cocotea) y hacer un comparativo de su rendimiento y efecto antibacteriano en distintas cepas bacterianas, para ampliar la bibliografía de estudios de investigación.
2. Recomendar la profundización de estudios de investigación del prototipo destilador, para evaluar la factibilidad mecánica y operativa, evaluando variables de temperatura, presión, tiempo de operación, para permitir una estandarización en el diseño final del equipo destilador.
3. Ampliar estudios de investigación en efectividad antibacteriana de aceites esenciales ecotipos de orégano, que permita servir de base científica en el desarrollo de nuevos medicamentos alternativos a los antibióticos convencionales.
4. Profundizar estudios de investigación del aceite esencial del ecotipo Chinito, para evaluar sus pruebas en cepas de amplio espectro como la *Pseudomonas* y establecer su relación comparativa de efecto antibacteriano con antibióticos de cuarta y quinta generación.
5. Recomendar la evaluación cuantitativa de cada uno los aceites esenciales de diferentes ecotipos de orégano para determinar los compuestos propios y comunes de los oréganos mediante cromatografía de gases, por espectroscopia de masas.
6. Sugerir para fines de industrialización del aceite esencial de orégano, el cultivo del ecotipo Chinito debido a su mayor rendimiento de aceite esencial por planta de orégano y su mayor efectividad antibacteriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Salavert M. infosalud. [Online].; 2008 [cited 2021 Mayo 22. Available from: <https://www.infosalus.com/actualidad/noticia-antibioticos-amplio-espectro-son-mas-eficaces-controlar-infecciones-hospitalarias-experto-20080701172211.html>.
2. González, Maria; Corral, Lidia & González María P. Calidad del Aceite esencial de orégano según el proceso de destilación y equipo de extracción. II ed. Durango; México: Sigma 119.
3. Ruiz Galán J. Ingeniería Básica de una Planta de Extracción de Aceite Esencial de "Mentha arvensis L." por Destilación de Arrastre con Vapor. Informe de pre grado. España: Escuela Técnica Superior de Ingeniería, Universidad de Sevilla, Sevilla ; 2019. Report No.: I.
4. Chambe - Chambilla E. Introducción al sistema de cultivo in vitro y micro propagación de ~inco ecotipos de orégano (*Origanum vulgare* L.) en condiciones de laboratorio. Tesis de Grado. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna, Facultad de Ciencias Agrícolas, Tacna; 2008. Report No.: I.
5. Salas F&AdISP. Producción y exportación de orégano de la región Tacna, 2016. I ed. Dirección Regional de Agricultura T, editor. Tacna; 2016.
6. Minagri. Anuario Estadístico de la Producción Pecuaria y Avícola 2017. Lima.; 2017.
7. Villalobos- Pineda KK. "Caracterización molecular de los principales ecotipos de "Orégano" (*Origanum* sp.) en la región de Tacna. Tesis de Grado. Lima : Universidad Nacional Agraria La Molina, Facultad de Ciencias, Lima; 2018. Report No.: I.
8. Aldudo- Martín P. Estudio e influencia de la fertilización y época de siega, en la mejora del cultivo de plantas selectas de *Origanum vulgare* L. Tesi de Pos Grado. España: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Madrid; 1996. Report No.: I.
9. Guerra- Boone L. Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de aceites esenciales de plantas usadas en medicina. Tesis de Grado. Monterrey: Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Medicina AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN, Monterrey, México; 2011. Report No.: I.
10. Bakkali F. ea. Biological effects of essential oils – A review. Universite´ Abdelmalek Essa`adi, Faculte´ des Sciences, Laboratoire de Biologie et Sante; 2008 September.
11. Villavicencio Gastelú JE. Efecto antimicótico in vitro del orégano (*Origanum vulgare*) en cepas de *Candida albicans* procedentes de la Estomatitis Sub Protésica. Tesis de Post Grado. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología, Lima; 2017. Report No.: I.

12. Salinas R. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “Orégano peruano” frente a *Staphylococcus aureus*”. Tesis de grado. Lima: Universidad Norbert Wiener, Lima; 2018. Report No.: I.
13. online It. [abtestsonline.es/tests/tincion-de-gram](https://labtestsonline.es/tests/tincion-de-gram). [Online].; 2021 [cited 2021 enero 29. Available from: <https://labtestsonline.es/tests/tincion-de-gram>.
14. Farrar-Stoakes S. News Medical Life Sciences. [Online].; 2020 [cited 2021 Enero 26. Available from: [https://www.news-medical.net/life-sciences/Gram-Negative-Bacteria-\(Spanish\)](https://www.news-medical.net/life-sciences/Gram-Negative-Bacteria-(Spanish)).
15. Gabancho la Torre P. Prevalencia de factores de riesgo de la mastitis en vacas del distrito de villa rica. Tesis de Grado. Tingo María: Universidad Nacional Agraria de la Selva, Amazonas; 2009. Report No.: I.
16. Choque-Yapu M. Efecto antibacteriano del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano) comprado con la Oxícilina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC29213. Tesis de Grado. Trujillo: Universidad Cesar Vallejo, Facultad de Ciencias Médica, Trujillo; 2018. Report No.: I.
17. Sánchez- Loza J. “EFICACIA ANTIBACTERIANA in vitro DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE Propóleo VERSUS EL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* “orégano” SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175 TACNA, 2017”. Tesis de grado. Tacna: Universidad Privada de Tacna, Facultad de Ciencias, Tacna; 2017. Report No.: I.
18. Flores-Palacios, Katia & Puente-Puente, Maribel Rosario. Actividad Antibacteriana del Aceite esencial de *Piper aduncum* “Matico” Sobre *Escherichia coli*. Tesis de Grado. Huancayo: Universidad Nacional de los Andes, Facultad de Ciencias de la Salud, Huancayo; 2016. Report No.: I.
19. Abreu O; Alpuche C; Arathoon; Arbo A. Tratamiento de las Enfermedades Contagiosas. Organización Panamericana de la Salud. 2011; V edición.
20. Torrades S. Revista Offarm. [Online].; 2001 [cited 2021 Febrero 15. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-uso-abuso-antibioticos-13018370>.
21. Fernández-Riverón, Fernando; López Hernández Jorge; Ponce- Martínez Laida Maria; ,Machado- Betarte Caridad. Resistencia bacteriana. Revista Cubana de Medicina Militar. 2003 Enero- Marzo; 08(1).
22. line LTo. Labs Test on line un rincón de confianza. [Online]. [cited 2021 Enero 28. Available from: <https://labtestsonline.es/tests/antibiograma>.
23. Rodríguez- Valencia IG. Obtención de fracciones y/o aislamiento de compuestos con actividad microbiana contra cepas de *Staphylococcus aureus* a partir de *Cordia boissieri*. Tesis de Post Grado. San Nicolás de Los Garza, Nuevo León. México: Universidad Autonoma Nuevo León, Facultad de Medicina; 2015. Report No.: I.

24. Neira-Llerena J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las plantas medicinales utilizadas por los pobladores de Tuctumpaya, Quequeña y Chiguata, frente a bacterias gram positivas *Staphylococcus aureus* – *Streptococcus pneumoniae* causante. Tesis de Grado. Arequipa: Universidad Nacional San Agustín de Arequipa, Arequipa; 2018. Report No.: I.
25. Suquilanda- Espinosa IdR. Concentración Mínima Inhibitoria de Ampicilina frente a *Escherichia coli* aislada en urocultivos de pacientes de consulta externa del Hospital Militar de Brigada Nro. 7 de la Ciudad de Loja durante el periodo de Marzo a Julio del 2015. Tesis de Grado. Loja: Universidad Nacional de Loja, Salud Humana - facultad de laboratorio clínico; 2015. Report No.: I.
26. De los Ángeles-Mendez E. Actividad bacteriostática y bactericida de antibióticos betalactámicos y glucopéptidos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* de importancia clínica. Caracterización genotípica de aislamientos tolerantes. Tesis de Post Grado. Santa Fe, Argentina: Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas; 2012. Report No.: I.
27. Molina- Vallejos GM. Conocimientos y prácticas sobre el cumplimiento de antibioticoterapia en pacientes ambulatorios de hospitales de Huancayo - 2015. Tesis de Post Grado. Huancayo: Universidad Nacional del centro del Perú, Facultad de enfermería; 2015. Report No.: I.
28. drogas MdSdPDEdMIy. Estudio sobre la prescripción, el uso y las reacciones adversas a los. [Online].; 2001 [cited 2021 marzo 12. Available from: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Publicaciones>.
29. Hidalgo, Gilda & Romero, Ana. Diseño de una planta piloto para la extracción de aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor. Tesis de grado. Piura: Universidad de Piura, Piura; 2016. Report No.: I.
30. Tellez Monzón, Lena & Nolazco Cama, Diana María. Estudio de la composición química del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* spp.) de Tacna. Tesis de Pre Grado. Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina., Lima; 2017. Report No.: I.
31. Escobar Hernandez AE. Diseño y Puesta en marcha de una planta piloto de arrastre de vapor para obtención de aceites esenciales Valencia - Venezuela: Universidad de Carabobo, Facultad de ingeniería química; 2012.
32. Hidalgo, Gilda & Romero, Ana. Diseño de una planta piloto para la extracción de aceites esenciales mediante destilación por arrastre de vapor. Tesis de grado. Perú: Universidad de Piura, Piura; 2016. Report No.: I.
33. Quezada Rodriguez AE. Evaluación del rendimiento de extracción del aceite esencial crudo de orégano (*Lippia Graveolens*) provenientes de dos zonas de distinta altitud, por medio del método de arrastre de vapor a nivel de planta piloto Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Escuela de Ingeniería Química; 2008.

34. R.C. Moreno; M.A. Lara; L.E. Mariconda; L.E. Mariconda; N. H. Curzel; M. Biec. Rendimiento de aceites esenciales de orégano en secadero solar en el río seco. Buenos Aires: Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue.
35. Farias, G.; Brutti, O.; Marse, Soledad. Evaluación del rendimiento del "orégano peruano" *oreganum x apylli* (domin) Boros, (Lamiaceae) Cultivado en la Provincia de Entre Ríos. Revista Científica Agropecuaria 13 (1-2): 57-60 (2009) Facultad de Ciencias Agropecuarias - UNER. 2009.
36. Amadio, C.; Medina, R.; Dediol, C. & Zimmerman, M. ; Millares, S. Aceite esencial de orégano: un potencial aditivo. Revista de Departamento de Ciencias Enológicas y Agroalimentarias. Facultad de Ciencias Agrarias. UNCUIYO. 2011; I(43).
37. Elena Rouquaud; María Eugenia Videla. Identificación de orégano mediante caracteres anatómicos foliares. Tomo XXXIII. N° 2. Año 2001. Rev. FCA UNCuyo; 2001.
38. Martínez N. Daniela, Castillo B. María; Chávez P. Calvo Luz María. ¿Dónde se producen los aceites esenciales de las plantas aromáticas. Mérida, Yucatán, México.: Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C; 2023.

ANEXOS

Figura N° 46. % Rendimiento promedio de aceite esencial y material aprovechable según ecotipos de orégano

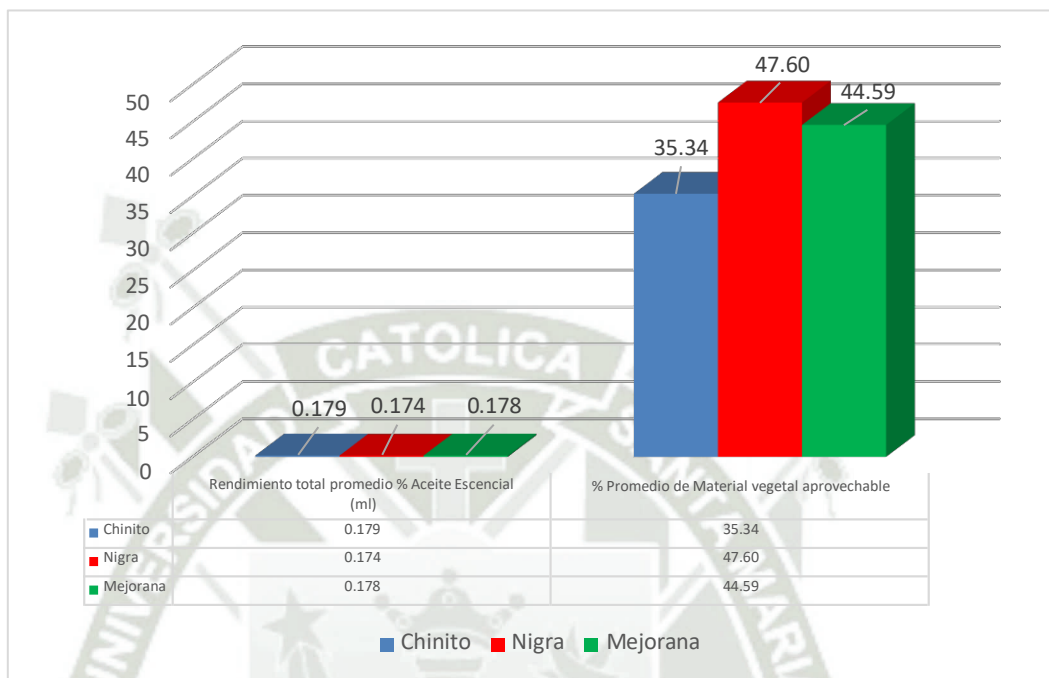


Figura N° 47. Porcentaje promedio de material aprovechable según ecotipos de orégano por etapas de cosecha

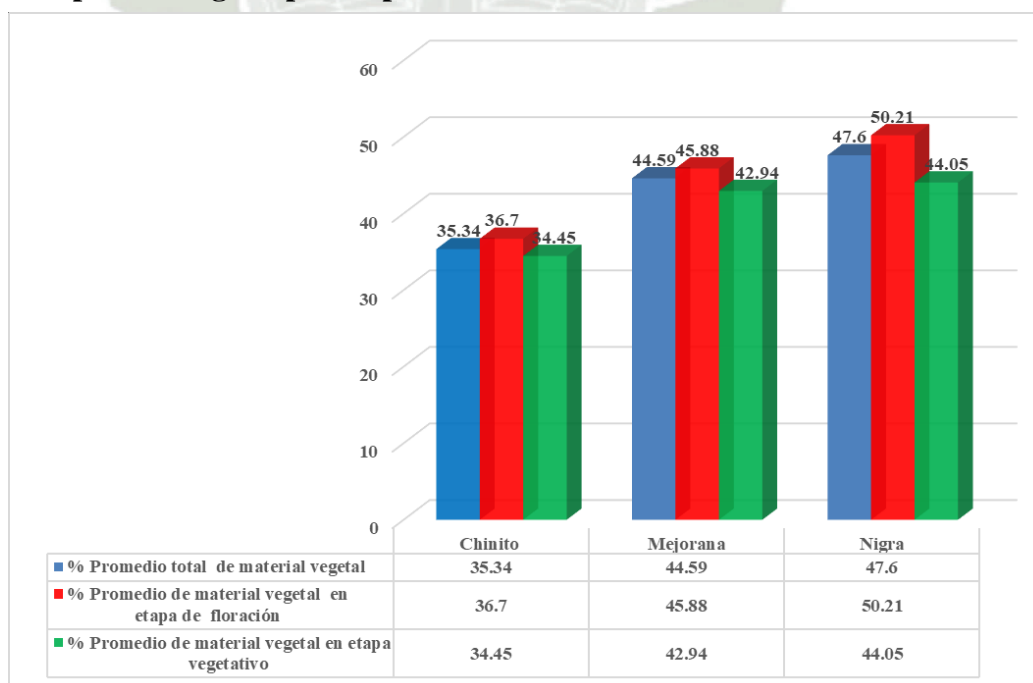


Figura N° 48. Porcentaje de Rendimiento de aceite esencial según ecotipos de orégano por etapas de cosecha

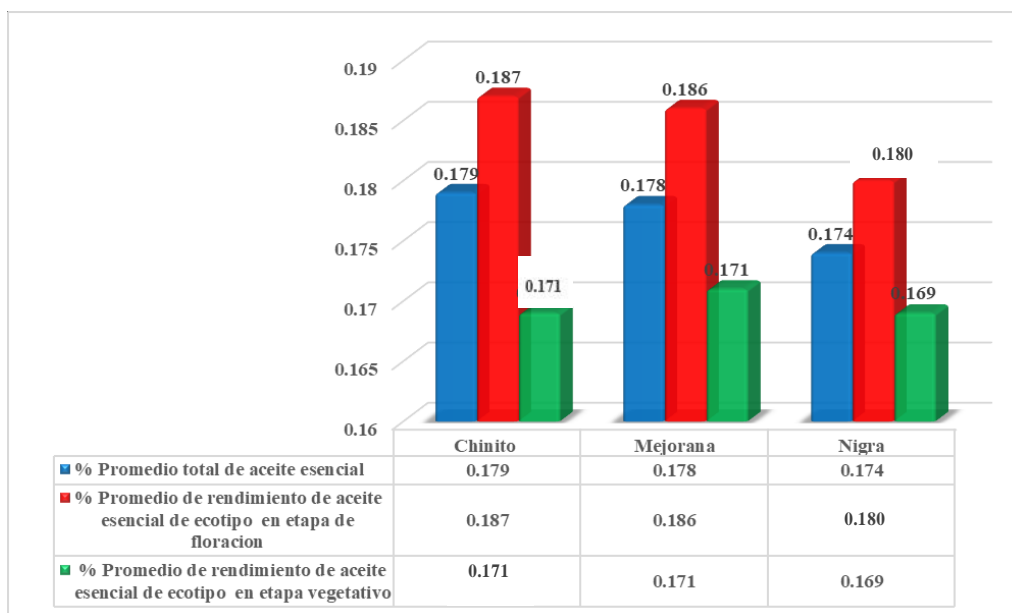


Figura N° 49. Resultados comparativos de Halo Inhibición de Aceite ecotipo Chinito y antibióticos convencionales

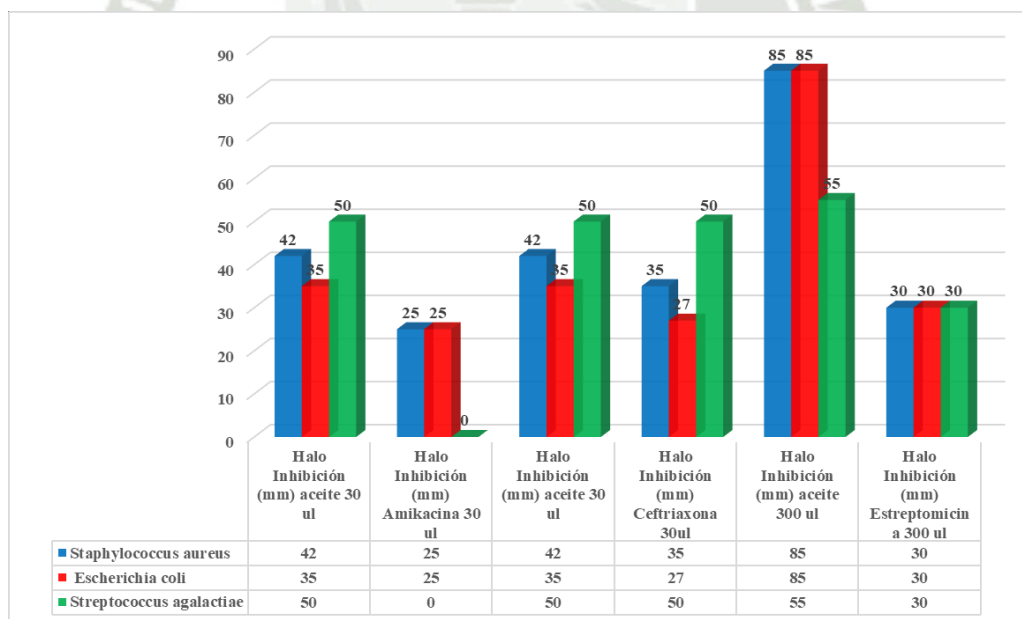


Figura N° 50. Resultados comparativos de Halo Inhibición de Aceite ecotipo Nigra y antibióticos convencionales

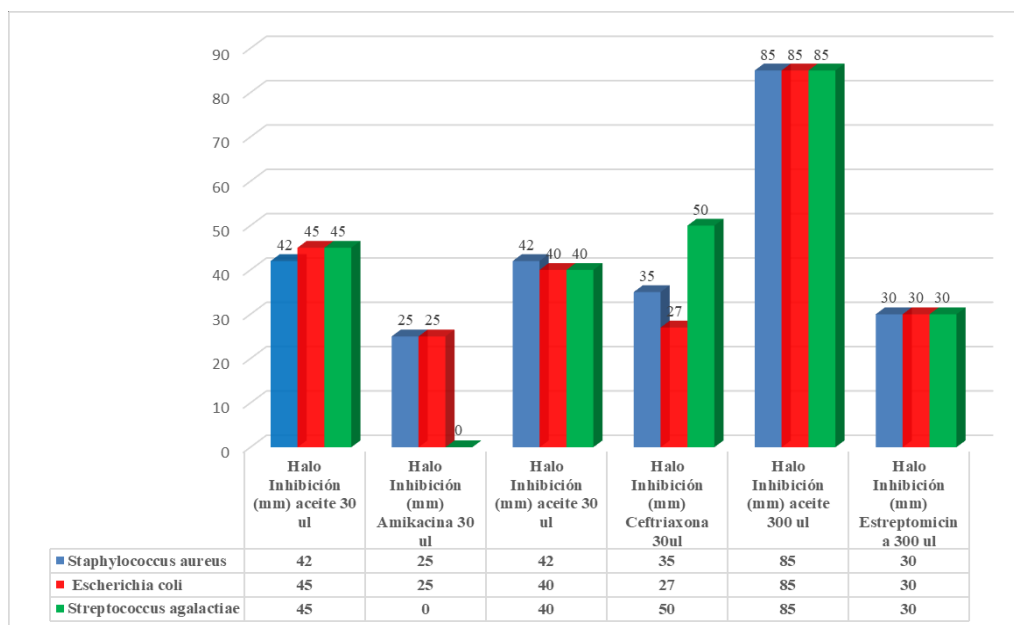


Figura N° 51. Resultados comparativos de Halo Inhibición de Aceite ecotipo Mejorana y antibióticos convencionales

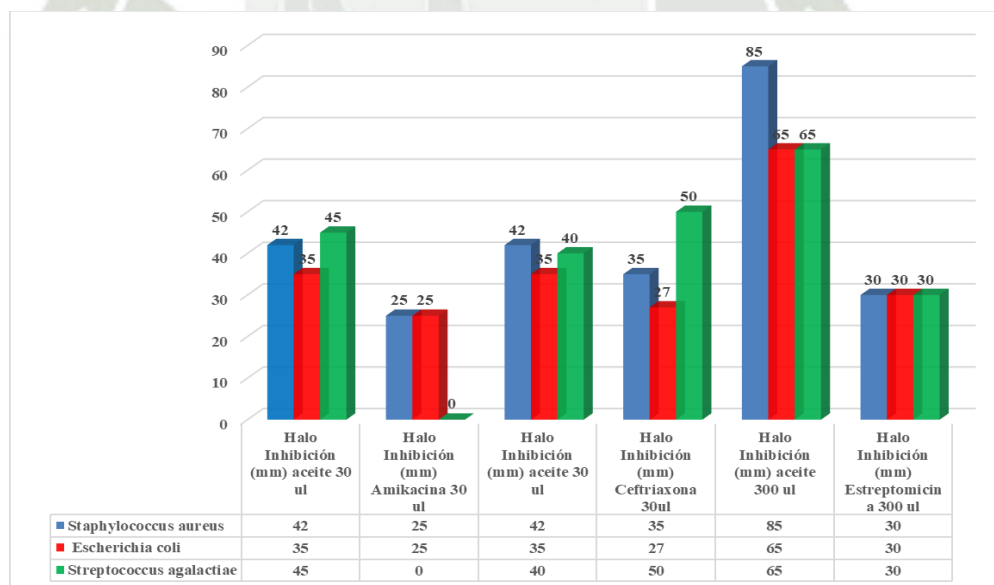


Figura N° 52. Resultados comparativos de la CMI de los tres ecotipos de orégano en tres bacterias de estudio

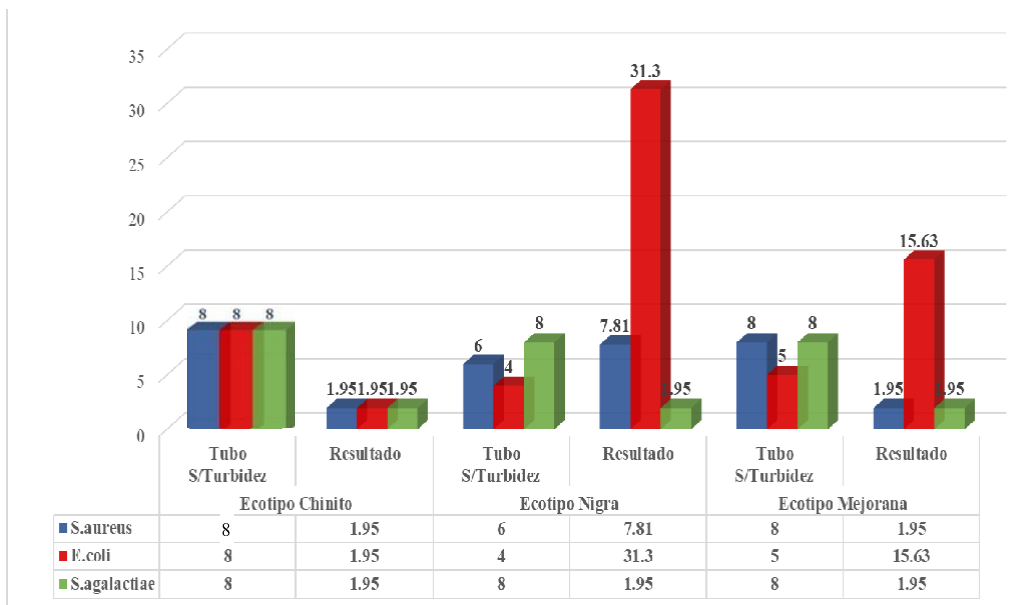


Figura N° 53. Resultados comparativos de la CMB de ecotipos de orégano en tres bacterias de estudio.

