



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
E. A. P. DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA



TESIS

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L.
(ORÉGANO) SOBRE *Propionibacterium acnes* AISLADAS DE PACIENTES CON
ACNÉ FACIAL**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACH. JHANELY LIZBETH VÁSQUEZ SALAZAR

ASESORA:

Dra. Mblga. CLAUDIA CAROLINA RODRÍGUEZ ULLOA

CO-ASESORA:

Dra. Q. F. JÉSSICA NATHALIE BARDALES VALDIVIA

Cajamarca – Perú

2023

COPYRIGHT©
JHANELY LIZBETH VÁSQUEZ SALAZAR
Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Vásquez, J. 2023. **Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) sobre *Propionibacterium acnes* aisladas de pacientes con acné facial**/Jhanely Lizbeth Vásquez Salazar.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesora: Dra. Mblga. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

Co-Asesora: Dra. Q. F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Disertación académica para obtener el título profesional de Biólogo Biotecnólogo –
UNC 2023

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L.
(ORÉGANO) SOBRE *Propionibacterium acnes* AISLADAS DE PACIENTES CON
ACNÉ FACIAL**

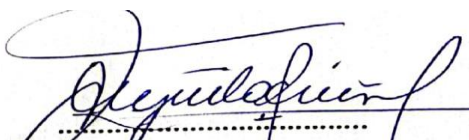
AUTORA: Bach. Jhanely Lizbeth Vásquez Salazar

ASESORA: Dra. Mblga. Claudia Carolina Rodríguez Ulloa

CO-ASESORA: Dra. Q. F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

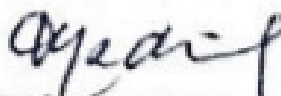
Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



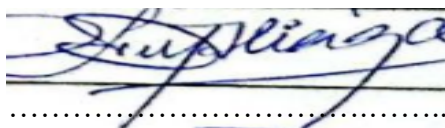
Presidente

M. Cs. Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos



Secretaria

Dr. Carmen Eddy Medina Rodríguez



Vocal

M. Cs. Arturo Ulises Díaz Aliaga

Cajamarca, 2023 - Perú



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las nueve horas del 20 de Junio del 2023, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 1E-304 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada: Efecto antibacteriano del aceite esencial de Origanum vulgare L. (Orégano) sobre Propionibacterium acnes aisladas de pacientes con acné facial.

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Jhonely Lizbeth Vásquez Salazar

Siendo las diez horas del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: APROBADA, con el calificativo de 17, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas, se encuentra APTA para la obtención del Título Profesional de: BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO.

Table with 2 columns: Miembros Jurado Evaluador (Nombres y Apellidos) and Firma. Rows include Presidente (Rodolfo Raúl Orejuela Chirinos), Secretario(a) (Carmen Eddy Medina Rodríguez), Vocal (Arturo Ulises Díaz Aliaga), Accesitaria (blank), Asesor (a) (Claudia Carolina Rodríguez Ulloa), and Co-Asesor (a) (Jéssica Bardales Valdivia).

Términos de Calificación: EXCELENTE (19-20) REGULAR (12-13)

MUY BUENO (17-18) REGULAR BAJO (11)

BUENO (14-16) DESAPROBADO (10 a menos)

A:

Mis padres, que son la motivación que tengo para cumplir mis metas profesionales, gracias a sus sabios consejos y su apoyo constante pude lograr concluir mis estudios universitarios.

Muchas son las lecciones que se pueden
extraer del estudio de las plantas, si se
procura el verdadero espíritu de la sabiduría.

John Hutton Balfour
(Médico y botánico escocés)

Agradecimiento

Mi sincero agradecimiento a la Universidad Nacional de Cajamarca, por haberme recibido de manera grata en sus instalaciones y con docentes capacitados a lo largo de mi carrera profesional de Biología y Biotecnología y en especial a mi Asesora Dra. Mblga. Rodríguez Ulloa Claudia Carolina por su aporte invaluable en la materialización de esta tesis. Gracias por su ayuda y su tiempo; sobre todo, por el ejemplo de dedicación e integridad que siempre me ha brindado. De igual manera, agradezco a mi Co-asesora Dra. Q.F. Bardales Valdivia Jéssica Nathalie por compartir sus conocimientos científicos sobre el manejo y proceso de aceites esenciales.

También quisiera expresar mi agradecimiento a laboratorios BIOMIC, quienes me brindaron un espacio para la ejecución de la etapa experimental de mi tesis.

Tabla de contenido

Título	xiii
Resumen	xiv
Abstract	xv
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	3
MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes de la Investigación	3
2.2. Bases Teóricas	7
2.2.1. Acné	7
2.2.2. <i>Propionibacterium acnes</i> .	9
2.2.3. <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano)	11
2.2.4. Aceite esencial	14
CAPÍTULO III	18
DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS	18
3.1. Nivel de Investigación	18
3.2. Tipo y Diseño de Estudio	18
3.3. Material Biológico	18
3.4. Lugar de muestreo del material vegetal	19
3.5. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos	20
3.6. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos	27
3.7. Aspectos éticos de la investigación	27
CAPÍTULO IV	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1. Resultados	28
4.1.1. Evaluación del efecto antibacteriano	28
4.1.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB)	31
4.2. Discusión	32
CAPÍTULO V	37
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	37
5.1. Conclusiones	37

5.2. Recomendaciones	38
APÉNDICES	47
APÉNDICE N°1. Toma de muestra de lesiones pustulares.	47
APÉNDICE N°2. Especie vegetal.	48
APÉNDICE N°4. Reactivación de la cepa <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC® 6919™	49
APÉNDICE N°5. Aislamiento de <i>Propionibacterium acnes</i> .	50
APÉNDICE N°6. Identificación de aislamiento y cepa de referencia <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC® 6919™	51
APÉNDICE N°7. Evaluación del efecto antibacteriano: método de difusión en agar con disco.	54
APÉNDICE N°8. Distribución de los discos para la evaluación de efecto antibacteriano del aceite esencial.	55
APÉNDICE N°9. Consentimiento para participar en el estudio de investigación.	56
APÉNDICE N°10. Diámetros de los halos de inhibición por triplicado.	59
APÉNDICE N°11. Análisis estadísticos.	61
ANEXOS	63
ANEXO N°1. Constancia de identificación botánica de <i>Origanum vulgare</i> L.	63
ANEXO N°2. Sistema de Identificación ANAEROBE SYSTEM 71620	64
ANEXO N°3. Identificación en el software de las cepas de <i>Propionibacterium acnes</i> .	72
ANEXO N°4. Medio de Cultivo Modificado para <i>P. acnes</i> .	73

Lista de abreviaciones

AE: Aceite esencial

ATCC: American Type Culture Collection

BHI: Brain Heart Infusion

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMB: Concentración mínima bactericida

MDR: Multidrogoresistente

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

GC-EM: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

TSA: Agar Tripticasa Soya

MH: Agar Müller-Hinton

MN: Minociclina

DMSO: Dimetilsulfóxido

Glosario

Aceite esencial: Fracción líquida y volátil de la planta, generalmente destilable por arrastre con vapor de agua, contiene compuestos químicos antisépticos y son importantes en la farmacéutica (1).

Actividad antibacteriana: Capacidad del aceite esencial de inactivar microorganismos, impidiendo su proliferación y/o su acción patógena (2).

Resistencia bacteriana: Consiste en los mecanismos de protección que desarrolla la bacteria modificando su información genética, por lo que la hacen resistente a los efectos de un antibiótico (3).

Minociclina: Antibiótico perteneciente al grupo de las tetraciclinas, es un medicamento bacteriostático que frena el crecimiento de las bacterias sensibles a su acción, su eficacia ha sido comprobada en el tratamiento médico de enfermedades inflamatorias, siendo especialmente indicado para tratar el acné vulgar (4).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 a 24 horas de incubación (5).

Concentración Mínima Bactericida (CMB): La menor concentración de antimicrobiano que ha matado el 99,9 % del inóculo original. El recuento se realiza habitualmente mediante técnicas de cultivo concretamente de los métodos de macro o microdilución que se utilizan para la determinación de la CMI (6).

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L.
(ORÉGANO) SOBRE *Propionibacterium acnes* AISLADAS DE PACIENTES
CON ACNÉ FACIAL**

Resumen

En el presente trabajo de investigación se determinó el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) sobre *Propionibacterium acnes* aisladas de personas con acné facial. Se obtuvo aceite esencial de orégano mediante destilación por arrastre de vapor de agua. Se comparó el efecto antibacteriano *in vitro* a diferentes concentraciones (10 %, 50 %, 100 %) del aceite esencial de orégano con el antibiótico minociclina sobre los aislamientos bacterianos y la cepa de referencia *P. acnes* ATCC® 6919™ por el método de difusión en disco (Kirby Bauer) en agar Mueller-Hinton con sangre, también se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). El aceite esencial de orégano mostró diámetros promedio de halo de inhibición de 36,6 mm; 20,3 mm y 9,45 mm a concentraciones de 100 %, 50 % y 10 % respectivamente; la minociclina 30 µg presentó halos de inhibición de 30,7 mm. Todos los aislamientos bacterianos fueron sensibles a la acción de los aceites de orégano al 50 % y 100 %, solo en la concentración al 10 % algunos de los aislamientos no presentaron sensibilidad. La CMI fue de 3,12 % y la CMB fue de 6,25 % para la mayoría de cepas aisladas. Se concluye que las concentraciones de aceite de orégano al 50 % y 100 % presentan un notable efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *P. acnes*.

Palabras clave: Aceite esencial, acné facial, *Propionibacterium acnes*, *Origanum vulgare*, efecto antibacteriano.

Abstract

In the present research work, the antibacterial effect of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (oregano) on *Propionibacterium acnes* isolated from people with facial acne was determined. Oregano essential oil was obtained by steam distillation. The in vitro antibacterial effect at different concentrations (10 %, 50 %, 100 %) of the essential oil of oregano was compared with the antibiotic minocycline on the bacterial isolates and the reference strain *P. acnes* ATCC® 6919™ by the diffusion method. in disk (Kirby Bauer) on Mueller-Hinton agar with blood, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MCB) were also determined. The oregano essential oil showed average inhibition halo diameters of 36.6 mm, 20.3 mm and 9.45 mm at concentrations of 100 %, 50 % and 10 % respectively; minocycline 30 µg presented inhibition halos of 30.7 mm. All the bacterial isolates were sensitive to the action of oregano oils at 50 and 100 %, only in the 10 % concentration some of the isolates did not show sensitivity. The MIC was 3.12 and the MBC was 6.25 % for most isolated strains. It is concluded that the concentrations of oregano oil at 50 % and 100 % have a notable inhibitory effect on the growth of *P. acnes*.

Key words: Essential oil, facial acne, *Propionibacterium acnes*, *Origanum vulgare* L., antibacterial effect.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El acné es una de las enfermedades más comunes y frecuentes de la piel, se inicia principalmente en la pubertad, con una prevalencia de casi el 95 %, aunque en algunos casos puede presentarse en edades más tardías (7,8). Es una condición que con frecuencia afecta psicológica y físicamente a quien lo padece en especial los casos inflamatorios, se caracteriza por presentar comedones, pápulas, pústulas, nódulos y/o quistes, afectando principalmente la cara (7,9,10). Múltiples estudios revelan que una de las causas responsables del acné es *Propionibacterium acnes* recientemente reclasificada como *Cutibacterium acnes* (11), de allí que los tratamientos para esta enfermedad consisten en neutralizar dicha bacteria, a fin de evitar la aparición de las antiestéticas espinillas (7).

El acné es una enfermedad que afecta las glándulas sebáceas, inicia con la obstrucción de los folículos pilosos por un exceso de sebo y junto con las células muertas de la piel, serían los causantes de la formación del microcomedón, que en su interior favorece un ambiente anaerobio y rico en ácidos grasos, ideal para propiciar el crecimiento de ciertos filotipos de *P. acnes* (12–14). El acné puede ser inflamatorio y no inflamatorio, aunque su desarrollo es particular en cada paciente; la lesión inflamatoria suele estar relacionada con *P. acnes* que, al proliferar en un ambiente anaerobio, activan al sistema inmunitario desencadenando una respuesta inflamatoria (10–12).

Existen varias terapias indicadas por dermatólogos para combatir el acné, pero sus elevados costos, los efectos secundarios por el uso de antibióticos y la resistencia de las cepas de *P. acnes* obliga a buscar tratamientos alternativos a los antimicrobianos (7,8). En este contexto,

el tratamiento tópico del acné basado en productos naturales cobra cada vez más importancia, especialmente el empleo de aceites esenciales, puesto que muchos de ellos combinan actividades antiinflamatorias y antisépticas, útiles para curar el acné (13,15). Desde esta perspectiva, se origina el problema de investigación: ¿Cuál es el efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) sobre *Propionibacterium acnes* aisladas de personas con acné facial?; y la siguiente hipótesis: El aceite esencial de orégano inhibe el crecimiento de *P. acnes* aisladas de personas con acné facial.

Los estudios realizados sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano sobre *P. acnes*, utilizan principalmente cepas de referencia (15,19), no habiéndose evaluado su efecto sobre bacterias aisladas directamente de personas con lesiones pustulares, por consiguiente, este trabajo de investigación tiene como objetivo general: Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *O. vulgare* L. (orégano) sobre *P. acnes* aisladas de personas con acné facial.

Teniendo en cuenta el problema y la hipótesis respectiva, se realizó la obtención del aceite esencial de *O. vulgare* L. (orégano) mediante la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua (20), para luego determinar la actividad antibacteriana *in vitro* por el método de Kirby Bauer (21) usando aislamientos de *P. acnes* obtenidas de personas con acné facial. De esta manera, el alcance que se da con esta investigación es que el aceite esencial de orégano se puede incluir como tratamiento complementario para el acné y utilizarlo en el desarrollo de productos dermatológicos como una alternativa natural. Cabe señalar que existe cierta limitación en la extracción del aceite esencial de orégano ya que depende de la zona donde fue cultivado, su clima frío y además la exposición al sol, lo que hará variar la cantidad de aceite esencial que se puede extraer de las hojas.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

Carhuallanqui A. *et al.* (22) evaluaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial de orégano procedente de la provincia de Concepción, Región Junín (Perú) contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. El aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) mediante microdilución y la concentración mínima bactericida (CMB) por siembra en agar. El perfil de cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC-EM) del aceite de orégano determinó la presencia de monoterpenos en baja concentración como el timol (11,9 %) y el carvacrol (1,7 %). Los resultados mostraron datos satisfactorios en la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* (CMI= 2 %, CMB= 4 %) y *L. monocytogenes* (CMI= 4 %, CMB= 4 %). El alto porcentaje de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) se debió a la alta concentración de carvacrol y timol. En conclusión, el aceite esencial de orégano se puede usar en la industria alimentaria como un antimicrobiano y/o desinfectante natural.

Taleb M. *et al.* (15) evaluaron la actividad de siete aceites esenciales que se utilizan comúnmente en la medicina popular frente a *P. acnes* y *S. epidermidis*, dos de las principales bacterias asociadas al acné, que desarrollaron resistencia a los antibióticos. El análisis de actividad antimicrobiana de estos aceites mostró que el orégano exhibía la mayor actividad

antimicrobiana con una CMI de 0,34 mg/mL y una CMB de 0,67 mg/mL contra *P. acnes*, y CIM de 0,67 mg/mL y CMB de 1,34 mg/mL contra *S. epidermidis*. Los fenoles monoterpenoides predominaron en el aceite esencial de orégano y el tomillo. Además, el orégano exhibió el efecto anti-biofilm más fuerte contra *S. epidermidis*. Se concluyó que el aceite esencial de orégano, es una alternativa natural potencial y efectiva para tratar el acné y superar la resistencia a los antibióticos emergentes.

Salinas R. (23) desarrolló una investigación con el objetivo de comprobar la actividad antimicrobiana del aceite esencial del orégano peruano frente a *S. aureus*. El aceite esencial se obtuvo por el método de destilación de arrastre con vapor de agua y la actividad antimicrobiana se ensayó con cepas de *S. aureus* ATCC 6538 mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), el control positivo fue con discos de gentamicina 10 µg y el control negativo con dimetilsulfóxido. Entre los resultados se determinó que el aceite esencial tiene un buen rendimiento siendo 2,02 %, destilado en un tiempo de 60 minutos, densidad de 0,9132 g/mL, índice de refracción de 1,475 y siendo los principales componentes el carvacrol y timol. El aceite esencial de *O. vulgare* L. tuvo actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, los halos de inhibición fueron 11,47; 13,40; 16,60 y 19,65 mm; a las concentraciones de 25, 50, 75 y 100 µg/mL respectivamente y para la gentamicina se obtuvo un halo de inhibición de 30,14 mm. Se concluye que la mayor concentración (100 µg/mL) del aceite esencial de *O. vulgare* L. presenta mayor actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*.

Mamani M. (24) comparó la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *O. vulgare* L. (orégano) y la amoxicilina de 500 mg frente al *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Se obtuvo el aceite esencial de las hojas mediante la destilación por arrastre de vapor y la determinación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano y de la amoxicilina se realizó por el método difusión en disco (Kirby Bauer). Se evidenció que el aceite esencial de orégano presentó actividad antibacteriana frente *S. pyogenes* con concentraciones de 3,64 mg/mL (13,69 mm) hasta 17,30 mg/mL (33,13 mm), además se comprobó la actividad antibacteriana de la amoxicilina frente a *S. pyogenes* con concentraciones de 4,5 mg/mL (9,2 mm) hasta 11,5 mg/mL (12 mm). Se concluyó que el aceite esencial de orégano presentó una mayor actividad antibacteriana en comparación con la amoxicilina de 500 mg frente a *S pyogenes* ATCC 19615.

Torrenegra M. *et al.* (19) evaluaron la composición química, la sensibilidad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria *in vitro* de tres aceites esenciales de las especies *O. vulgare* L (orégano), *Plectranthus amboinicus* (orégano borde blanco) y *Lippia alba* Mill (oreganito), obtenidos mediante hidrodestilación e hidrodestilación asistida por radiación con microondas. La actividad se realizó sobre tres bacterias implicadas en el desarrollo del acné *P. acnes* ATCC 11827, *S. aureus* ATCC 25923 y *S. epidermidis* ATCC 12228. Los resultados mostraron los rendimientos que oscilaron entre 0,04 % y 0,16 %, dependiendo de la especie vegetal y el método de extracción utilizado; las bacterias fueron más sensibles al aceite esencial de orégano borde blanco; además, este aceite presentó el mayor contenido de monoterpenos oxigenados con reconocida actividad antibacteriana, como el carvacrol y el timol. En conclusión, se demostró que el aceite esencial de orégano borde blanco es

considerado como eficaz para el control de *P. acnes* ATCC 11827, *S. aureus* ATCC 25923 y *S. epidermidis* ATCC 12228.

Lu M. *et al.* (25) evaluaron la actividad del aceite esencial de *O. vulgare* contra bacterias multidrogoresistentes (MDR) y bacterias gram positivas y gram negativas. Mediante un aparato tipo Clevenger obtuvieron el aceite esencial de orégano y usaron cinco especies de bacterias aisladas de diferentes fuentes clínicas, dos gram negativas (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* MDR) y tres bacterias gram positivas (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*). Se prepararon las siguientes concentraciones: 1000, 500, 250, 125 y 62,5 µg/mL para evaluar la actividad antibacteriana mediante difusión en pocillos de agar. Se utilizaron ampicilina y amoxicilina como control positivo para todas las cepas, mientras que dimetilsulfoxido como control negativo. Concluyeron que el aceite esencial de *O. vulgare* inhibe el crecimiento de bacterias MDR al igual que los demás tipos de bacterias estudiadas.

Hao Y. *et al.* (26) tuvieron como objetivo evaluar el efecto antibacteriano y el mecanismo de un aceite esencial rico en carvacrol extraído de *Origanum vulgare* "Hot & Spicy" en la inactivación de *Staphylococcus aureus*. En el análisis por CG-EM del aceite esencial obtuvieron 27 compuestos siendo el carvacrol (84,38% del total) el mayor. El promedio del diámetro de Los halos de inhibición fue de 29,10 mm, y la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) contra *S. aureus* fueron 0,125 y 0,25 mg/mL, respectivamente. El análisis de enriquecimiento de la ruta de la Enciclopedia de

genes y genomas de Kyoto indicó que las proteínas expresadas diferencialmente estaban involucradas en las rutas de los ribosomas; biosíntesis de valina, leucina e isoleucina; y biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano, lo que evidenció la inhibición del crecimiento de *S. aureus* causado por el aceite esencial. Según los resultados se pudo comprender cuál es el mecanismo de acción frente a *S. aureus*. Concluyendo, que los aceites esenciales ricos en carvacrol podrían usarse en entornos de producción de alimentos para un control efectivo de bacterias.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Acné

El acné de tipo inflamatorio afecta principalmente el folículo sebáceo, aunque no se conoce claramente los factores que llevan a desarrollar esta enfermedad se puede afirmar que en este proceso interviene *P. acnes* y otras bacterias presentes en la piel. La obstrucción de los folículos sebáceos por un exceso de sebo junto con células epiteliales descamadas procedentes de la pared folicular (hiperqueratosis ductal) forman el microcomedón donde se crea un ambiente anaerobio en el cual *P. acnes* prolifera con facilidad. Por otro lado, las lesiones no inflamatorias son menos invasivas como los comedones abiertos (puntos negros o barrillos) y los microquistes o comedones cerrados (3,27,28).

Etiología y patogenia

Tiene etiología multifactorial y está relacionada con genes hereditarios autosómica dominante, en la que influyen diferentes factores como, por ejemplo: ambientales,

hormonales, cosméticos, emocionales y alimenticios. Su patogenia depende de cuatro alteraciones básicas las cuales son (3):

- a. Obstrucción del folículo sebáceo por hiperqueratinización,
- b. Alteración de la producción de sebo como respuesta a la glándula sebácea regulada por los andrógenos.
- c. Modificación de la microbiota de la piel y proliferación de *P. acnes*.
- d. Secreción de quimiocinas por *P. acnes* que atraen a los mediadores de la inflamación.

Existe una correlación entre cada una de estas etapas y las lesiones clínicas. Así pues, el tapón de queratina produce una retención del sebo secretado que progresivamente distiende el folículo, provocando una lesión no inflamatoria denominada microcomedón, que al aumentar de tamaño se convierte en comedón (28).

La excesiva producción de sebo de las glándulas sebáceas, está regulada por los andrógenos, como prueba de ello, sus receptores se encuentran ubicados en la vaina radicular externa en la parte inferior del infundíbulo de los folículos pilosos. También se ha demostrado que la formación de comedones se redujo en pacientes que recibieron tratamiento antiandrogénica y, finalmente, se identificó enzimas específicas involucradas en el metabolismo de los andrógenos (28).

En vista de lo anterior y como consecuencia del exceso de sebo, se da la proliferación de *P. acnes*, que condiciona un aumento de sustancias biológicamente activas, como lipasas y proteasas que pueden disolver la pared del conducto y de factores quimiotácticos que, al extenderse por la dermis, atraen a los polimorfonucleares y macrófagos activando el complemento. Esta respuesta de tipo inmunológica más la salida del contenido folicular hacia la dermis, son las causas que convierten una lesión no inflamatoria de acné en lesiones inflamatorias como pápulas, pústulas, nódulos y abscesos (29).

Tabla N° 1. Tipos de lesiones presentes en acné vulgar, clasificadas según el grado de inflamación (1,30).

Lesiones no inflamatorias	Lesiones inflamatorias	Lesiones residuales
Comedón cerrado	Pápulas	Mácula rosada
Comedón abierto	Pústulas superficiales	Cicatrices atróficas
	Pústulas profundas	Cicatrices hipertróficas
	Nódulo	
	Quiste	
	Absceso	

Fuente: Wistuba (2018) y Avilés (2010).

2.2.2. *Propionibacterium acnes*.

Bacteria anaerobia gram positiva, es parte de la microbiota cutánea y está involucrada en enfermedades inflamatorias, como el acné, endocarditis, y hepatitis granulomatosa (3). Una vez se haya dado la producción de sebo, *P. acnes* coloniza los folículos sebáceos liberando lipasa y mediadores proinflamatorios. Se ha reportado que *P. acnes* induce a las células inmunitarias a segregar varias citoquinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) -8 e IL-1 β , que son importantes para el desarrollo de la inflamación de la piel (31). Dado que *P. acnes* es fundamental en el proceso

inflamatorio, la supresión de la inflamación inducida por esta bacteria es una de las estrategias críticas para el tratamiento del acné vulgar (29). *P. acnes*, produce diversas enzimas, tales como hialuronidasa, sulfatasa, neuraminidasa y lipasa que hidroliza los triglicéridos. Esta lipasa desdobla los ácidos grasos de cadenas largas de la piel produciendo una irritación de ésta contribuyendo a la formación del acné (30).

Inflamación por *P. acnes*.

En los pacientes con acné, *P. acnes* es responsable de activar la inmunidad innata vía receptor toll-like tipo 2 (TLR2), esta activación va depender los componentes de la pared celular de la bacteria en caso no se encuentra dañada o inactivada. En respuesta a la activación del TLR2, hay producción de IL-1a por los queratinocitos foliculares, la producción de factor nuclear kappa-light (NF-kB) por células B activadas y producción de IL-12 e IL-8 por los monocitos. La mayor expresión del gen de la síntesis inducida por el óxido nitroso y el gen de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) acompañan a la activación de los macrófagos, con el aumento del óxido nitroso (NO) y de la prostaglandina E2 (PG E2) en un mecanismo dependiente. (31,32).

Se ha demostrado que la liberación de la IL-1b por los monocitos depende de la fagocitosis de *P. acnes*. Las cepas con reconocida habilidad de invadir células epiteliales son en el 71 % de los casos del tipo I. La IL-1b es posible responsable de la inducción de la respuesta inflamatoria neutrofílica inducida por *P. acnes*. En los neutrófilos, la bacteria puede inducir la formación de caspas-1 con la generación de más IL-1b e IL-18. Además, *P. acnes* induce

la producción de IL1 en los sebocitos y estimula la producción de genes relacionados a la respuesta inmune Th17, además de estimular la secreción de la IL-17 por los linfocitos CD4+ (28).

Resistencia antimicrobiana de *P. acnes*.

En los últimos veinte años hubo un aumento significativo en la resistencia antimicrobiana de cepas de *P. acnes*. La resistencia afecta especialmente a eritromicina, clindamicina, tetraciclina, doxiciclina y trimetoprim; aunque la resistencia a minociclina es menor (33). Un estudio sobre la susceptibilidad a antibióticos de *P. acnes* encontró 2,6 % de cepas resistentes a tetraciclina, 15,1 % a clindamicina y 17,1 % a eritromicina, no observando resistencia a linezolid, benzylpenicilina o vancomicina. Estos últimos antimicrobianos son efectivos contra *P. acnes*, pero específicamente indicados en infecciones severas post quirúrgicas o septicemias (30,32).

2.2.3. *Origanum vulgare* L. (orégano)

Tabla N°2. Clasificación taxonómica (Anexo N°1) (34)

Descripción	Nombre científico
Reino:	Plantae
División:	Tracheophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Lamiales
Familia:	Lamiaceae
Sub Familia:	Nepetoideae
Tribu:	Mentheae
Género:	Origanum
Especie:	<i>Origanum vulgare</i> L.

Nombres comunes

El nombre de orégano es utilizado en el continente americano y europeo, aunque también la denominan orégano de España, fluriégano, mejorana bastarda, oriégano. El nombre de esta planta varía de acuerdo al país donde se encuentre (35).

Descripción botánica

Origanum vulgare L. es una planta perenne de base leñosa y tallos herbáceos que llegan a medir entre 20 a 80 cm de altura. De hojas opuestas, de 1 a 4 cm de largo y de 0,5 a 2,5 cm de ancho, sus márgenes son lisos y las puntas pueden ser redondeadas o puntiagudas. Agrupadas en panículas terminales y laterales se encuentran las flores que son relativamente pequeñas, cinco pétalos enlazados forman la corola, miden 0,4 a 0,8 cm de largo, son de color blanco a púrpura. También se encuentran unidos los sépalos, el interior de la flor contiene cuatro estambres y el pistilo consta de dos carpelos fusionados. Además, los frutos son nueces pequeñas. *O. vulgare* L. es una especie muy variable porque abarca varias subespecies, las que se reconocen seis: *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietsw., subsp. *grácil* (K. Koch) Ietsw., subsp. *hirtum* (Enlace) A. Terracc., subsp. *Virens* (Hoffmanns. & Link) Ietsw., subsp. *viridulum* (Martrin-Donos) Nyman, y subsp. *vulgar*. Las primeras tres subespecies se consideran de alta calidad, ricas en aceites volátiles a diferencia de las últimas tres que son pobres en aceites esenciales (36).

Hábitat y distribución geográfica

Crece de forma espontánea en buena parte de Europa, centro y norte de Asia, actualmente se cultiva en todo el mundo. El orégano es una planta con gran tolerancia para sobrevivir en diferentes condiciones ambientales, tiene la capacidad de resistir bien las heladas, pero en general las temperaturas menores a los 5 °C afectan el crecimiento del cultivo, retrasándolo y quemando los bordes de las hojas, el clima recomendado para cultivar orégano es templado o templado cálido. En cuanto a la altitud, el orégano puede crecer entre los 1500 a 3000 msnm, pero prefiere zonas con una alta luminosidad. Tiene éxito en casi todos los tipos de suelo ricos en materia orgánica como suelos franco-arenoso, los arcillo-arenosos y los francos, que sean permeables y con buen drenaje, de preferencia no salinos; en los suelos arcillosos la longevidad se reduce (23,24).

Composición química

Las partes aéreas de *O. vulgare* contienen una diversidad de flavonoides, taninos, glucósidos fenólicos y terpenoides. La luteolina-O-glucurónida y la luteolina-7-O-glucósido son los principales derivados flavonoides que se encuentran en los extractos hidroalcohólicos, decocciones e infusiones de *O. vulgare*, mientras que el ácido rosmarínico es el principal ácido fenólico. También se ha reportado la presencia de ácido cafeico, ácido protocatechuico, ácido vanílico y ácido o-cumárico. El constituyente químico central del orégano es el aceite esencial, contiene monoterpenos e hidrocarburos sesquiterpénicos, así como compuestos fenólicos. Los principales constituyentes son los terpenos como timol, carvacrol, p-cimeno, γ -terpineno y linalol (36).

Usos medicinales

El uso del orégano en la etnomedicina se relaciona con propiedades estomacales, carminativos, expectorantes y emenagogas. Se ha indicado como infusión para trastornos respiratorios y digestivos. Además, es un buen ungüento para heridas. Se usa tradicionalmente para tratar la indigestión, diarrea, tos y bronquitis. También se utiliza como remedio para la picazón, los dolores de cabeza y la depresión. Se han mencionado usos específicos de diferentes partes de la planta: partes aéreas para el alivio del dolor, tos o disfunciones sexuales, las semillas para infecciones del tracto urinario o trastornos menstruales, las ramas florales para uso externo en caso de una fractura o aliviar un dolor de diente (35,36).

2.2.4. Aceite esencial

Los aceites esenciales son mezclas de sustancias extraídas de las plantas, de compleja composición química y de intensas propiedades aromáticas. De las varias especies vegetales que existen en nuestro planeta, se conocen unos cuatro mil aceites esenciales diferentes, aunque evidentemente no todas las plantas contienen estas sustancias además que se encuentran en concentraciones muy bajas (23).

Los aceites esenciales suelen ser una mezcla compleja de más de cien componentes, que pueden ser: compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos. La gran mayoría tienen un olor agradable, aunque hay unos pocos que son relativamente desagradables (2,23).

Características físicas del aceite esencial de orégano

Es de aspecto oleoso, altamente volátil, soluble en solventes orgánicos, insoluble en agua, pero le transmiten su perfume, son inflamables, responsables del aroma, color y sabor de la planta, con densidad menor a la del agua (5,37).

Actividad antibacteriana del aceite esencial de orégano.

La presencia de compuestos activos como el timol y carvacrol le dan propiedades antibacterianas al aceite esencial de orégano. Varios estudios evidenciaron la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales del género *Origanum* presentando actividad contra bacterias gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y sobre gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*. Además de otros microorganismos como *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii* biogroup *sobria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhimurium y *Serratia marcescens*. Toda esta población bacteriana se ha podido inhibir gracias a la presencia del aceite esencial de orégano (2,23,24).

Mecanismo de acción del aceite esencial de orégano.

El aceite esencial actúa principalmente en la pared celular y la membrana citoplasmática y va depender del tipo de microorganismos a los cuales se enfrentan, el mecanismo de acción más conocido es cuando el aceite esencial por su naturaleza lipófila se une a la pared

bacteriana alterando y aumentando su permeabilidad, provocando la liberación de los componentes celulares al exterior de la célula. En última instancia, estas alteraciones resultan en la muerte de la bacteria. Por otro lado, gracias a los distintos fitoconstituyentes del aceite esencial de orégano principalmente el timol y carvacrol que se encuentran en mayor concentración, los cuales interfieren en la síntesis de ciertas proteínas además de la reducción de los niveles de ATP y pH, alterando el metabolismo de la bacteria (23).

Métodos de extracción de aceites esenciales (38):

a) Directo: Consiste en prensar (exprimir y raspar la cáscara del aceite esencial de cítricos) y pelar (quitar la resina).

b) Destilación

Destilación directa: La destilación implica calentar la planta, en otras palabras, llevar a ebullición el agua. El resultado se recoge en un tubo de refrigeración y al condensarse se separa el agua del aceite por las distintas densidades que tienen.

Destilación por arrastre con vapor de agua: La técnica más comúnmente empleada utiliza moléculas de agua en estado de vapor y moléculas de aceite. El equipo requiere un generador de vapor, que tiene esencialmente un recipiente hermético con una entrada y salida para el vapor que se descarga de la planta, se hace uso de un filtro y un condensador que convierte el vapor en forma líquida y lo recoge en un embudo de

decantación. La esencia se extrae cuando el vapor a presión golpea las células de las partes de la planta, dando como resultado gotas de agua que se filtran en el destilador. El aceite obtenido a través de este método es de una calidad excepcional y solo necesita una redestilación para eliminar parte del agua que pueda quedar atrapada en el aceite.

Destilación con agua y vapor: El vapor puede ser generado mediante una fuente externa o dentro de la propia cámara extractora, pero separado del material vegetal; la diferencia entre este método y los anteriores es que el material vegetal se encuentra suspendido sobre un fondo falso impidiendo que entren en contacto el material vegetal con el medio líquido en ebullición, este sistema si bien reduce la capacidad neta de carga de materia prima dentro del extractor, pero mejora la calidad del aceite obtenido.

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1. Nivel de Investigación

Investigación básica.

3.2. Tipo y Diseño de Estudio

Tipo de estudio: Descriptivo

Diseño de estudio: Observacional

3.3. Material Biológico

Hojas de *Origanum vulgare* L. “Orégano”

Se consideraron hojas frescas exentas de microorganismos y en buen estado de conservación.

Cepa de referencia de *P. acnes* ATCC 6919

Se adquirió la cepa liofilizada del microorganismo *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 de la marca Thermo Scientific™, y sirvió de control para verificar si coincide microscópica y macroscópicamente con las bacterias que se aislaron de personas con acné facial. La cepa

también fue utilizada para las evaluaciones del efecto antibacteriano del aceite esencial de orégano.

Muestras de lesiones pustulares provenientes de personas con acné facial

Se incluyeron a 30 personas entre 15 a 25 años de edad con lesiones pustulares de fácil acceso y mínima invasión, quienes aceptaron participar voluntariamente en el estudio con asentimiento o consentimiento firmado. Se excluyeron a aquellos que estaban con tratamiento farmacológico con diagnóstico de acné severo. La selección de las personas se realizó en forma intencional y no probabilística.

3.4. Lugar de muestreo del material vegetal

El orégano fue colectado durante el mes de febrero del 2022 de un terreno de cultivo orgánico en el distrito de La Encañada – Cajamarca, ubicado a una altitud de 3098 m. s. n. m, latitud de -7.086, longitud de -78.345 y coordenadas geográficas 7° 5' 12" Sur, 78° 20' 42" Oeste.

Toma de muestras

Muestras vegetales:

Se colectó un espécimen completo de la planta *O. vulgare* L. (orégano) y fue trasladada al Laboratorio de Botánica de la Universidad Nacional de Cajamarca para su identificación taxonómica (Anexo N°1). Se recolectó 10 kg aproximadamente de hojas de esta planta que fueron envueltas con papel kraft para su traslado al laboratorio de Tecnología Farmacéutica

de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo, donde se realizó la obtención del aceite esencial.

Muestras de lesiones pustulares:

De cada paciente, se consideró como mínimo 3 muestras de lesiones pustulares, las cuales se desinfectaron superficialmente con alcohol de 70°. Se realizó una pequeña apertura de la pústula con una aguja estéril recogiendo el contenido con un hisopo estéril. Cada una de las muestras fue depositada en un tubo de ensayo con tapa rosca, el mismo que contenía 4 mL de Infusión Cerebro Corazón (BHI) estéril; inmediatamente fueron trasladadas bajo cadena de frío al laboratorio BIOMIC S.R.L, ubicado en la ciudad de Cajamarca, para su posterior procesamiento.

3.5. Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

Obtención del aceite esencial de *O. vulgare* L. (orégano) mediante destilación por arrastre con vapor de agua

Se pesó 7 kg de hojas de orégano, las cuales se enjuagaron con agua destilada y se cortaron en trozos de aproximadamente 2 cm². Luego se colocaron en el recipiente para la muestra agregando 20 litros de agua en el tanque generador de vapor, se acoplaron los tres componentes del equipo, dejando correr el agua por el refrigerante. Transcurrido el tiempo de extracción, aproximadamente 4 horas, se separó el agua del aceite con la ayuda de un embudo de decantación. Finalmente, se obtuvo 20 mL de aceite esencial de orégano, con un

rendimiento de 0,29 %, también se identificó sus propiedades organolépticas (37) como el olor herbáceo característico y una tonalidad café verdoso, además se pudo deducir que la densidad fue menor que la del agua porque el aceite esencial fue a la parte superior del embudo de decantación. El aceite esencial se guardó en un frasco de color ámbar con tapa y en refrigeración a 4 °C hasta su uso, para evitar reacciones oxidativas que pudieran alterar su composición (Apéndice N°3) (2,20).

Reactivación de la cepa *Propionibacterium acnes* ATCC® 6919™

Se realizó la reactivación de la cepa según las instrucciones del proveedor, utilizando tubos de ensayo tapa rosca con caldo estéril de BHI y glucosa al 5 %, los cuales se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis durante 72 horas. Luego se procedió al sembrado en placa conteniendo agar sangre modificado para *P. acnes* (Agar-agar 16 g/L, extracto de levadura 5,5 g/L, glucosa 1,1 g/L, cloruro de Sodio 5,5 g/L, hemina 0,005 g/L, glicerol 11 ml/L y sangre de cordero 5 %) (39) (ANEXO N°4) y se incubó en jarras de anaerobiosis a 37 °C durante 72 horas.

Aislamiento e identificación de *P. acnes* en personas con acné facial

Trasladadas las muestras de lesiones pustulares en cadena de frío al laboratorio BIOMIC S.R.L, se incubaron a 37 °C durante 72 horas en condiciones anaeróbicas. Los criterios de lectura fueron:

Positivo: Desarrollo denso con formación de sedimento granular en la parte inferior del tubo con presencia de biofilm.

Negativo: Desarrollo en la parte superior del tubo, no se observa biofilm.

Después de seleccionar los tubos positivos, se extrajo un inóculo de cada tubo, los que fueron sembrados usando la técnica de siembra por estrías, en cada una de las placas con agar sangre modificado para *P. acnes* (39). Posteriormente, cada placa fue colocada de forma invertida en anaerobiosis a 37 °C durante 4 días. Transcurrido este tiempo, se seleccionó un par de las colonias desarrolladas, las más aisladas, de características idénticas y propias de la especie a identificar (colonias blancas grisáceas pequeñas, de 1-3 mm, ligeramente mucosas, de bordes enteros, superficie levantada, generalmente rodeadas de un halo de β -hemólisis) (14).

Se realizó coloración Gram y con el objetivo de inmersión del microscopio, se observaron bacilos delgados gram positivos, en pares, con agrupación en empalizada, semejando letras chinas, en V y/o Y (14); adicionalmente, se realizó la reacción de catalasa en un portaobjeto, al cual se le agregó una gota de agua, para luego suspender en ella una colonia y dejándole caer por goteo H_2O_2 al 3 %, se observó el desprendimiento de burbujas correspondiente a la hidrólisis del peróxido, evidenciando así la actividad enzimática (reacción positiva). Luego se realizó la comparación micro y macroscópica con la cepa de referencia adquirida. Finalmente, los aislamientos puros se sembraron cada uno en viales de Agar Tripticasa Soya (TSA) con extracto de levadura al 6 % y fueron incubados a 37 °C durante 72 horas en anaerobiosis.

Sistema para la identificación de microorganismos anaerobios

Los aislamientos seleccionados con características similares a la cepa de referencia, fueron sometidos al sistema de identificación ANAEROBE SYSTEM 71620 (Anexo N°2), el cual

permitió la comparación de sus perfiles bioquímicos haciendo uso de 24 pruebas bioquímicas preestablecidas e ingresadas en el software de identificación (Anexo N°3), obteniendo un total de 10 aislamientos de *P. acnes*. Después de identificada la bacteria por sus características morfológicas y pruebas bioquímicas, se conservó en viales con agar TSA y extracto de levadura a -20 °C hasta su posterior análisis.

Determinación de la actividad antibacteriana mediante el método de Kirby Bauer

Preparación y estandarización del inóculo: A partir de cuatro colonias de igual morfología y bien aisladas en un medio de aislamiento primario se realizó una siembra por suspensión en 5 mL de caldo BHI. Se incubaron los tubos de cultivo a 37 °C en anaerobiosis durante 6 horas (tiempo necesario para lograr la turbidez estándar equivalente a 0,5 en la escala de Mc Farland). Se ajustó la densidad del cultivo que se encontraba en fase logarítmica, por comparación visual (40).

Método de Kirby Bauer

Del inóculo estandarizado y usando un hisopo estéril se sembró uniformemente cada aislamiento de *P. acnes* en la superficie de placas con agar Mueller-Hinton más sangre, luego se incubaron a 37 °C en condiciones de anaerobiosis durante 72 horas (40).

Para el control negativo se utilizó discos embebidos con 20 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 %, además se utilizaron discos de sensibilidad de minociclina (30 µg) de control positivo (4), los cuales se colocaron en las placas de cada grupo problema; estos sirvieron como control de referencia.

Aceite esencial: Para realizar las diluciones del aceite esencial al 10 % y 50 % se utilizó DMSO al 5 %. Se depositaron 20 μ L de las concentraciones del aceite esencial de orégano al 10 %, 50 % y 100 % sobre discos de papel de filtro para analizar la actividad antibacteriana (40).

Los discos embebidos con las tres concentraciones se colocaron sobre la superficie de las placas sembradas con el inóculo de *P. acnes*, con la ayuda de una aguja estéril se presionó suavemente sobre cada disco asegurando un contacto completo con la superficie del agar. Se distribuyeron los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro, para evitar las superposiciones de las zonas de inhibición, luego se procedió a incubar las placas en anaerobiosis a 37 °C durante 72 horas (40). Finalmente, se realizó la medida de los diámetros de los halos de inhibición. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Interpretación de sensibilidad: Las zonas de inhibición de los aceites se interpretan según las pautas de Duraffourd & Lapraz (41).

Sensibilidad nula: $\leq 8\text{mm}$

Sensible: $>8\text{mm} \leq 14\text{mm}$.

Muy sensible: $>14 \leq 20\text{mm}$.

Sumamente sensible: $> 20 \text{ mm}$.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) por el método de microdilución

Preparación del inóculo: Tocando la parte superior de seis colonias se preparó una suspensión en 10 mL de caldo BHI y luego se incubó a 37 °C por 24 horas en anaerobiosis hasta lograr la turbidez estándar equivalente a 2 en la escala de Mc Farland (24 horas).

Estandarización del inóculo: Se ajustó la densidad del cultivo que se encontraba en fase logarítmica, usando un espectrofotómetro UV visible a 600 nm, el inóculo usado tuvo una absorbancia de 0,5 con una densidad bacteriana aproximadamente de 7×10^8 UFC/mL

Método de microdilución en caldo

Preparación del control de esterilidad. En crioviales se colocaron 100 uL de caldo BHI y se incubaron a 35 °C durante 24 horas para comprobar la esterilidad del medio.

Control: Como control positivo se utilizó 150 µL de DMSO al 5 % y como control negativo cápsulas de minociclina 100 mg, para usar la minociclina se realizó diluciones siguiendo las indicaciones del CLSI (el ensayo se realizó con la concentración 100 veces menor a la inicial) (42), en este caso se trabajó con 1 mg/mL. Ambos controles se colocaron en crioviales de cada grupo problema; estos sirvieron como control de referencia. Para observar la turbidez se utilizó luz reflejada.

El ensayo se realizó en doce crioviales para cada aislamiento de *P. acnes* y por triplicado, en los crioviales con BHI que pasaron la prueba de esterilidad se adicionaron 50 uL del inóculo

más 150 uL de aceite esencial, a partir del primer criovial con la ayuda de una micropipeta se inició a pasar 150 uL de toda la mezcla homogénea hasta llegar a la décima dilución. Terminado el proceso de microdilución se incubaron los crioviales a 37 °C durante 72 horas en condiciones de anaerobiosis, pasado el tiempo se revisó la turbidez que se había formado en cada criovial. Una vez conocido el valor de la CMI de cada cepa, se tomó 10 uL del cultivo y se agregó en placas con agar MH más sangre para luego incubar nuevamente a 37 °C durante 48 horas en anaerobiosis. La CMI se determinó con la concentración de aceite esencial capaz de inhibir el crecimiento visible de *P. acnes* en los crioviales y la CMB se determinó con la inhibición total de crecimiento bacteriano (15,43,44).

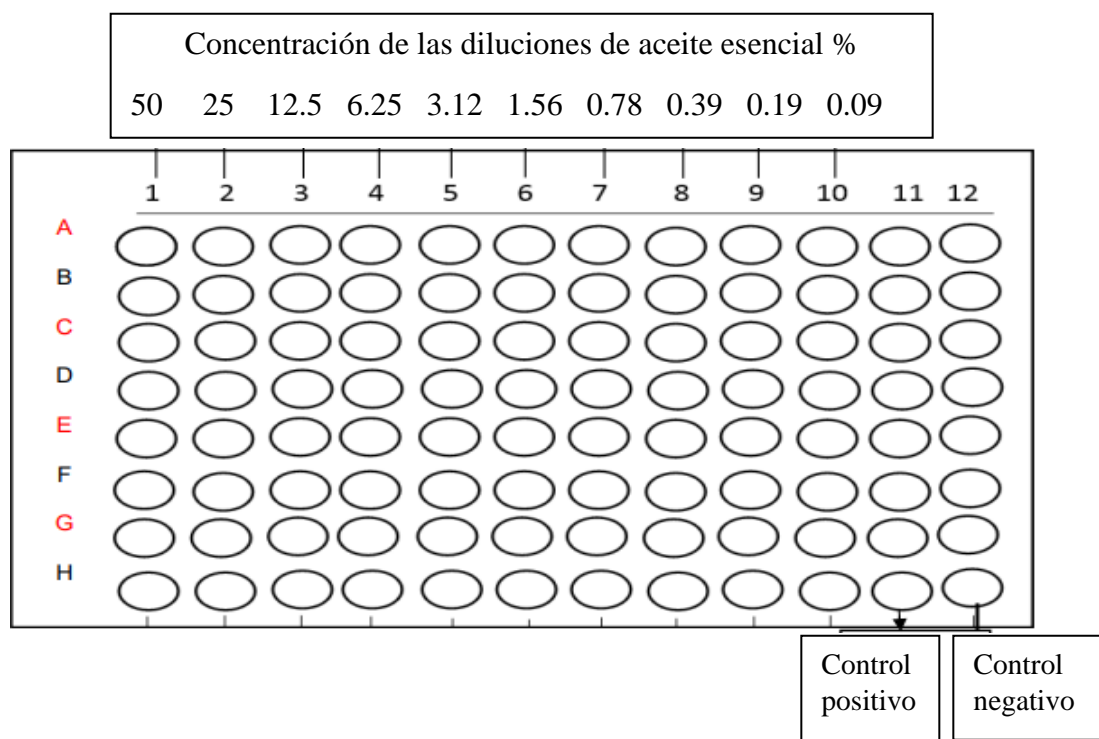


Figura 1. Esquema de distribución de las soluciones en los crioviales para la determinación de la CMI.

3.6. Técnicas de Procesamiento y Análisis de Datos

Los datos fueron ingresados y procesados en la base del software estadístico IBM SPSS Statistics versión 27. Para el diámetro de los halos de inhibición se realizó el cálculo de medidas de tendencia central (media, mediana) y de dispersión (desviación estándar); además, se corroboró su normalidad usando el Test de Kolmogorov - Smirnov. Para realizar las comparaciones de los efectos bactericidas entre los tratamientos problemas y controles se aplicó la prueba Kruskal Wallis. El nivel de significación estadística fue $p < 0,05$ (Apéndice N°11).

3.7. Aspectos éticos de la investigación

En vista de que los aislamientos de *P. acnes* procedieron de muestras de personas con acné facial, se tuvo en cuenta las siguientes consideraciones éticas: Se les explicó inicialmente el objetivo del estudio, la metodología y la confidencialidad de los datos; luego se les tomó por escrito el consentimiento informado a cada voluntario (Apéndice N°9).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Evaluación del efecto antibacteriano

El aceite esencial de orégano a diferentes concentraciones (100 %, 50 % y 10 %) fue probado sobre 10 aislamientos procedentes de personas con acné facial y sobre la cepa de referencia de *P. acnes* ATCC 6919, además se utilizó como control positivo la minociclina 30 µg y como control negativo DMSO al 5 %, obteniéndose halos de inhibición de diferentes diámetros (Tabla 3) (Figura 2) (Apéndice N°10).

Tabla 3. Promedio del diámetro de los halos de inhibición de diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano y de la minociclina sobre la cepa de referencia y aislamientos de *P. acnes*.

Aislamientos	Promedio del diámetro del halo de inhibición (mm)				
	Concentraciones aceite orégano			Control Positivo	Control Negativo DMSO (5 %)
	100 %	50 %	10 %	(MN 30 µg)	
ATCC 6919	33,7	22,0	11,3	31,3	6
PA1	33,3	24,7	11,7	33,0	6
PA2	35,7	17,3	9,7	31,3	6
PA3	34,7	24,3	11,0	28,0	6
PA4	37,7	22,0	8,7	29,0	6
PA5	34,7	20,0	8,3	29,3	6
PA6	35,7	15,7	8,0	29,3	6
PA7	43,3	23,7	8,3	32,7	6
PA8	39,3	15,3	9,3	28,3	6
PA9	38,3	23,3	9,7	34,0	6
PA10	36,7	15,3	8,0	31,3	6

MN: Minociclina. DMSO: dimetilsulfóxido.

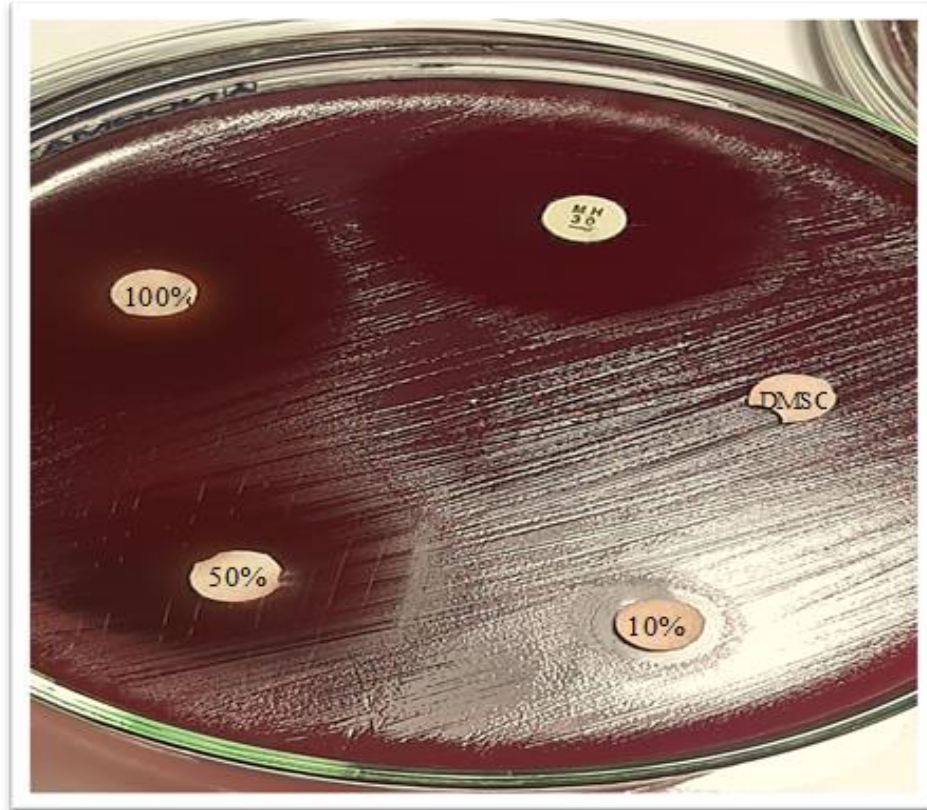


Figura 2. Efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano a 100 %; 50 % y 10 % sobre el aislamiento de *P. acnes* PA2.

El aceite esencial de orégano mostró diámetros promedio de halo de inhibición de 36,6 mm, 20,3 mm y 9,45 mm a concentraciones de 100 %, 50 % y 10 % respectivamente; el antibiótico minociclina 30 μ g presentó halos de inhibición de 30,7 mm. Los diámetros obtenidos con el aceite al 100 % fueron significativamente mayores incluso al de la minociclina ($p < 0, 05$) (Tabla 4).

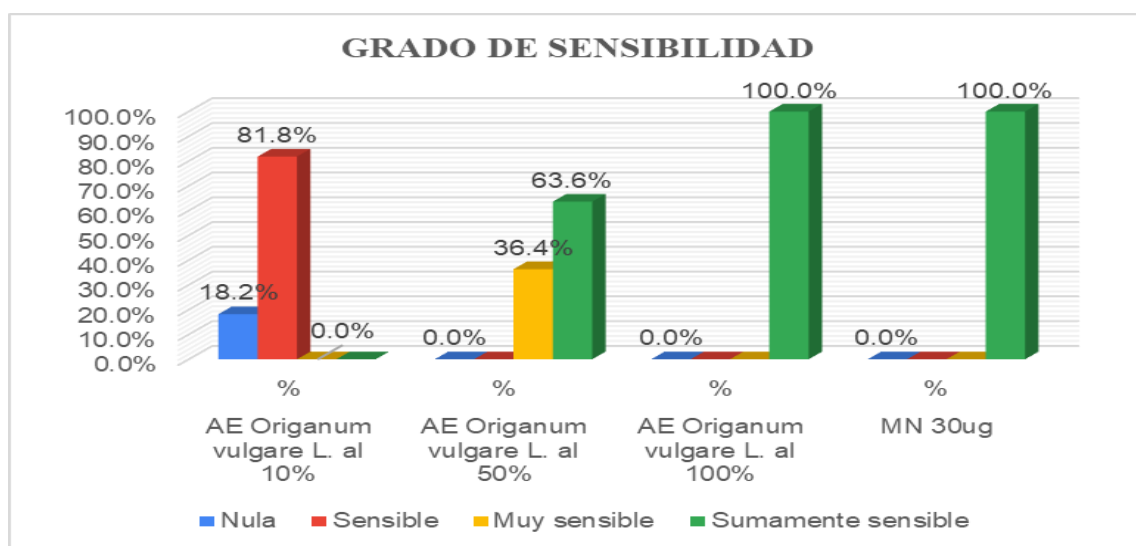
Tabla 4. Principales medidas descriptivas del diámetro de los halos de inhibición (en mm) del aceite esencial de orégano sobre *P. acnes*.

GRUPO	MEDIA	MEDIANA	DESVIACIÓN ESTANDAR	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
AE 100 %	36,64 ^a	36,0	2,87	33,0	44,0
AE 50 %	20,33 ^b	22,0	3,72	15,0	26,0
AE 10 %	9,45 ^c	9,0	1,39	8,0	12,0
MN 30μg	30,7 ^d	30,0	2,13	27,0	34,0

AE: Aceite esencial. MN: Minociclina.

Valores con letras diferentes denotan diferencias significativas entre los grupos, prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

En relación con la sensibilidad que presentaron los aislamientos de acuerdo a lo establecido en la escala de Duraffourd (41), todos los aislamientos fueron muy sensibles o sumamente sensibles a las concentraciones del aceite de orégano al 50 % y al 100 %, solo en la concentración al 10 % algunos de los aislamientos no presentaron sensibilidad. Al comparar los grupos empleados se observó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Gráfico 1).



AE: Aceite esencial. MN: Minociclina. Prueba de J_i^2 de Pearson ($p < 0,05$).

Gráfico 1. Porcentaje de los aislamientos *P. acnes* según grado de sensibilidad a diferentes concentraciones del aceite esencial de orégano según la escala de Duraffourd.

4.1.2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB)

En la Tabla 5 se aprecia los valores de la CMI del aceite esencial de orégano obtenidos mediante el método de microdilución. La interacción de las concentraciones del aceite de orégano y el crecimiento de los aislamientos de *P. acnes* mostraron un comportamiento definido a la razón de un incremento de la concentración y la turbidez reflejada. En los niveles de dilución hasta el 1,563 % las cepas presentaron turbidez por igual, refiriendo que existe crecimiento bacteriano positivo, mientras que no hubo turbidez en las concentraciones mayores a 3,125%. La CMB para la cepa de referencia y algunos aislamientos de *P. acnes* fue de 6,25 %, mientras que para otros aislamientos fue de 3,12 % (Tabla 6).

Tabla 5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de orégano sobre los aislamientos de *P. acnes*.

Aislamiento	CMI											
	MN	DMSO	Dilución del aceite esencial de orégano (v/v %)									
	100 mg	5 %	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195	0,098
ATCC 6919	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
PA1	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
PA2	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
PA3	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
PA4	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
PA5	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
PA6	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
PA7	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
PA8	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
PA9	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
PA10	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

+ desarrollo bacteriano. – Ausencia de desarrollo bacteriano.

PA: *Propionibacterium acnes*. MN: Minociclina. DMSO: dimetilsulfóxido.

Tabla 6. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de orégano sobre los aislamientos de *P. acnes*.

Aislamiento	CMB (UFC)											
	MN 100 mg	DMSO 5 %	Concentración (%)									
			50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195	0,098
ATCC 6919	0	298	0	0	0	0	2	8	16	44	163	299
PA1	0	299	0	0	0	0	1	6	18	40	164	298
PA2	0	300	0	0	0	0	1	6	18	45	158	300
PA3	0	300	0	0	0	0	1	7	19	37	164	300
PA4	0	299	0	0	0	0	1	9	16	43	160	295
PA5	0	300	0	0	0	0	0	5	16	33	165	299
PA6	0	298	0	0	0	0	2	5	17	35	165	299
PA7	0	299	0	0	0	0	2	9	15	45	158	298
PA8	0	298	0	0	0	0	0	7	15	37	164	300
PA9	0	298	0	0	0	0	0	5	15	32	163	295
PA10	0	300	0	0	0	0	0	9	15	36	160	298

UFC: Unidades formadoras de colonias. PA: *Propionibacterium acnes*. MN: Minociclina. DMSO: dimetilsulfóxido.

4.2. Discusión

Los aceites esenciales representan una nueva alternativa en el tratamiento de enfermedades dermatológicas como el acné (13,15,19,45), además son mezclas de sustancias extraídas de plantas, tienen propiedades insecticidas, antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas y antivirales (5,25,45,46), se extraen por diferentes métodos, la técnica más utilizada es la destilación por arrastre de vapor con agua, donde la muestra vegetal se coloca en un recipiente (tipo Clavinger cerrado) y se somete a una corriente de vapor de agua, de manera que la esencia es arrastrada, concentrada, recolectada y separada de la fracción acuosa (20).

El aceite esencial extraído tuvo un rendimiento de 0,29% similar al reportado por Abalco T. (37) en cuya investigación se evaluaron diferentes rendimientos de extracción de *Origanum vulgare* L. El aceite extraído poseía las características esperadas ya que el análisis organoléptico, permitió concluir que el aceite esencial estudiado tiene características similares en lo que respecta al color, olor, textura y aspecto según lo indica Abalco T. y Acevedo D. *et al.* (37,46), con respecto a su densidad se puede describir que era menor a la del agua (37), esto pudo observarse durante la extracción al ubicarse en la parte superior del embudo de decantación (Apéndice N°3).

En el aislamiento de las cepas bacterianas es importante destacar ciertas diferencias bioquímica, las cuales se observaron al utilizar el sistema de identificación ANAEROBE SYSTEM 71620, estas características permitieron diferenciar a *P. acnes* de las otras especies que colonizan la piel, ya que estas últimas también pueden ser encontradas fácilmente en pacientes con acné facial tal y como lo resalta Ibañez C. (14) y Solís M. (27). Por otro lado, las características morfológicas a nivel macroscópico y microscópico ayudaron significativamente en la identificación permitiendo diferenciar las características culturales propias de *P. acnes* (13).

El efecto antibacteriano se pudo evidenciar con el método de Kirby Bauer en el cual se observaron halos de inhibición de hasta 43,3 mm a la concentración de 100 %, lo cual indica una sensibilidad positiva de *P. acnes*, también se observó sensibilidad en la concentración del 50 % con halos de inhibición de hasta 24,7 mm, pero en la concentración al 10 %

solamente algunos aislamientos presentaron sensibilidad (Tabla 3), según estos resultados se señala que a medida que se fue reduciendo la concentración del aceite esencial, los diámetros de los halos de inhibición disminuyeron gradualmente. Por otro lado, un estudio evaluó la actividad de bajas concentraciones del aceite esencial de orégano procedente de la región mediterránea sobre *P. acnes* y encontraron diámetros de inhibición que oscilaban entre 20 y 30 mm para las concentraciones de aceite al 0,7 y 1,4 % respectivamente, dichas medidas resultaron ser mucho mayores que los diámetros obtenidos por los antibióticos de referencia eritromicina y clindamicina (< 15 mm) (15). También es importante resaltar las diferencias en el efecto inhibitorio de la minociclina sobre los aislamientos y la cepa referencia *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 (Tabla 3), los diámetros de los halos de inhibición fueron distintos, pero se puede apreciar que está dentro del rango de sensibilidad frente a este antibiótico lo que indica que aún no existe resistencia por estas cepas (4).

La prueba estadística de Kruskal Wallis determinó que el diámetro de los halos de inhibición del aceite esencial de orégano al 100 % es significativamente mayor ($p < 0,05$) a los diámetros de las otras concentraciones e incluso al del antibiótico minociclina (Tabla 4), lo cual indicaría que la acción inhibitoria del aceite esencial de orégano al 100 % sobre *P. acnes* sería mayor que la de la minociclina. El notable efecto inhibitorio observado a esta concentración pudo deberse a la naturaleza química del aceite esencial, así como lo reportan Sharifi M.T (16) y Téllez L. (18) y Hao Y. (26),

Un factor importante en la actividad antimicrobiana del aceite esencial de orégano son sus fitoconstituyentes como el carvacrol y el timol los cuales se encuentran en mayor concentración (17), son monoterpenos que constituyen casi el 78 – 85 % del aceite y son responsables de las propiedades antimicrobianas de la planta, ambos compuestos podrían actuar juntos produciendo un potente efecto bactericida, así como lo reporta Lambert *et al.* citado por Lombrea A. (36) refiriendo que la actividad antibacteriana se debe al alto nivel de timol que se une a las proteínas de la membrana y aumenta la permeabilidad de la misma. Al igual que, el carvacrol actúa sobre las células bacterianas provocando daños a nivel estructural y funcional, lo que aumenta la permeabilidad de la membrana celular bacteriana. Lambert *et al.* citado por Hao Y. *et al.* (26) reportaron que las mezclas de carvacrol y timol dieron un efecto aditivo, y la inhibición global por parte del aceite esencial de orégano podría atribuirse principalmente a la acción antimicrobiana de estos dos compuestos contra *P. acnes*.

La escala de Duraffourd permitió evaluar el grado de sensibilidad de *P. acnes* frente a las diferentes concentraciones de aceite de orégano y el antibiótico minociclina (Gráfico 1), de allí que todos los aislamientos y la cepa de referencia fueron sensibles a las más altas concentraciones de este aceite, pero eso no sucedió con la concentración al 10 %, confirmando también que a medida que se fue reduciendo la concentración del aceite esencial, la sensibilidad bacteriana disminuye.

Además, en el presente estudio se determinaron la CMI y CMB, en el cual se apreció turbidez por igual en la concentración de 1,563 %, mientras que no se observó turbidez en las concentraciones mayores a 3,125 % (CMI) (Tabla 5). Por otro lado, la CMB para la cepa de referencia y algunos aislamientos de *P. acnes* fue de 6,25 %, mientras que para otros aislamientos fue de 3,12 % (Tabla 6), comprobando que el aceite esencial a bajas concentraciones también presenta efecto antimicrobiano, como en los resultados obtenidos por Taleb. *et al.* (15) en el cual determinaron que el aceite esencial de orégano tenía mayor actividad antimicrobiana a diferencia de los demás aceites esenciales en estudio, obteniendo la CMI y CMB de 0,34 y 0,67 mg/mL, respectivamente, esto debido a la presencia de Timol principal compuesto activo que le da esa propiedad antimicrobiana al orégano. Es relevante mencionar, sobre la diferencia de los valores que se obtuvo en la CMB, esto debido a los diversos aislamientos que se hizo de personas voluntarias con acné, tomando en cuenta el reporte de Ibañez (2018), *P. acnes* tiene seis filotipos (IA1, IA2, IB, IC, II, III) cada uno de ellos tienen sus propias características, estos varían en la producción de factores de virulencia, el potencial inflamatorio, las propiedades bioquímicas, agregativas, y características morfológicas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El aceite esencial de orégano inhibe el crecimiento de *Propionibacterium acnes* aisladas de personas con acné facial, siendo las concentraciones al 50 % y 100 % las que presentaron un notable efecto inhibitorio, debido a los compuestos activos como el timol y carvacrol que tienen propiedades antimicrobianas.

- La CMI del aceite esencial de orégano sobre *P. acnes* fue de 3,12 %

- La CMB del aceite esencial de orégano sobre *P. acnes* fue de 6,25 %

5.2. Recomendaciones

Seguir esta línea de investigación, porque es importante obtener más resultados sobre los aceites esenciales como una alternativa natural para el tratamiento de diversas enfermedades cutáneas y sin perjudicar los órganos internos del cuerpo humano, además podrían ser usados como antibacterianos frente a patógenos resistentes a los antibióticos.

Realizar la identificación fitoquímica del aceite esencial de orégano para conocer con precisión los componentes con potencial antibacteriano e incluirlos en diversos tratamientos dermatológicos a través de la nanotecnología.

Ampliar el estudio de la concentración mínima inhibitoria y bactericida del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) centrándose en la acción sinérgica de este, con diferentes medicamentos usados en el tratamiento tópico del acné facial.

Lista de referencias

1. Wistuba J. Determinación del efecto inhibitor *in vitro* del jugo de cranberry (*Vaccinium macrocarpon* ait) sobre microorganismos de interés clínico y su uso tópico como tratamiento alternativo contra el acné. Universidad Austral de Chile; 2013.
2. Tellez L., Nolazco D. Estudio de la composición química del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* spp.) de Tacna. Ingeniería Industrial. 2017;35:195–205.
3. Purizaca K., Condori L. Actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de las hojas, flores, tallo y raíz de *Schkuhria pinnata* (Lanm.) Kuntze ex Thell “canchalagua” frente a *Propionibacterium acnes*. [Lima]: Universidad WIENER; 2018.
4. Jacome J., Camacho M., Mendoza C., Delgado P. La minociclina en el acné vulgar. RECIMUNDO. 2020 [citado el 1 de febrero de 2023];4(1):39–45. Disponible en: <https://recimundo.com/index.php/es/article/view/732>
5. Rueda E., Juvera J., Romo I., Holguín R. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales de orégano y tomillo contra *Ralstonia solanacearum*. Rev Mex De Cienc Agric [Internet]. 2018;(20):4251–61. Disponible en: <http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/99>

6. Rivas A. Evaluación de la actividad bactericida de un antimicrobiano de origen natural. 2021 [citado el 1 de febrero de 2023]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10251/167484>
7. George R, Sridharan R. Factors Aggravating or Precipitating Acne in Indian Adults: A Hospital-Based Study of 110 Cases. *Indian J Dermatol*. 2018 [citado el 1 de febrero de 2023];63(4):328. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6052742/>
8. Fernández R. Guía de terapéutica antimicrobiana del área Aljarafe. Vol. 3. 2018 [citado el 1 de febrero de 2023]. 262–267 p. Disponible en: https://portal.guiasalud.es/wp-content/uploads/2018/12/GPC_578_Antimicrobianos_Aljarafe_2018.pdf
9. Huynh Q., Nguyen P., Le H., Ngo L., Trinh N., Tran M., *et al.* Automatic Acne Object Detection and Acne Severity Grading Using Smartphone Images and Artificial Intelligence. *Diagnostics*. 2022 [citado el 1 de febrero de 2023];12(8):1879. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2075-4418/12/8/1879>
10. Sutaria A., Masood S., Schlessinger J. Acne Vulgaris. *StatPearls*. 2022 [citado el 1 de febrero de 2023]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459173/>
11. Ibarra D., Escandón S., Fierro L., Bonifaz A. Reclassificación de *Propionibacterium acnes* a *Cutibacterium acnes*. *Revista Mexicana*. 2019 [citado el 1 de febrero de 2023];63(1):98–100. Disponible en:

<https://dermatologiarevistamexicana.org.mx/article/reclasificacion-de-propionibacterium-acnes-a-cutibacterium-acnes/>

12. Dréno B., Pécastaings S., Corvec S., Veraldi S., Khammari A., Roques C. *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) and acne vulgaris: a brief look at the latest updates. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2018 [citado el 1 de febrero de 2023];32:5–14. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jdv.15043>
13. Ossa J., Llanos C., García A. Evaluation of tea tree oil physicochemical features and its antimicrobial activity against *Cutibacterium acnes* (*Propionibacterium acnes*) ATCC 6919. *Biomedica*. 2020 [citado el 1 de febrero de 2023];40(4):693–4. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/5122/4779>
14. Ibañez C. Caracterización de *Cutibacterium acnes* aislado a partir de acné vulgar. [Bogotá]: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2018.
15. Taleb M., Abdeltawab N., Shamma R., Abdelgayed S., Mohamed S., Farag M., et al. *Origanum vulgare* L. Essential Oil as a Potential Anti-Acne Topical Nanoemulsion—In Vitro and In Vivo Study. *Molecules*. 2018 [citado el 1 de febrero de 2023];23(9):2164. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/23/9/2164>
16. Sharifi M., Varoni E., Iriti M., Martorell M., Setzer W., Contreras M., et al. Carvacrol y la Salud Humana. En: *Phytotherapy Research*. 2018. p. 1675–87. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/ptr.6103>

17. Sinha P., Srivastava S., Mishra N., Yadav N. New Perspectives on Antiacne Plant Drugs: Contribution to Modern Therapeutics. *Biomed Res Int.* 2014;19.
18. Téllez L., Arévalo F., Juárez H., Altamirano P., Ccapa K., Cusco M. Determinación de Timol y Carvacrol en hojas de orégano por HPLC FL. *Rev Soc Quím Perú.* 2014;80(4):279–86.
19. Torrenegra M., Matiz G., Gil J., León G. Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné. *Revista Cubana de Farmacia.* 2015;49(3):512–23.
20. Casado I. Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor. [Madrid]: Universidad Politécnica de Madrid; 2018.
21. Palacios A., Cabezas C. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. 3a ed. Lecca L, editor. Vol. 68. Lima; 2015.
22. Carhuallanqui A., Salazar M., Ramos D. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Altoandinas.* 2020 ;22(1):23–33. Disponible en: <https://huajsapata.unap.edu.pe/index.php/ria/article/view/43>
23. Salinas R. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) frente a *Staphylococcus aureus*. Universidad Norbert Wiener; 2018.
24. Mamani M. Comparación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) y la amoxicilina de 500 mg frente al *Streptococcus*

- pyogenes* ATCC 19615. [Tacna]: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2019.
25. Lu M., Dai T., Murray C., Wu M. Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates. *Front Microbiol.* 2019;9(OCT):2329.
 26. Hao Y., Li J., Shi L. A Carvacrol-Rich Essential Oil Extracted From Oregano (*Origanum vulgare* “Hot & Spicy”) Exerts Potent Antibacterial Effects Against *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol.* 2021;12.
 27. Solís M., Velasco N. Estudio sobre la susceptibilidad antimicrobiana de *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* en pacientes con acné vulgaris, atendidos en el servicio de dermatología en el hospital general Enrique Garcés, en el período comprendido entre junio y agosto 2015. [Quito]: Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2015. Disponible en: [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/10088/ESTUDIO SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DEL Propionibacterium acnes Y Staphylococcus epid.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/10088/ESTUDIO_SOBRE_LA_SUSCEPTIBILIDAD_ANTIMICROBIANA_DEL_Propionibacterium_acnes_Y_Staphylococcus_epid.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
 28. Asencio S. Prevalencia de acné en estudiantes de medicina en el 2016. Universidad Rafael Landívar; 2017.
 29. Beylot C., Auffret N., Poli F., Claudel J., Leccia M., del Giudice P., *et al.* *Propionibacterium acnes*: An update on its role in the pathogenesis of acne. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2014;28(3):271–8.
 30. Avilés E. Caracterización bioquímica y susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de *Propionibacterium acnes* aisladas de personas con acné. Universidad de Chile;

2010. Disponible en:

<http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131172/Caracterización-bioquímica-y-susceptibilidad-a-antimicrobianos-de-cepas-de-Propionibacterium-acnes-aisladas-de-personas-con-acné.pdf?sequence=1>

31. Quintero Y., Asuaje L., Franco F., Roye R. *Propionibacterium acnes*: pasado, presente y futuro. *Dermatol Venez.* 2015;53.
32. Neves J., Francesconi F., Costa A., Ribeiro B., Costa L. *Propionibacterium acnes* e a resistência bacteriana. *Surg Cosmet Dermatol.* 2015;7(3):27–38.
33. Galvañ J., Fernández R., Laza J., James W. Resistencia antibiótica del *Propionibacterium acnes* en pacientes tratados por acné vulgar en Málaga. *Actas Dermosifiliogr.* 2002 [citado el 1 de febrero de 2023];93(4):271–5. Disponible en: <http://www.actasdermo.org/es-resistencia-antibiotica-del-propionibacterium-acnes-articulo-13031286>
34. ITIS. *Origanum vulgare*. 2022 [citado el 1 de febrero de 2023]. Disponible en: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32632#null
35. María L., Centeno M. Plantas medicinales: *Origanum vulgare* L. *Acta Botánica Malacitana.* 2015;27:273–80.
36. Lombrea A., Antal D., Ardelean F., Avram S., Pavel Z., Vlaia L., *et al.* A recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *Origanum vulgare* L. Essential oil. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):1–28.

37. Abalco T. Caracterización fitoquímica del aceite esencial de orégano (*O. vulgare* L.) por cromatografía de gases procedente de dos provincias del Ecuador. [Ecuador]: Universidad Central del Ecuador; 2020.
38. Albarracín G., Gallo S. Comparación de dos métodos de extracción de Aceite Esencial Utilizando *Piper Aduncum* (Cordoncillo) Procedente De La Zona Cafetera. Universidad Nacional de Colombia; 2017. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/989/1/gloriacristinaalbarracinmontoya.2003.pdf>
39. Sanchez P., Sepulveda L. Determinación de la eficacia de tres medios de cultivo para el aislamiento de *Cutibacterium acnes* a partir de muestras biológicas. [Bogotá]: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca; 2018.
40. Ramirez S., Castaño D. Metodologías Para Evaluar in Vitro La Actividad Antibacteriana De Compuestos De Origen Vegetal. *Scientia Et Technica*. 2009;15(42):263–8.
41. Lorenzo Á., Tarrillo S. Determinación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” en cepas de *Helicobacter pylori*. Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo; 2018.
42. Porras K. Determinación de la composición química y evaluación de la actividad antibacteriana sinérgica in vitro de la asociación de dos aceites esenciales del género *Citrus* de la zona de Chanchamayo. [Lima]: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019.

43. Escobar M., Torres A. Evaluación de la eficacia antibacteriana in vitro de un colutorio de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) sobre *Streptococcus mutans*. [El Salvador]: Universidad de El Salvador; 2016.
44. Malbrán C. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. MIC testing. 2012;32(2).
45. Melo G., Méndez G., Fortich M. Actividad antibacteriana in vitro de diecinueve aceites esenciales frente a bacterias asociadas al acné. Revista Cubana de Farmacia. 2015;49(1):103–16.
46. Acevedo D., Navarro M., Monroy L. Composición química del aceite esencial de hojas de orégano (*Origanum vulgare*). Información Tecnológica. 2013;24(4):43–8.

APÉNDICES

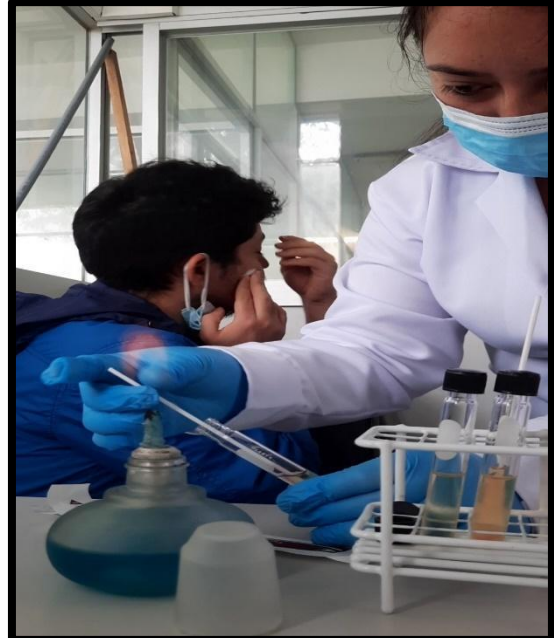
APÉNDICE N°1. Toma de muestra de lesiones pustulares.



Acné facial en su etapa pustular.



Materiales para la toma de muestra.



Toma de muestra con hisopos estériles e
inoculando en tubos con caldo BHI.

APÉNDICE N°2. Especie vegetal.



Origanum vulgare L. (Orégano)

APÉNDICE N°3. Obtención del aceite esencial de orégano mediante destilación por arrastre con vapor de agua.



Equipo de destilación por arrastre con vapor de agua.



Obtención del aceite esencial en la parte superior del embudo de decantación.

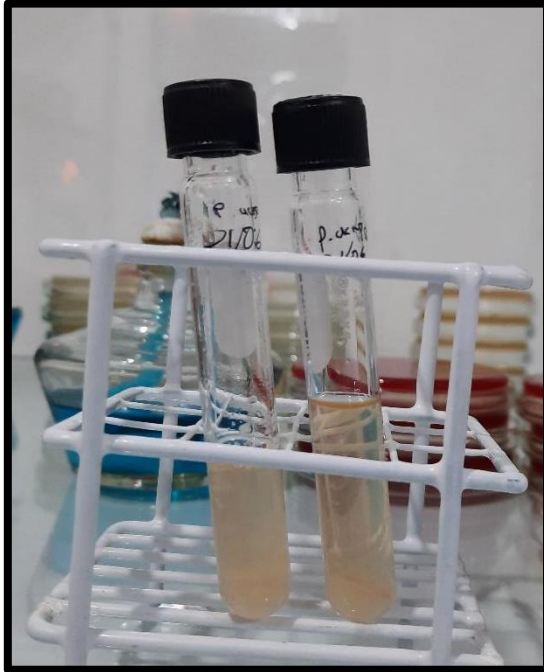


Aceite esencial de
Origanum vulgare L.

APÉNDICE N°4. Reactivación de la cepa *Propionibacterium acnes* ATCC® 6919™

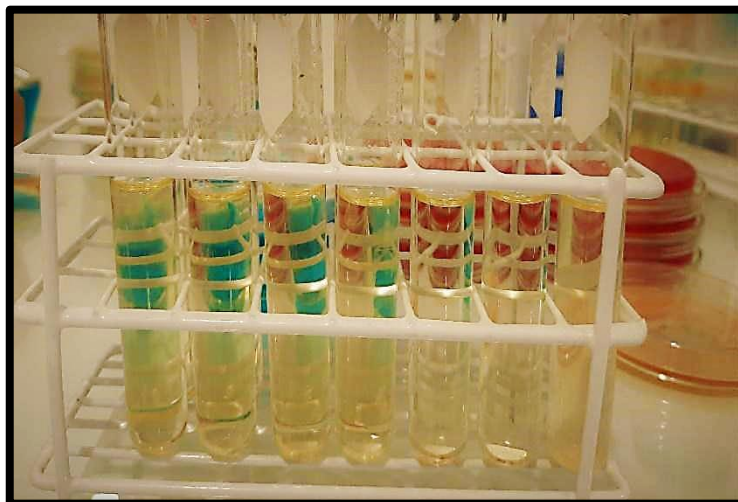


Cepa de referencia *Propionibacterium acnes*
ATCC® 6919™



Crecimiento bacteriano de la cepa de referencia *Propionibacterium acnes* ATCC® 6919™ después de 72 horas de incubación en anaerobiosis.

APÉNDICE N°5. Aislamiento de *Propionibacterium acnes*.



Crecimiento bacteriano en BHI después de 72 horas de incubación en anaerobiosis.

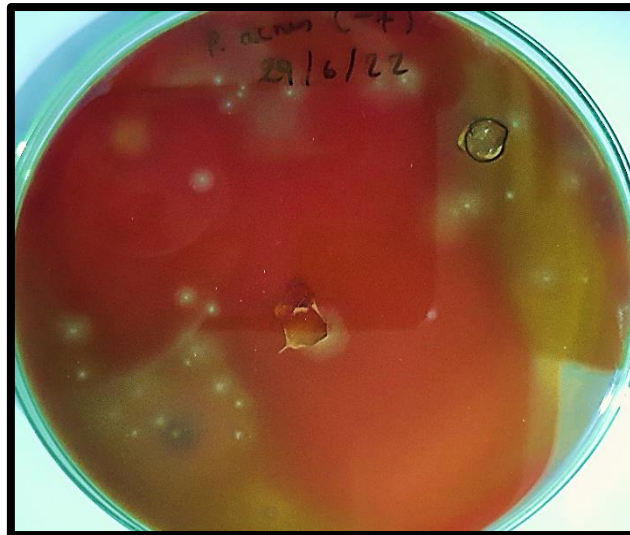


Incubación de las cepas en anaerobiosis a 37°C por 72 hr.

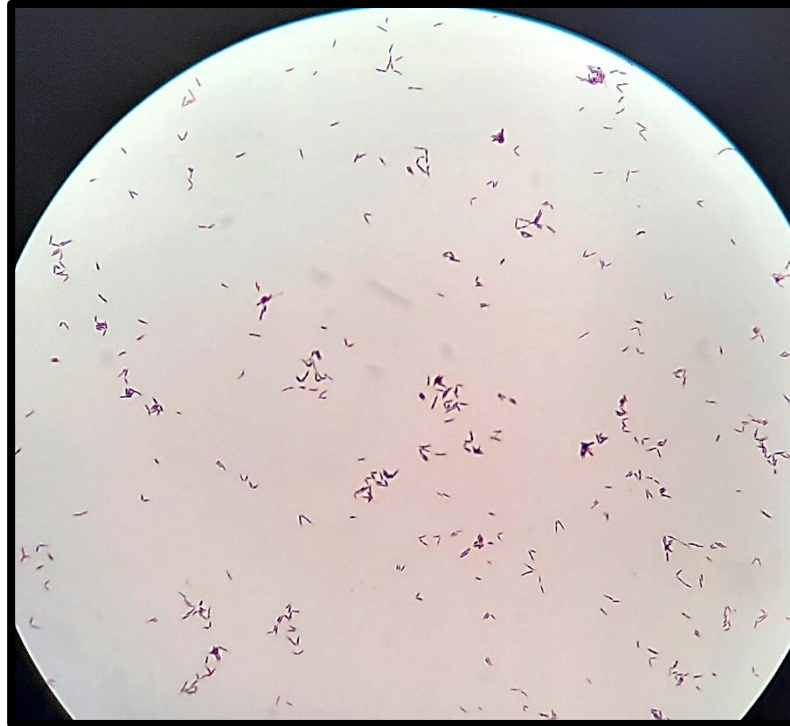


Crecimiento de cepas bacterianas en agar modificado para *P. acnes*.

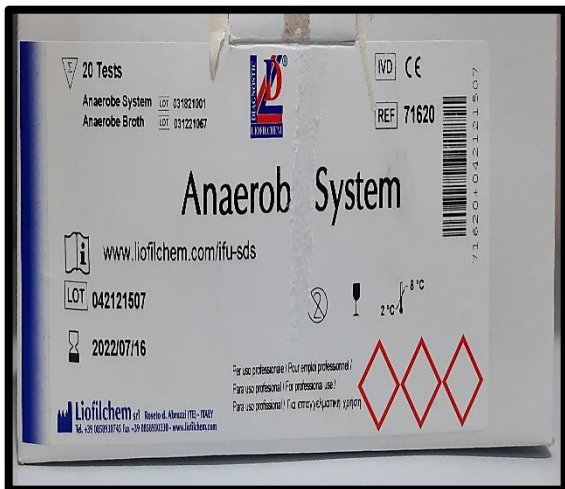
APÉNDICE N°6. Identificación de aislamiento y cepa de referencia *Propionibacterium acnes* ATCC® 6919™



Identificación macroscópica de *P. acnes*, colonias blancas grisáceas, de 1-3 mm, ligeramente mucosas, de bordes enteros, superficie levantada, generalmente rodeadas de un halo de β -hemólisis.



Identificación microscópica de *P. acnes*, bacilos delgados gram positivos, en pares, con agrupación en empalizada, semejando letras chinas, en V y/o Y.



Sistema de identificación de anaerobios.



Kit de identificación bioquímica para una cepa.



Reacción positiva = color amarillo.
 Ensayo para evaluar el perfil bioquímico de las cepas.

APÉNDICE N°7. Evaluación del efecto antibacteriano: método de difusión en agar con disco.

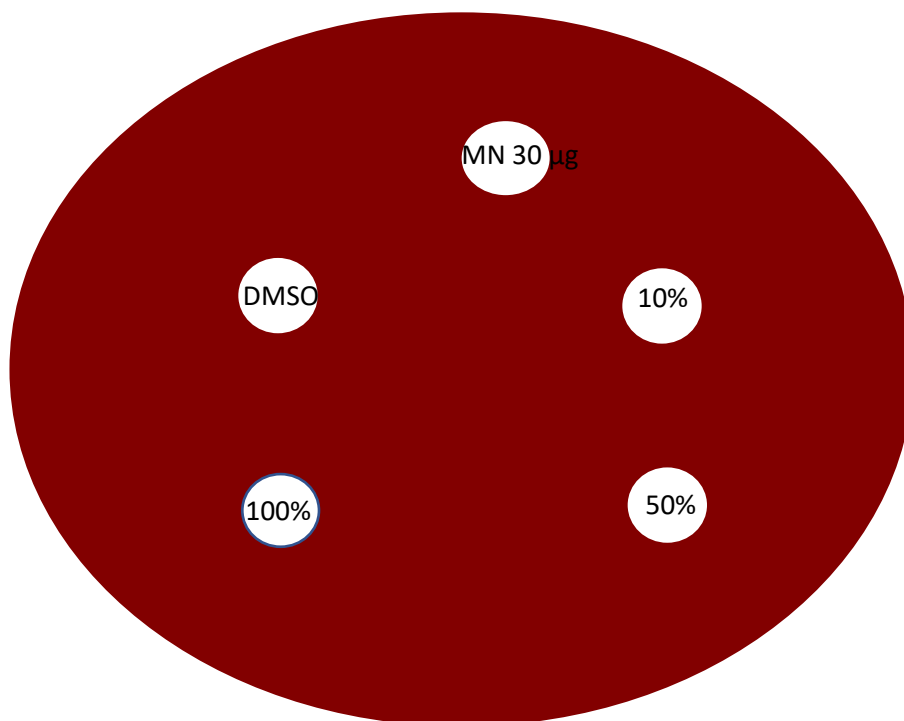


Estandarización del inóculo hasta la turbidez N°0,5 en la escala de Mac Farland.



Cultivo bacteriano más los discos embebidos a diferentes concentraciones del aceite esencial y el disco de minociclina, después de 72 hrs de incubación en anaerobiosis a 37°C.

APÉNDICE N°8. Distribución de los discos para la evaluación de efecto antibacteriano del aceite esencial.



APÉNDICE N°9. Consentimiento para participar en el estudio de investigación.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

Av. Atahualpa 1050 - CAJAMARCA



- ADULTOS -

Institución : Universidad Nacional de Cajamarca - UNC

Investigadoras: Dra. Mblga. Rodríguez Ulloa Claudia Carolina.

Bach. Jhanely Lizbeth Vásquez Salazar.

Título : Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) sobre *Propionibacterium acnes* aisladas de pacientes con acné facial.

Propósito del Estudio:

¿De qué se trata el estudio?

Te estamos invitando a participar en un estudio llamado: Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) sobre *Propionibacterium acnes* aisladas de pacientes con acné facial. Este es un estudio desarrollado por la Bach. Jhanely Lizbeth Vásquez Salazar de la carrera profesional de Biología y Biotecnología de la Universidad Nacional de Cajamarca, para determinar si el aceite esencial de orégano presenta efecto antibacteriano sobre *Propionibacterium acnes* (bacteria causante del acné).

Propionibacterium acnes (bacteria causante del acné) es una bacteria propia de la piel y que, al tener el ambiente adecuado, está comenzando a crecer rápidamente produciendo el acné inflamatorio (pústulas, nódulos, quistes). Si a esta bacteria se detiene su crecimiento a tiempo, se puede prevenir la formación de barros, espinillas y las secuelas que deja el acné. Para el tratamiento de esta bacteria se emplea diversos medicamentos uno de estos es la minociclina; sin embargo, es posible que *P. acnes* sea resistente a este antibiótico, por lo que emplearemos el aceite esencial como una nueva alternativa para combatir el acné o como un tratamiento tópico complementario a los ya existentes.

¿Cómo vas a participar?

Si aceptas participar en este estudio, te pediremos que firmes este formato de consentimiento informado por duplicado, y te entregaremos una copia. Luego se realizará lo siguiente:

- Se te pedirá parte de tu tiempo para extraer cuidadosamente de 1 a 3 pústulas de tu cara.

- La extracción de la pústula no será dolorosa.

¿Existen riesgos para ti al participar en el estudio?

No se prevén riesgos por participar en esta fase del estudio.

La extracción de la pústula de tu cara no será dolorosa y se tratará en lo más mínimo de no inflamar al grano.

¿Cómo te beneficias si decides participar?

Te beneficiarás al conocer que existe un tratamiento más factible, fácil, económico y sin efectos secundarios para combatir el acné. Los resultados obtenidos en este estudio, serán de su conocimiento.

¿Tendré algún beneficio económico por participar en el estudio?

NO recibirás ningún incentivo económico ni de otra índole, únicamente la satisfacción de participar para un mejor entendimiento de esta enfermedad tan frecuente en los jóvenes adolescentes.

¿Quién va a saber que estoy participando en el estudio?

Guardaré tu información con códigos y no con nombres. Si los resultados de este estudio son publicados, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de las personas que participan en este estudio. Los archivos no serán mostrados a ninguna persona ajena al estudio sin tu consentimiento.

¿Me puedo retirar en cualquier momento?

Si decides participar, en el estudio, puedes retirarte de éste en cualquier momento, o no participar en una parte del estudio sin perjuicio alguno para ti.

¿A quién llamo si quiero hacer preguntas sobre el estudio?

Si tienes alguna duda adicional, por favor pregunta al personal del estudio, o llamar a Jhanely Vásquez Salazar al teléfono 979377283 o a la Dra. Claudia Rodríguez al teléfono 976996558

Si tienes preguntas sobre los aspectos éticos del estudio y tus derechos como participante, puedes contactar al Comité de Ética de la Universidad Nacional de Cajamarca, al teléfono 950550555 y preguntar por la Dra. Sara Palacios.

CONSENTIMIENTO

Después de haber comprendido la información proporcionada y que he tenido la oportunidad de formular mis preguntas y dudas, las que han sido contestadas y aclaradas, acepto voluntariamente participar en este estudio, comprendo que no hay mayor riesgo ni peligro que pueda pasar si participo en el proyecto. Recibiré una copia firmada de este consentimiento.

Para constancia de lo expuesto con anterioridad firmamos este documento a los ____ días del mes de _____ del año _____.

Participante

Nombre:

DNI:

Investigador

Nombre:

DNI:

Testigo (Si participante es iletrado)

Nombre:

DNI:

APÉNDICE N°10. Diámetros de los halos de inhibición por triplicado.

Tabla 7. Diámetros de los halos de inhibición al 100 % de concentración del aceite esencial de orégano.

Concentración 100%		REPETICIONES (mm)				
COD. CEPA	CN	R1	R2	R3	PROMEDIO	
ATCC 6919	6	34	34	33	33,7	
PA1	6	33	34	33	33,3	
PA2	6	36	35	36	35,7	
PA3	6	35	35	34	34,7	
PA4	6	38	37	38	37,7	
PA5	6	35	35	34	34,7	
PA6	6	36	36	35	35,7	
PA7	6	43	44	43	43,3	
PA8	6	39	40	39	39,3	
PA9	6	39	38	38	38,3	
PA10	6	37	37	36	36,7	

CN: Control negativo. mm: milímetros. PA: *Propionibacterium acnes*

Tabla 8. Diámetros de los halos de inhibición al 50 % de concentración del aceite esencial de orégano.

Concentración 50%		REPETICIONES (mm)				
COD. CEPA	CN	R1	R2	R3	PROMEDIO	
ATCC 6919	6	22	22	22	22,0	
PA1	6	25	23	26	24,7	
PA2	6	18	16	18	17,3	
PA3	6	25	23	25	24,3	
PA4	6	22	23	21	22,0	
PA5	6	20	19	21	20,0	
PA6	6	16	16	15	15,7	
PA7	6	25	23	23	23,7	
PA8	6	16	15	15	15,3	
PA9	6	24	23	23	23,3	
PA10	6	16	15	15	15,3	

CN: Control negativo. mm: milímetros. PA: *Propionibacterium acnes*

Tabla 9. Diámetros de los halos de inhibición al 10 % de concentración del aceite esencial de orégano.

Concentración 10%	REPETICIONES (mm)				
	COD. CEPA	CN	R1	R2	R3
ATCC 6919	6	12	11	11	11,3
PA1	6	11	12	12	11,7
PA2	6	10	10	9	9,7
PA3	6	11	11	11	11,0
PA4	6	8	8	10	8,7
PA5	6	8	8	9	8,3
PA6	6	8	8	8	8,0
PA7	6	8	8	9	8,3
PA8	6	9	9	10	9,3
PA9	6	9	10	10	9,7
PA10	6	8	8	8	8,0

CN: Control negativo. mm: milímetros. PA: *Propionibacterium acnes*

Tabla 10. Diámetros de los halos de inhibición del control positivo (minociclina 30 µg).

MINOCICLINA (MN) 30 µg	REPETICIONES (mm)				
	COD. CEPA	CN	R1	R2	R3
ATCC 6919	6	32	30	32	31,3
PA1	6	33	33	33	33,0
PA2	6	33	29	32	31,3
PA3	6	28	27	29	28,0
PA4	6	30	29	28	29,0
PA5	6	29	29	30	29,3
PA6	6	30	28	30	29,3
PA7	6	33	33	32	32,7
PA8	6	28	28	29	28,3
PA9	6	34	34	34	34,0
PA10	6	32	30	32	31,3

CN: Control negativo. mm: milímetros. PA: *Propionibacterium acnes*

APÉNDICE N°11. Análisis estadísticos

PRUEBA DE NORMALIDAD

Hipótesis estadísticas:

Ho: Los datos siguen distribución normal

Ha: Los datos no siguen distribución normal.

Nivel de significación:

$p \leq 0,05$

Prueba estadística:

Shapiro- Wilk

Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
AE 10%	,215	33	,000	,856	33	,000
AE 50%	,188	33	,005	,882	33	,002
AE 100%	,163	33	,025	,901	33	,006
MN 30ug	,184	33	,006	,912	33	,011

Decisión:

$p > 0,05$: No se rechaza la hipótesis nula.

$p \leq 0,05$: Se rechaza la hipótesis nula

Conclusión:

Los datos no siguen distribución normal.

PRUEBA DE KRUSKAL WALLIS

Hipótesis estadísticas:

Ho: Los diámetros de los halos de inhibición entre los grupos son iguales.

Ha: Los diámetros de los halos de inhibición entre los grupos son diferentes.

Nivel de significación:

$p \leq 0,05$

Prueba estadística:

Kruskal- Wallis

Grupos	N	Rango promedio
AE 10%	33	17,00
AE 50%	33	50,00
AE 100%	33	115,23
MN 30ug	33	83,77
Total	132	

Estadísticos de prueba^{a,b}

	Halos de Inhibición
H de Kruskal-Wallis	121,988
gl	3
Sig. asin.	,000

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Grupos

Decisión:

$p > 0,05$: No se rechaza la hipótesis nula.

$p \leq 0,05$: Se rechaza la hipótesis nula

Conclusión:

Los diámetros de los halos de inhibición entre los grupos son diferentes.

Pruebas post hoc:

Comparaciones por parejas de Grupos					
Sample 1-Sample 2	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada ^a
AE 10%-AE 50%	-33,000	9,405	-3,509	,000	,003
AE 10%-MN 30ug	-66,773	9,405	-7,100	,000	,000
AE 10%-AE 100%	-98,227	9,405	-10,444	,000	,000
AE 50%-MN 30ug	-33,773	9,405	-3,591	,000	,002
AE 50%-AE 100%	-65,227	9,405	-6,935	,000	,000
MN 30ug-AE 100%	31,455	9,405	3,344	,001	,005

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son iguales.

Se visualizan las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es de .050.

a. Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección Bonferroni para varias pruebas.

Se observan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los halos de inhibición entre los diferentes grupos.

ANEXOS

ANEXO N°1. Constancia de identificación botánica de *Origanum vulgare* L.



CONSTANCIA

El que suscribe:

Director del Herbario CPUN "Isidoro Sánchez Vega-UNC", de la Universidad Nacional de Cajamarca, hace constar, que de parte de **Vásquez Salazar, Jhanely Lizbeth**, bachiller de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología, de la **Universidad Nacional de Cajamarca**; ha recibido una muestra botánica, la misma que fue identificada y ubicada taxonómicamente, en esta dependencia, como:

CATEGORÍA TAXONÓMICA

MUESTRA

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Lamiales
Familia:	Lamiaceae
Sub Familia	Nepetoideae
Tribu	Mentheae
Género:	Origanum
Especie:	<i>Origanum vulgare</i> L.

Sinonimia: *Origanum albiflorum* K. Koch, *O.anglicum* Hill, etc.

La especie es conocida como "orégano"; fue colectada en el cercado del distrito de La Encañada, provincia de Cajamarca y departamento de Cajamarca a 3,098 msnm, en las coordenadas siguientes: S: 7° 5' 12" O: 78° 20' 42".

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

Cajamarca, 28 de octubre de 2021



M.Sc. Gustavo IBERICO VELA

DIRECTOR



Anaerobe System

System for the identification of anaerobic microorganisms.

Ref. 71620 - 79620

Contents	Page
Italiano	1
English	5



Anaerobe System

System for the identification of anaerobic microorganisms.

DESCRIPTION

Anaerobe System is a 24-wells system containing desiccated biochemical substrata for the identification of anaerobes. The system is inoculated with the suspension of the organism to be examined and incubated at $36\pm 1^\circ\text{C}$ for 24-48 hours. The microorganism is identified by assessing the color change in the various wells in order to determine its numerical profile. The complete list of those organisms that is possible to identify with this system is given in the Identification Table at the end of the package insert.

CONTENT OF THE KIT

Ref. 71620	Ref. 79620
<ul style="list-style-type: none"> • 20 Anaerobe System • 20 Vials of Anaerobe Broth (7.0 mL) • Instruction sheet and Data chart for test results 	<ul style="list-style-type: none"> • 4 Anaerobe System • 4 Vials of Anaerobe Broth (7.0 mL) • Instruction sheet and Data chart for test results

ITEMS NECESSARY BUT NOT INCLUDED IN THE PACKAGE

McFarland 1 Barium Sulphate Standard (ref. 80401)	GasPak EZ Anaerobe Pouch System (ref. 96730)
Kovac's Reagent Droppers (ref. 87001)	Catalase Reagent Droppers (ref. 87003)
Sulphanilic acid and Naphtylamine (ref. 80260)	Identification Software online (free-access)

PRINCIPLE OF THE METHOD

Anaerobe System allows the identification of anaerobes of clinical significance. 24 different tests are carried out, each in every single well of the system. These wells are inoculated with a bacterial suspension which reconstitutes the dehydrated media contained in. The reactions occurring in the wells during incubation produce color changes which are read according to the Interpretive Table. The organism numerical profile is determined and the identification is obtained by using the Identification Software on Liofilchem website.

CONFIGURATION

Well	Test	Well	Test
1-GLU	Fermentation of glucose	13-SOR	Fermentation of sorbitol
2-MAN	Fermentation of mannitol	14-RAM	Fermentation of rhamnose
3-LAC	Fermentation of lactose	15-TRE	Fermentation of trehalose
4-SAC	Fermentation of saccharose	16-FRU	Fermentation of fructose
5-MAL	Fermentation of maltose	17-GAL	Fermentation of galactose
6-SAL	Fermentation of salicin	18-NAG	N-acetyl- β -glucosaminidase activity
7-XYL	Fermentation of xylose	19-GLY	Utilization of glycerol
8-ARA	Fermentation of arabinose	20-URE <input type="checkbox"/>	Urease activity
9-CEL	Fermentation of cellobiose	21-ESC	Hydrolysis of esculin
10-MNN	Fermentation of mannose	22-IND *	Indole formation
11-MLZ	Fermentation of melezitose	23-CAT *	Catalase activity
12-RAF	Fermentation of raffinose	24-NIT *	Nitrate reduction

: overlay the well with vaseline oil

* : after incubation, add the indicated reagent for performing the test

COLLECTION AND PREPARATION OF THE SAMPLE

Anaerobe System is not for use directly with clinical or other specimens. The microorganism to be identified must first be isolated on a suitable culture medium according to standard microbiological techniques. Parallel aerobic cultivation is strongly recommended. Perform Gram staining and microscopic examination to classify the bacteria as:

- Spore-forming or not;
- Gram-positive or negative;
- Coccus or bacillus.

NOTE: The above information are necessary for final identification of the organism under investigation.

TEST PROCEDURE

1) PREPARATION OF THE BACTERIAL SUSPENSION

- The microorganism to be identified must be recently isolated (18-24 h); bacterial cultures older than 48 hours can provide not reliable results.
- Using a swab, harvest all the growth obtained in anaerobic conditions on one or more blood agar plates.
- Put the swab into a vial of Anaerobe Broth* contained in the kit. Emulsify the organism by rotating the swab and rubbing it against the side of the vial without taking it out of the suspension liquid. The final turbidity should be equal to 1.0 McFarland. This suspension must be used immediately after preparation.

NOTE: To maintain anaerobic conditions, avoid introducing air into the broth when homogenizing.

* Anaerobe Broth (g/L):

Enzymatic Digest of Casein 2.5g, Enzymatic Digest of Soybean Meal 2.5g,
Yeast Extract 5g; L-Tryptophane 0.2g, L-Cystine 0.4g, Hemin 5mg, Vitamin K1 10mg,
Sodium Sulfate 0.1g, Distilled Water 1000 mL; pH 7.1 ± 0.2

2) INOCULATION OF THE SYSTEM

- Take a system from its wrap and bring it to room temperature.
- Write down the name of the patient and the date of the start of the examination.
- Dispense 0.2 mL of the bacterial suspension into each well of the system and overlay with 1 drop vaseline oil the well **20-URE**.
- Cover the system with the lid provided and incubate at 36±1°C for 24-48 hours in anaerobic atmosphere.

NOTE: Many anaerobic bacteria produce reactions which are clear and easy within 24 hours, but some strains grow slowly and can only be identified after 48 hours of incubation.

INTERPRETATION OF THE RESULTS

At the end of the incubation period:

1. Add 1 drop of Kovac's reagent (**Kovac's Reagent Droppers**, ref. 87001) to the well **22-IND** to carry out the indole test (wait 1-2 min for reading after adding the reagent).
2. Add 2 drops of hydrogen peroxide (**Catalase Reagent Droppers**, ref. 87003) to the well **23-CAT** to perform the catalase test (expose the system to air for 30 min before adding the reagent).
3. Add 1 drop of sulphanic acid and 1 drop of naphthylamine (**Identification System Reagent**, ref. 80260) to the well **24-NIT** for nitrate reduction testing (wait 1-2 min for reading after adding the reagents).
4. Watch for the color change in the wells and interpret the results by referring to the Interpretive Table.
5. Note the results on the test results form and determine the 9-digit code following instructions as outlined under NUMERICAL CODE FORMATION.
6. Identify the organism by using the Identification Software.

Interpretive table.

Well	Test	Well color	
		Positive reaction	Negative reaction
1-GLU	Glucose	yellow	purple
2-MAN	Mannitol	yellow	purple
3-LAC	Lactose	yellow	purple
4-SAC	Saccharose	yellow	purple
5-MAL	Maltose	yellow	purple
6-SAL	Salicin	yellow	purple
7-XYL	Xylose	yellow	purple
8-ARA	Arabinose	yellow	purple
9-CEL	Cellobiose	yellow	purple
10-MNN	Mannose	yellow	purple
11-MLZ	Melezitose	yellow	purple
12-RAF	Raffinose	yellow	purple
13-SOR	Sorbitol	yellow	purple
14-RAM	Rhamnose	yellow	purple
15-TRE	Trehalose	yellow	purple
16-FRU	Fructose	yellow	purple
17-GAL	Galactose	yellow	purple
18-NAG	N-acetyl-β-glucosaminidase	yellow	purple
19-GLY	Glycerol	yellow	purple
20-URE	Urease	pink-fuchsia	yellow
21-ESC	Esculin	black	colorless
22-IND	Indol (add Kovac's Reagent)	red ring	yellow
23-CAT	Catalase (add H ₂ O ₂)	bubbles	no bubbles
24-NIT	Nitrate (add sulphanic acid and naphthylamine)	orange-red	yellow

NUMERICAL CODE FORMATION

The biochemical and morphological tests are separated into 9 groups of 3 and a value of 1, 2 or 4 is indicated for each:

- Value 1 : first test positive in each group (GLU, SAC, XYL, MNN, SOR, FRU, GLY, IND, SPOR);
- Value 2 : second test positive in each group (MAN, MAL, ARA, MLZ, RAM, GAL, URE, CAT, GRAM);
- Value 4 : third test positive in each group (LAC, SAL, CEL, RAF, TRE, NAG, ESC, NIT, COCC);
- Value 0 : every negative test.

A 9-digit code is obtained by adding together the values corresponding to positive reactions within each group.

The example below shows how a numerical profile can be formed.

	Group 1			Group 2			Group 3			Group 4			Group 5			Group 6			Group 7			Group 8			Group 9		
Test	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	CEL	MNN	MLZ	RAF	SOR	RAM	TRE	FRU	GAL	NAG	GLY	URE	ESC	IND	CAT	NIT	SPOR	GRAM	COCC
Value	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
Result	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Sum of values	5			3			5			5			0			7			4			2			0		
NUMERICAL CODE: 535507420 IDENTIFICATION: <i>Bacteroides fragilis</i>																											

QUALITY CONTROL

Each batch of Anaerobe System is subjected to quality control using the following reference strains:
Bacteroides fragilis ATCC® 25285.

PERFORMANCE

The results obtained with the Anaerobe System agree with those obtained using other microbiological and biochemical tests for microbial identification.

FACTORS THAT MAY INVALIDATE THE RESULTS

Contaminated culture; poor standardization of the inoculum; unsuitable material to examine; failure to obtain required conditions of the anaerobic cultivation; use of expired systems or expired supplementary reagents; non compliance with temperatures and/or times of incubation.

PRECAUTIONS

The product Anaerobe System does not contain hazardous substances in concentrations exceeding the limits set by current legislation and therefore is not classified as dangerous. It is nevertheless recommended to consult the safety data sheet for its correct use. Anaerobe System is a disposable device to be used for *in vitro* diagnostic use only. It is intended for professional use by properly trained personnel in the laboratory, using approved asepsis and safety methods for handling pathogenic.

CONSERVATION

Store Anaerobe System at 2-8°C in the original packaging. Keep away from sources of heat and avoid excessive changes in temperature. In such conditions the product will remain valid until the expiry date indicated on the label. Do not use beyond that date. Eliminate without using if there are signs of deterioration.








DISPOSAL OF USED MATERIAL

After use, Anaerobe System and material that has come into contact with the sample must be decontaminated and disposed of in accordance with the techniques used in the laboratory for decontamination and disposal of potentially infected material.

PRESENTATION

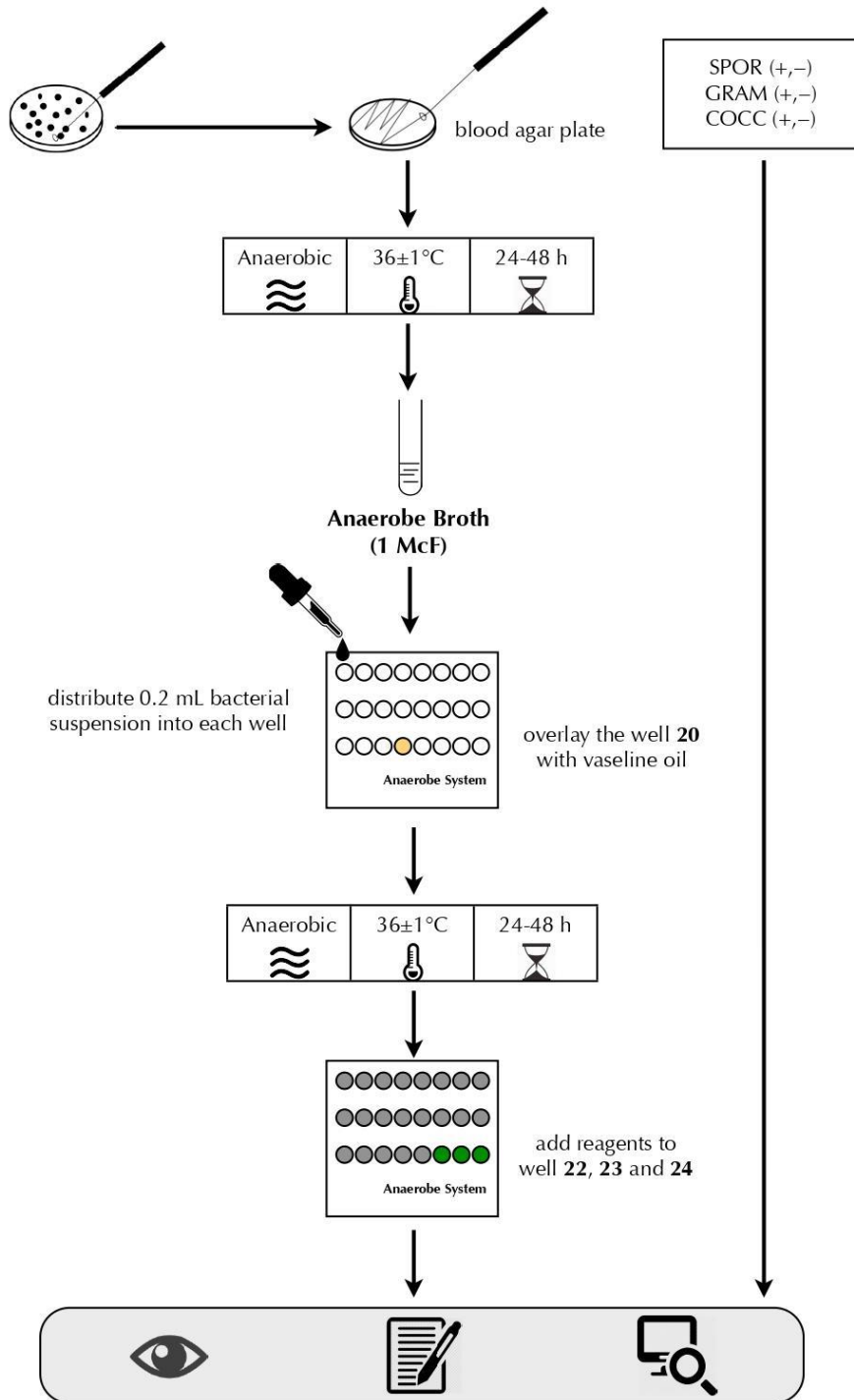
Product	Ref.	Packaging
Anaerobe System	71620	20 test
Anaerobe System	79620	4 test

TABLE OF SYMBOLS

IVD <i>In Vitro</i> Diagnostic medical device	 Do not reuse	 Manufacturer	 Contains sufficient for <n> tests	 Temperature limitation
REF Catalogue number	 Fragile, handle with care	 Use by	 Attention, consult accompanying documents	LOT Batch code



WORKFLOW



IDENTIFICATION TABLE
% of reactions positive after 24-48 h at 36±1°C

Organism	Test																										
	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA	CEL	MNN	MLZ	RAF	SOR	RAM	TRE	FRU	GAL	NAG	GLY	URE	ESC	IND	CAT	NIT	SPOR	GRAM	COCC
<i>Actinomyces israelii</i>	99	100	89	99	99	99	99	97	90	90	38	82	40	45	90	95	95	5	25	0	30	0	1	95	0	100	0
<i>Actino. meyeri/odontolyticus</i>	99	1	72	98	93	31	62	37	0	0	0	10	1	15	0	95	95	5	50	0	5	1	2	95	0	100	1
<i>Actinomyces naeslundii</i>	99	26	72	96	94	55	0	0	50	70	5	60	16	0	46	95	95	5	50	0	5	1	2	95	0	99	0
<i>Actinomyces viscosus 1</i>	99	0	65	99	99	22	0	0	17	95	0	99	0	0	5	50	50	50	60	0	1	0	90	50	0	100	0
<i>Actinomyces viscosus 2</i>	60	0	0	60	0	5	0	0	0	60	0	0	0	0	0	50	50	50	0	0	0	0	80	5	0	100	0
<i>Racteroides cacciae</i>	100	0	100	100	75	0	100	100	0	100	25	100	0	60	70	50	50	10	0	90	0	0	50	0	0	0	0
<i>Racteroides distasonis</i>	99	0	99	99	93	73	86	27	60	95	65	98	1	80	70	50	50	50	4	0	80	0	77	50	0	0	0
<i>Racteroides fragilis</i>	99	0	99	99	99	0	99	0	41	99	0	99	0	2	0	95	95	95	1	0	99	0	96	5	0	0	1
<i>Rac. ovatus/thetaiotaomicron</i>	99	7	99	99	99	28	99	99	65	99	23	99	2	99	83	95	95	95	1	1	95	80	65	5	0	0	0
<i>Racteroides stercoris/eggerthii</i>	99	1	92	25	90	10	75	70	30	99	0	30	0	65	0	50	50	0	0	65	99	50	50	0	0	0	0
<i>Racteroides uniformis</i>	99	0	99	99	95	97	99	95	99	99	1	98	0	42	1	95	50	95	0	0	99	91	9	5	0	0	0
<i>Racteroides ureolyticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	0	99	0	0	0	95	0	0	0
<i>Racteroides vulgatus</i>	99	0	99	98	98	0	99	92	8	99	0	94	0	77	3	95	95	95	1	0	23	0	2	5	1	0	1
<i>Rifidobacterium spp. 1</i>	99	30	99	99	99	70	60	75	40	70	20	91	25	0	35	50	50	50	0	0	40	0	0	50	0	99	0
<i>Rifidobacterium spp. 2</i>	99	99	99	99	99	90	80	99	99	85	100	75	50	99	50	50	50	45	0	75	0	0	50	0	99	0	0
<i>Clostridium baratii</i>	99	8	75	99	80	99	0	0	99	99	0	0	8	8	8	95	95	95	54	0	75	0	0	50	99	99	0
<i>Cl. beijerinckii/butyricum</i>	99	47	95	99	98	97	97	80	95	95	20	80	31	25	90	95	95	5	54	0	76	1	0	5	100	89	0
<i>Clostridium bifementans</i>	75	0	0	0	70	10	0	0	0	50	0	0	4	0	0	5	5	5	5	0	6	90	0	5	97	99	0
<i>Cl. botulinum/sporogenes</i>	55	0	0	1	72	0	0	0	1	1	0	0	1	0	40	5	5	5	1	0	20	20	0	5	99	99	0
<i>Clostridium cadaveris</i>	87	0	0	6	6	0	0	1	0	40	0	0	1	0	5	5	5	95	0	0	0	98	0	5	99	97	0
<i>Clostridium clostridioforme</i>	90	0	77	99	99	88	91	94	77	99	75	94	1	86	88	50	50	50	0	0	75	0	25	50	75	75	0
<i>Clostridium difficile</i>	99	80	0	0	0	20	5	0	5	66	83	0	5	1	5	95	5	5	0	0	30	0	0	5	98	99	0
<i>Clostridium histolyticum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	5	95	90	0
<i>Clostridium innocuum</i>	99	99	0	46	0	99	5	15	99	99	4	1	0	0	25	95	95	5	1	0	45	0	0	5	99	99	0
<i>Clostridium paraputrificum</i>	99	0	99	92	99	99	0	0	99	99	0	7	7	0	21	95	95	95	0	0	99	0	0	50	99	99	1
<i>Clostridium perfringens</i>	99	2	95	95	99	1	0	0	4	99	0	16	10	0	76	95	95	95	54	0	4	0	1	95	84	99	0
<i>Clostridium ramosum</i>	99	80	99	99	99	99	0	0	99	99	0	60	0	57	94	95	95	95	0	0	40	1	0	50	92	75	0
<i>Clostridium septicum</i>	99	1	99	0	94	94	0	1	76	99	0	0	0	1	84	95	95	95	0	0	35	0	1	95	99	99	0
<i>Clostridium sordellii</i>	95	0	0	0	90	0	0	0	1	4	0	0	4	0	0	5	5	5	0	99	0	99	0	5	99	99	0
<i>Clostridium spp</i>	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	50	50	50	50	50	50	50	50	99	99	0
<i>Clostridium tertium</i>	99	99	99	99	99	99	70	0	99	99	62	0	1	0	85	95	95	95	0	1	5	10	0	95	99	99	0
<i>Collinsella aerofaciens</i>	100	0	99	90	90	75	0	0	75	99	0	0	0	0	70	95	95	5	0	0	40	0	0	5	0	100	0
<i>Eggerthella lenta</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5	5	5	0	0	1	0	60	95	0	100	0
<i>Eubacterium limosum</i>	100	70	0	0	0	4	1	1	0	4	0	0	0	0	0	95	5	5	0	0	4	0	5	5	0	100	0
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	99	0	0	70	15	75	5	0	25	75	0	75	0	0	23	5	50	5	25	0	25	0	3	5	0	0	0
<i>Fuso. necrophorum/nucleatum</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	95	5	5	0	0	0	94	0	5	0	0	0
<i>Fusobacterium varium</i>	81	0	0	0	0	0	4	0	0	75	0	0	0	0	0	95	5	5	0	0	0	70	0	5	0	0	0
<i>Gemella morbillorum</i>	100	8	5	90	100	8	0	0	5	100	0	5	5	0	20	5	5	5	0	0	5	0	0	5	0	100	99
<i>Lact. acidophilus/jensenii</i>	99	3	80	99	96	99	1	0	99	99	5	15	5	3	90	50	50	50	8	0	75	0	0	50	0	100	0
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	50	50	0	0	1	93	18	50	0	98	99
<i>Peptostreptococcus group</i>	5	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	0	5	0	0	5	5	0	94	100
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	50	50	0	0	0	80	3	50	0	0	3
<i>Prevotella bivia</i>	99	1	99	0	99	1	1	1	0	99	0	0	1	0	95	95	95	80	0	0	1	0	5	0	0	0	1
<i>Prevotella intermedia/disiens</i>	99	0	0	35	98	0	0	0	1	85	0	19	0	1	1	95	5	5	4	0	1	32	1	5	0	0	3
<i>Prev. melaninogenica/oralis</i>	97	1	97	83	97	31	2	1	53	97	1	89	0	12	4	95	95	95	18	0	51	0	0	5	0	0	1
<i>Propionibacterium acnes</i>	97	20	1	5	0	0	0	0	0	97	0	0	10	0	1	95	50	95	97	0	0	67	89	95	0	100	1
<i>Propionibacterium granulosum</i>	99	41	0	82	31	0	0	1	0	98	25	35	0	4	67	95	50	5	99	0	0	0	79	5	0	100	0
<i>Propioni. propionicum/avidum</i>	92	50	50	73	80	0	2	5	0	50	2	75	0	1	30	95	95	5	45	0	0	30	5	0	82	0	
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	87	0	5	0	0	0	0	5	0	75	0	0	0	5	5	100	0	0	75	25	5	0	99	100	0	100	100
<i>Streptococcus constellatus</i>	100	0	22	100	100	100	0	0	33	100	0	0	0	0	66	50	50	50	0	0	22	0	0	50	0	100	100
<i>Streptococcus intermedius</i>	99	20	99	99	99	95	0	0	90	99	6	26	0	0	99	50	50	50	0	0	75	0	0	50	0	100	100
<i>Veillonella parvula</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	50	100	0	1	100

BIBLIOGRAPHY

1. James Versalovic, Karen C. Carroll, Guido Funke, James H. Jorgensen, Marie Louise Landry, David W. Warnock Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition (2011) ASM Press.
2. Ronald M. Atlas. Handbook of Microbiological Media, 4th Edition (2010) CRC Press.



Microbiology Products

Liofilchem® and the Liofilchem company logo are registered trademarks of LIOFILCHEM s.r.l.



LIOFILCHEM® s.r.l.

Via Scozia zona ind.le, 64026 Roseto degli Abruzzi (Te) Italy
Tel. +39 0858930745 Fax +39 0858930330 www.liofilchem.net liofilchem@liofilchem.net



F10215
Rev.0 / 29.03.2016

ANEXO N°3. Identificación en el software de las cepas de *Propionibacterium acnes*.

DIAGNOSTICI
LIOFIL.CHEM

Raccolta completa codici batterici ver. 5.0/2009
Complete collection of bacterial codes ver. 5.0/2009

Identification Code Disk

71620 - ANAEROBE SYSTEM

+	+	-	-	-	-	-	-			
1 GLU	2 MAN	3 LAC	4 SAC	5 MAL	6 SAL	7 XYL	8 ARA			
-	+	-	-	-	-	-	+			
9 CEL	10 MNE	11 MLZ	12 RAF	13 SOR	14 RHA	15 TRE	16 FRU			
-	+	-	+	+	+	+	+			
25 SPOR	26 GRAM	27 COCCI	17 GAL	18 NAG	19 GLY	20 URE	21 ESC	22* IND	23* CAT	24 NIT

CODICE NUMERICO: 300107172 **Cerca/Search** **Annulla/Reset** **File Excel**
NUMERICAL CODE

IDENTIFICAZIONE / IDENTIFICATION:
100% *Propionibacterium acnes*

N.B.: Per effettuare una ricerca tramite lettura da piastrina, cliccare sui pozzetti per impostare i valori + o -
Per effettuare una ricerca tramite codice, digitare il codice batterico da identificare nel testo indicato
To carry out a research through plate reading, click on the well for to set values + o -
To carry out a research through code, digit the bacterial code to be identified in the text indicated

ANEXO N°4. Medio de Cultivo Modificado para *P. acnes*.

Se pesó 16 g de agar-agar; extracto de levadura 5,5 g; glucosa 1,1 g; cloruro de sodio 5,5 g; hemina 0,005 g; glicerol 11 mL y se suspendió en 1000 mL de agua destilada durante 5 a 10 minutos. Se calentó y agitó hasta su ebullición, dejar hervir durante un minuto. El envase de fondo plano se cerró y se puso a esterilizar en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos y 15 libras de presión atmosférica. Se dejó enfriar entre 45 a 50 °C (hasta que el calor sea soportable en el dorso de la mano) y se añadió sangre desfibrinada estéril de cordero al 5%. Se homogenizó suavemente con movimientos rotatorios con el fin de obtener una buena mezcla y evitar la formación de burbujas. Luego se distribuyeron 500 mL en placas Petri estériles, se incubaron a 37 °C por 24 horas para verificar la esterilidad del medio de cultivo (39).