



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado
Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y
Geográfica
Unidad de Posgrado

**“Determinación de la actividad antibacteriana del
extracto de orégano (*Origanum vulgare*) emulsionado
en mastitis bovina”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Doctor en Ciencias
Ambientales

AUTOR

Johnny Daniel BRAVO LOOR

ASESOR

Dr. Pedro Luis CASTELLANOS SÁNCHEZ

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Bravo, J. (2020). *Determinación de la actividad antibacteriana del extracto de orégano (Origanum vulgare) emulsionado en mastitis bovina*. Tesis para optar grado de Doctor en Ciencias Ambientales. Unidad de Posgrado, Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Metadatos complementarios

Código ORCID del autor	--0000-0001-5929-0063
DNI o pasaporte del autor	130314734
Código ORCID del asesor	0000-0001-9154-5797
DNI o pasaporte del asesor	09649588
Grupo de investigación	--
Agencia financiadora	País de la agencia financiadora
	Nombre y siglas de la agencia financiadora
	Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López (ESPAM MFL).
	Nombre del programa financiero
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	
	Número de contrato
	Lugar
	Sitio El Limón, cantón Bolívar, provincia de Manabí, Ecuador
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Coordenadas geográficas
	situado geográficamente entre las coordenadas 0° 49' 23" Latitud Sur; 80° 11' 01" Longitud Oeste y una altitud de 15 msnm.
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2015, 2016 y 2017
Disciplinas OCDE	--



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú, Decana de América

FACULTAD DE INGENIERÍA GEOLÓGICA, MINERA, METALÚRGICA Y GEOGRÁFICA

UNIDAD DE POSGRADO



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

SUSTENTACIÓN PÚBLICA

En la Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Lima, a los nueve días del mes de julio del año dos mil veinte, siendo las once horas, se reúnen los suscritos Miembros del Jurado Examinador de Tesis, nombrado mediante Dictamen N° 000008/UPG-FIGMMG/2020 del 07 de julio del 2020, con la finalidad de evaluar la sustentación virtual a la amparo de la Directiva de la UNMSM aprobada con Resolución Rectoral N°01357-R-20 de la siguiente tesis:

TÍTULO

«DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE ORÉGANO (*Origanum vulgare*) EMULSIONADO EN MASTITIS BOVINA»

presentada por el Mg. **JOHNNY DANIEL BRAVO LOOR**, para optar el **GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES**.

El Secretario del Jurado Examinador de la Tesis analiza el expediente N° 07646/FIGMMG/2014 de fecha 24 de octubre del 2014, en el marco legal y estatutario de la Ley Universitaria, acreditando que tiene todos los documentos y que cumplió con las etapas del trámite según el «Reglamento General de Estudios de Posgrado», aprobado con Resolución Rectoral N° 04790-R-18 del 08 de agosto del 2018.

Luego de la Sustentación, se procede con la calificación de la Tesis, de acuerdo al procedimiento respectivo y se registra en el acta correspondiente de conformidad al Art. 72 del precitado Reglamento, correspondiéndole al graduando la siguiente calificación:

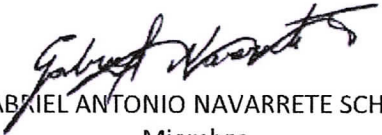
..... Muy BUENO (18)

Habiendo sido aprobada la sustentación virtual de la Tesis, el Presidente recomienda a la Facultad se le otorgue el **GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS AMBIENTALES** al Mg. **JOHNNY DANIEL BRAVO LOOR**.

Siendo las 12:00 horas, se dio por concluido al acto académico.


DR. CARLOS FRANCISCO CABRERA CARRANZA
Presidente


DR. OSCAR RAFAEL TINOCO GÓMEZ
Secretario


DR. GABRIEL ANTONIO NAVARRETE SCHETTINI
Miembro


DR. PEDRO LUIS CASTELLANOS SÁNCHEZ
Asesor

CONTENIDO

CARÁTULA.....	i
CONTENIDO DE CUADROS.....	vi
CONTENIDO DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN	viii
SUMMARY.....	ix
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Situación Problemática	1
1.2. Formulación del Problema	4
1.2.1. Problema General	4
1.2.2. Problemas Específicos	4
1.3. Justificación Teórica	5
1.4. Justificación Práctica	6
1.5. Objetivos	8
1.5.1. Objetivo General.....	8
1.5.2. Objetivos Específicos	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	9
2.1. Marco Filosófico o Epistemológico de la Investigación	9
2.1.1. Ambiente epistemológico	9
2.2. Antecedentes de Investigación.....	10
2.2.1. La Mastitis bovina.....	10
2.2.2. El Orégano.....	12
2.2.3. Emulsión de aceites esenciales	15
2.3. Bases Teóricas.....	17
2.3.1. Aceite Esencial de Orégano AEO	17
2.3.2. Características Antibacterianas y Antifúngicas	18
2.3.3. Metodologías para valorar la actividad antimicrobiana de aceites	

esenciales.....	19
2.3.4. Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida	19
2.3.5. Toxicidad de los aceites esenciales	21
2.3.6. Emulsionantes.....	22
2.3.7. Formación de Emulsiones.....	23
2.3.8. Surfactantes	24
2.3.9. <i>Clasificación</i> de los Surfactantes	26
2.3.10. Micelas y asociación de micelas.....	28
2.3.10. Surfactantes tipo Alquil Fenol y Alcohol Polietoxilados	28
2.3.11. Sistema Surfactante – Agua – Aceite	29
2.3.12. Método de HLB (Balance Hidrofílico – Lipofílico).....	30
2.3.12. Espectrofotometría UV visible.....	31
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	33
3.1. Ubicación de la Investigación	33
3.2. Obtención del extracto emulsionado de orégano	33
3.2.1. Recolección y extracción.....	33
3.2.2. Caracterización del extracto de orégano en base a:	34
3.2.3. Formación de grupos cromóforos.....	36
3.2.4. Método espectrofotométrico UV visible	36
3.2.5. Preparación de la curva estándar	37
3.2.6. Elaboración de la emulsión del extracto de orégano.....	38
3.2.7. Detección de la mastitis bovina.....	39
3.2.8. Aplicación intramamaria del extracto emulsionado	40
3.2.9. Determinación de UFC/ml de <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>	41
3.4. Diseño Metodológico de la Investigación	42
3.4.1. Modelo Lineal Aditivo I	42
3.4.2. Modelo Lineal Aditivo II	43

3.4.3. Análisis de la Varianza Anova	43
3.5. Unidad de Análisis	45
3.6. Población de Estudio	45
3.7. Tamaño de Muestra.	45
3.8. Selección de Muestra	45
3.9. Técnicas de recolección de datos	45
3.10. Análisis e Interpolación de la Información	46
3.11. Análisis inferencial	46
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
5.1. Conclusiones	57
5.2. Recomendaciones	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	85

CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro 3.1. Ubicación de la Investigación	33
Cuadro 3.2. Fuentes de varianza y grados de libertad	43
Cuadro 3.3. Combinaciones o tratamientos.....	44
Cuadro 4.1. Variables en estudio.....	47
Cuadro 4.2. Prueba de comparación Tukey HSD para los métodos.....	48
Cuadro 4.3. Análisis de la Varianza de UFC/ml para el método ultrasonido, UFC/ml.....	49
Cuadro 4.4. Estadística descriptiva para concentración 12%	51
Cuadro 4.5. Estadística descriptiva para concentración 14%.	51
Cuadro 4.6. Métodos y tratamientos. Fuente: Elaboración propia. - Resultados del laboratorio de la UPS acreditado por SAE muestra disminuciones en el conteo de células somáticas antes de la aplicación de los extractos y ulterior a.....	53
Cuadro 4.7. Correlación (Pearson) para absorbancia vs concentración	54
Cuadro 4.8. Mínimos cuadrados no ponderados Regresión lineal de Absorbancia	54

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 2.1. . Esquema de la molécula tensioactiva con parte polar (hidrofílica) atrayente del agua y no polar (hidrófoba) adherida a la capa orgánica hidrófoba de la arena. Dr. Keith J. Karnok, University of Georgia.....	26
Figura 2.2. Esquema de las variables.....	30
Figura 2.3. Espectro visible que el ojo humano puede percibir	32
Figura 3.1. Esquema destilador con arrastre de vapor	34
Figura 4.1. Colonias circulares grises y amarilla UFC/ml de <i>S. aureus</i> antes de la aplicación del extracto.....	50
Figura 4.2. Las colonias de <i>S. aureus</i> en leche de vacas con mastitis	50
Figura 4.3. Se observa disminución de las colonias grises y amarillas de <i>S. aureus</i> , ulterior a la aplicación	50

Figura 4.4. Cultivo en medio agar Manitol en muestras de leche para UFC/ml de <i>S. aureus</i> ulterior a la aplicación del extracto.....	51
Figura 4.5. Regresión simple para la gráfica	55
Figura 4.6. La gráfica muestra la linealidad de la recta.....	56

RESUMEN

Se obtuvo extracto acuoso de hojas de orégano *Origanum vulgare* por arrastre de vapor de agua, para determinar su actividad antibacteriana en vacas en producción con mastitis bovina con 12 y 14% de concentración en compuestos fenólicos, se emulsionó (O/W) usando dos métodos: ultrasonido y agitación magnética. Para el diagnóstico se usó el test de California (CMT) y se confirmó mediante conteo de células somáticas (CCS) por citometría fija y unidades formadoras de colonias (UFC)/ml en cultivos de agares Manitol y MacConkey para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente. Se aplicó 5 ml del extracto emulsionado vía intramamaria posterior al ordeño y amamantamiento de la cría durante 3 días con cánulas de acero inoxidable y, en un diseño completamente al azar y análisis de varianza con arreglo bifactorial, muestran que los resultados indican diferencias estadísticas no significativas para el CCS y UFC/ml entre las concentraciones (12 y 14%) de compuestos fenólicos, no obstante, si hubo diferencias significativas $p < 0,05$ para el método de elaboración ultrasonido en las UFC/ml para colonias de *S. aureus* y el CCS, por lo que se concluye que el producto tiene efecto inhibitor sobre las bacterias. Además, se plantea un método rápido, asequible, menos costoso y más amigable con el ambiente; la espectrofotometría UV visible, que se utilizó para determinar compuestos fenólicos como el carvacrol y timol en el extracto acuoso obtenido con la formación de un cromóforo en solución etanólica 95% (v/v) de cloruro férrico al 1%, con una longitud de onda de 330 nm., un factor de 14 g/dl y un estándar de carvacrol (5-isopropil-2-methylphenol) al 99.7% de concentración, diluidos en serie (9.97 - 11 - 12 - 13 - 14 % v/v). Se efectuó una curva de calibración de la concentración de los patrones y el extracto frente a la absorbancia y se muestran en un análisis de varianza a través del tratamiento estadístico de regresión de los mínimos cuadrados, linealidad y exactitud en el método empleado, obteniéndose concentraciones entre 12 y 14 % de compuestos fenólicos. Se obtuvo la concentración de estos compuestos en el extracto de orégano, al crear grupos no saturados que alcanzan absorbancias en el espectro UV.

Palabras clave: *S. aureus*, inflamación mamaria, surfactante, conteo de células somáticas, cromóforo, UV.

SUMMARY

Aqueous extract of *Origanum vulgare* oregano leaves was obtained by water vapor drag, to determine its antibacterial activity in cows in production with bovine mastitis, with 12 and 14% concentration in phenolic compounds, it was emulsified (O / W) using two methods: ultrasound and magnetic stirring. For the diagnosis, the California test (CMT) was used and confirmed by somatic cell count (CCS) by fixed cytometry and colony forming units (CFU) / ml in Mannitol and MacConkey agar cultures for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* respectively. 5 ml of the emulsified extract was applied intramammary after milking and breastfeeding for 3 days with stainless steel cannulas, in a completely randomized design and analysis of variance with bifactorial arrangement, show that the results indicate non-significant statistical differences for CCS and CFU / ml between concentrations (12 and 14%) of phenolic compounds, however, if there were significant differences $p < 0.05$ for the method of ultrasound processing in the CFU / ml for colonies of *S. aureus* and CCS, so it is concluded that the product has an inhibitory effect on bacteria. In addition, a fast, affordable, less expensive and more environmentally friendly method is proposed; UV spectrophotometry to determine phenolic compounds such as carvacrol and thymol in the aqueous extract obtained, with the formation of a chromophore in 95% (v / v) ethanolic solution of 1% ferric chloride, a wavelength of 330 nm., a factor of 14g / dl and with a standard of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) at 99.7% concentration, serially diluted (9.97 - 11 - 12 - 13 - 14 - 14% v / v). A calibration curve of the concentration of the standards and the extract against the absorbance was performed and shown in an analysis of variance through the statistical treatment of regression of the least squares, linearity and accuracy in the method used, obtaining concentrations between 12 and 14% of phenolic compounds. The concentration of these compounds in oregano extract was obtained by creating unsaturated groups that reach absorbances in the UV spectrum.

Keywords: Breast inflammation, somatic cells, surfactants, *S. aureus*, magnetic stirring.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación Problemática

En el centro norte de Manabí Ecuador como en otras regiones, en la época de la producción industrial se incrementó el uso de antibacterianos, como biocidas, sustancias y preparados destinados a combatir la acción de los microorganismos por medios químicos y biológicos (Jiménez *et al.* 2011). En la actualidad existe una gran variedad de productos para eliminar y controlar el desarrollo de bacterias, se buscan que estos sean los más tóxicos para microorganismos, pero con efectos mínimos para el hombre los animales y las plantas (Martínez, 2005), no obstante, sus consuetudinarios usos han ocasionado efectos en el entorno. Investigadores determinan que el uso sin control de productos sintéticos ha desarrollado la población de microorganismos resistentes destructores de plantas (Cooke *et al.* 2003; Leroux, 2003 y Guerrero *et al.* 2007).

Son elevadas las pérdidas económicas en el sector ganadero productor de leche debido a la mastitis bovina y, se originan por una disminución en la obtención de leche y detrimento de sus propiedades y caracteres. (Cerón-Muñoz *et al.*, 2002; Wellenberg *et al.*, 2002; Rabello *et al.*, 2005). A una gran diversidad de microorganismos se implican como promotores de mastitis bovina, entre ellos *Staphylococcus aureus* el principal agente contagioso por la existencia de casos y su capacidad de infectar, originando más del 80% de las infecciones intramamarias (González *et al.*, 1980; McDonald, 1984; Rampone *et al.*, 1993; Watts, 1998). *Staphylococcus spp.*, es considerado el principal agente causativo de la mastitis bovina en casos de manifestaciones clínicas y subclínicas (Fagundez, *et al.*, 2010). Los tratamientos más comunes se basan en la aplicación intramamaria de agentes antibacterianos. Sin embargo, las tasas de curación obtenidos con tales drogas no siempre son efectiva, porque puede determinar la aparición de bacterias resistentes (Zafalón *et al.*, 2008).

De 271 ensayos de leche con mastitis se aislaron 300 colonias bacterianas, los investigadores concluyen que las cepas de *S. aureus* aisladas aumentaron su

capacidad de resistir *in vitro* a uno o más antimicrobianos de uso frecuente en el tratamiento de la mastitis bovina, (Pellegrino *et al.*, 2011). En Manabí se determina que la prevalencia de mastitis subclínica en ganaderías de Portoviejo, Carrizal Chone y zonas áridas, es de 21,5% (Delgado y Zambrano 2003) y en el cantón Rocafuerte zona centro de esta provincia, de 280 vacas en ordeño de hatos bovinos escogidos al azar, el 38,57% presentó en uno o más de sus cuartos mamarios, mastitis subclínica (Avellán *et al.*, 2019). En la actualidad el uso de metabolitos secundarios de plantas está resultando una alternativa como antibacterianos, los aceites esenciales naturales se caracterizan por tener origen orgánico, descomponerse en elementos químicos naturales y manifestar pequeños efectos negativos sobre la salud humana y ambiental (Bravo *et al.*, 2000), Barrera y Bautista (2008).

Investigadores determinaron la actividad antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* de distintos extractos de plantas (Álzate *et al.*, 2009), (Bautista *et al.*, 2004), (Cárdenas *et al.*, 2005), (Garduno *et al.*, 2010) y Rodríguez *et al.* (2000). Los extractos acuosos de aceites esenciales de plantas pueden resultar una elección para el control antibacteriano, ya que poseen como características principales su compleja composición química y su carácter fuertemente aromático (Sánchez, 2006) son biodegradables, amigables con el ambiente y presentan pequeños o inexistentes niveles de toxicidad, lo que permite que sean utilizados en cualquier ambiente (Cheng *et al.*, 2009). Dentro de estos aceites esenciales está el aceite de orégano, que presenta actividades antioxidantes y antimicrobianas, probablemente debido a la presencia de carvacrol y timol (Li *et al.*, 2018) y Zhou *et al.* (2018). Muchos investigadores atribuyen la función de los compuestos fenólicos de aceites esenciales entre estos el de orégano, de penetrar a través de las membranas de las células microbianas, causando fugas del contenido del interior de la célula como iones y contenido citoplasmático (Burt, 2004), (Viuda-Martos *et al.*, 2008) y Salvia-Trujillo *et al.* (2015).

En este contexto resulta indispensable que se minimice los riesgos de toxicidad del uso y abuso de productos para el control de microorganismos en el entorno,

creándose la necesidad de potenciar el efecto del extracto de orégano, aceite esencial natural con propiedades antibacterianas obtenidas de vegetales que crecen de manera silvestre en esta región, emulsionándolo. El objetivo fundamental de las emulsiones, es conseguir que los combinados o agregados de naturaleza hidrofílica e hidrofóbica puedan coexistir de manera más estable (Hsieh *et al*/2006), esto se logra con la disminución de la tensión superficial entre dos líquidos inmiscibles y la reducción del tamaño de gota mediante la utilización de emulgentes. La disminución en el tamaño de partícula no sólo mejora el transporte de moléculas activas a través de las membranas biológicas, sino que además aumenta la relación de superficie área/volumen, lo que conduce a una funcionalidad mejorada (Salvia-Trujillo *et al.*, 2015).

1.2. Formulación del Problema

1.2.1. Problema General

¿La actividad antibacteriana del extracto de orégano (*Origanum vulgare*) se incrementó mediante su emulsión en mastitis bovina, minimizando riesgos de toxicidad y resistencia bacteriana?

1.2.2. Problemas Específicos

- ¿Cuál es el método óptimo para elaborar una emulsión que potencie la acción antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en mastitis bovina?
- Qué concentración del extracto en compuestos fenólicos (12 y 14 %) inhibirá la actividad antibacteriana de *E. coli* y *S. aureus* en mastitis bovina?
- ¿Qué caracteriza a la actividad antibacteriana del extracto de orégano emulsionado en el conteo de células somáticas mediante citometría de flujo?
- ¿La concentración de compuestos fenólicos en el extracto se podrá determinar por espectrofotometría UV visible formando un cromóforo?

1.3. Justificación Teórica

La Mastitis Bovina es un problema de salud frecuente en los hatos ganaderos del centro norte de Manabí, Ecuador y, es causada por elevadas concentraciones de bacterias ambientales, ambientes y ordeños antigénicos, desnutrición y afecciones. Esta patología es causada por bacterias que penetran las mamas (Andresen, 2001) y puede ser ocasionadas por traumas físicos, mala asepsia de las ubres durante el ordeño y de equipos para ordeñar mal utilizados, defectuoso sellado post-ordeño, mal estado de los lechos y otros factores que inducen el ingreso de bacterias patógenas al interior de las ubres, ocasionando deterioros al tejido y causando así su infección e hinchazón (Acuña y Rivadeneira, 2008).

La mastitis tiene efectos negativos sobre la producción de leche y sus derivados, pues ocasiona cambios en su composición y causa detrimentos económicos muy elevados a todos los industriales productores de leche en el planeta (Wellenberg *et al.*, 2002; Rabello *et al.*, 2005), esto es debido a la baja producción de leche y un elevado número de terapias clínicas y descarte temprano de vacas (Ceron-Muñoz *et al.*, 2002). Por esta razón durante mucho tiempo es considerada como la patología más onerosa en las granjas lecheras (Correa *et al.*, 2002) y Boulanger *et al.* (2003).

La mastitis subclínica no produce síntomas característicos de la enfermedad y son transmisores persistentes de bacterias zoonóticas sin una conciencia adecuada de los agricultores sobre la posibilidad de transmisión (Prabhu *et al.*, 2013), estos son visiblemente detectados en la fase clínica, en ambos casos los productores empiezan las aplicaciones de antibióticos, consiguiendo generar resistencias bacterianas, con un riesgo importante para la salud pública debido a la posibilidad de transmisión de bacterias zoonóticas o su toxina junto con los genes de resistencia a los antibióticos (Ibrahim *et al.*, 2015).

1.4. Justificación Práctica

En este contexto se propone como alternativa para este tipo de antimicrobianos sintéticos los extractos vegetales entre ellos; el orégano (*Origanum vulgare*) que contiene compuestos con propiedades antioxidantes, antifúngicas, antiespasmódicas, antisépticas y, además, se caracteriza por la potente acción de sus componentes activos carvacrol y timol, que le confieren a esta planta un gran poder antibacteriano (Arcila *et al.*, 2004). Investigan la actividad antibacteriana del aceite esencial de *O. vulgare*, el resultado confirma que tiene efectos antibacterianos sobre bacterias que tiñen de color azul oscuro o violeta la tinción de Gram, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y, sobre bacterias que tiñen de rosado la tinción de Gram; *Pseudomonas aeruginosa* no manifestó sensibilidad en presencia del aceite esencial de orégano, (Albado *et al.*, 2001). Los aceites esenciales de orégano de origen natural, podrían resultar una alternativa como antimicrobianos sin peligros de crear resistencias bacterianas, ni efectos residuales, ya que el carvacrol y timol se sintetizan en metabolitos secundarios y, así son eliminados en la orina (90%) o, exhalados por las vías respiratorias (10%) en forma de dióxido de carbono (Ninkov, 2005).

Investigaciones efectuadas sobre saberes locales en el sitio Balsa en Medio de la provincia de Manabí al este del cantón Bolívar, identificaron ocho especies de plantas medicinales tradicionalmente utilizadas por sus habitantes, entre ellas la de orégano y otras 32 en comunidades vecinas de las que conocían sus usos y algunas propiedades (Vera y Cevallos, 2013). Sin embargo, no están bien difundidos ni socializados las propiedades antifúngicas y antibacterianas del aceite de orégano y lo que podría resultar si se potencia esta acción mediante su emulsificación.

Se considera que las propiedades y efectos de las partículas y materiales a nivel nanométrico difieren de las partículas más grandes de igual composición química, estas tienen una mayor reactividad química y pueden ser más bioactivas que las partículas más grandes, por su dimensión tienen mejor

acceso a cualquier cuerpo y tienen probabilidad de entrar en células, tejidos y órganos (Lugo-Medina *et al.*, 2010). Así, se quiere determinar las diferentes concentraciones y métodos de elaboración para evidenciar la actividad antibacteriana del extracto de aceite de orégano emulsionándolo, minimizando riesgos de toxicidad e impactos en el medio ambiente.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo General

Determinar cuál es la actividad antibacteriana del extracto acuoso de aceite de orégano (*Origanum vulgare*) emulsionado en mastitis bovina en el centro norte de Manabí Ecuador.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Establecer el método indicado para la elaboración de una emulsión que incremente la acción antibacteriana del extracto de orégano.
- Comparar concentraciones (12 y 14 %) de componentes fenólicos del extracto acuoso emulsionado para la actividad antibacteriana en mastitis bovina.
- Determinar la actividad antibacteriana del extracto emulsionado mediante la observación de UFC/ml de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y conteo de células somáticas.
- Estimar la concentración en porcentajes (%) del extracto de orégano obtenido mediante destilación con arrastre de vapor de agua, por espectrofotometría UV visible formando un cromóforo.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Marco Filosófico o Epistemológico de la Investigación

2.1.1. Ambiente epistemológico

Es un suceso del discernimiento y comprensión que averigua el espacio de sabiduría, jamás el regreso a un origen de donde empieza el hombre con su carga de lenguaje; es el eterno regreso de una meditación referente a lo ya pensado, que navega por océanos de saberes desterrados, vertidos al mar en la conquista de horizontes epistémicos por el pensamiento metafísico y la lógica científica (Leff, 2007).

El anterior autor prosigue, el ambiente no es la relación, sino la complejidad del mundo; es un estar al corriente de las formas de apropiación del mundo y del entorno a través de los idilios de poder que se han suscrito en las formas dominantes del conocimiento y, desde allí parte el errante camino por territorios confinados del área de las ciencias, para bosquejar, vislumbrar y dar su parte al nombre propio del saber ambiental. Entonces, nuestro mundo está diseñado por una conspiración de idilios entre la raza humana y el ambiente, mediante su existencia, tendencia y acción (Capra, 1993), estas relaciones bastantes interiorizadas, evolucionan de acuerdo con procesos de conciliación a los continuos cambios presentados en condiciones naturales (Acot, 2005). Según Hurtado y Rivera (2006) la epistemología como hipótesis de la intuición resulta necesaria e indispensable en la tesis de posgrado, porque se respalda a su vez como pedestal filosófico, necesario para la defensa del prototipo que se plantea.

La epistemología ambiental reconoce los diferentes espacios, e interpretaciones crónicas del entorno y sus conveniencias de retroacción (Morin, 2003). Se podría entender como igual a conexión, involucrando al medio ambiente natural por sobre su otra dimensión, en sus disímiles conversiones y evoluciones. De ahí el desconcierto existente cuando se contrastan ambiente y conexión, pues si por el contrario vislumbramos el entorno de una manera confusa, se llega al resultado

de la inseparable química entre el ambiente natural y el hombre (Leff, 2000a).

Es puntual enfatizar que los conflictos ambientales son tan sólo una expresión de los aprietos del hombre, e involucra la inhabilidad de afrontar efectivamente los desafíos que se les muestran a nuestra raza y a la civilización del occidente Dyson (1985) y Gadamer (1993), en específico frente al cambio peculiar del clima y la pérdida de morada en el mundo (Lovelock, 2007) que forja el cataclismo del patrimonio natural. La restricción de la intuición del hombre, como lo advirtió Nicolás de Cusa (Flesh, 2000) reside en el hecho de que se desconoce cada vez más de este, a medida que se atesora aquél; y sólo así prospera verdaderamente éste (Popper, 1980).

En este marco epistemológico, que tiene como objeto de estudio a la investigación científica y a su producto que es el conocimiento científico y en conexión con lo mencionado, la extracción mediante arrastre de vapor de agua del extracto de orégano *Origanum vulgare* y su ulterior emulsión con emulsificantes inocuos, para evitar el uso muy común de antimicrobianos, capaces de generar resistencias bacterianas en la mastitis bovina, está relacionado con el conocimiento científico, particularmente con la biotecnología de productos naturales con propiedades antimicrobianas. Aunque el producto resultante de la investigación requiere de pruebas más contundentes que validen su eficacia y biodisponibilidad sustentable, no se puede obviar la importancia de estudios científicos de este tipo, porque persiguen criterios de sostenibilidad, ambiente, salud y seguridad; siendo una alternativa que contribuye a la solución de la problemática ambiental, dando valor agregado a los productos de plantas con propiedades medicinales como el orégano *Origanum vulgare*

2.2. Antecedentes de Investigación

2.2.1. La Mastitis bovina

Es una infección de la glándula mamaria y es la principal enfermedad para los rumiantes lácteos que disminuye la producción de leche y se asocia a menudo

con trastornos del ganado como la fiebre y la motilidad del rumen (Cardozo *et al.*, 2014). Bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* son las principales causas de mastitis bovina en muchos países. Las infecciones por *E. coli* causan mastitis clínica bovina, que a menudo se acompaña de síntomas clínicos graves incluyendo ubres calientes e inflamadas, fiebre y pérdida de apetito.

Además, *S. aureus* es reconocido como un patógeno responsable de la mastitis subclínica en el ganado bovino, causada por su colonización e internalización en células epiteliales y endoteliales de la glándula mamaria (Kim *et al.*, 2009). La mastitis del tipo subclínica, es una de las enfermedades más persistentes y ampliamente diseminadas de importancia para la higiene y calidad de la leche en el ganado lechero en todo el mundo (Coulon *et al.*, 2002) así mismo, influye en la producción de leche, modifica su composición y en los procesos para obtener sus derivados.

En las vacas, el ensayo para cuantificar a las células somáticas es un predictor útil de mastitis subclínica; por lo tanto, es un importante componente de la leche en cuanto a calidad, higiene y control de mastitis (Harmon, 1994). El aumento de CCS de la leche se asocia la calidad de la proteína, cambio en la composición de ácidos grasos, lactosa, concentración de iones y minerales, aumento de la actividad enzimática y un pH más alto de la leche cruda (Ma *et al.*, 2003). La mastitis clínica involucra bacterias de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*, también pueden ser originadas por otros microorganismos como *E. coli*, *Pseudomonas spp*, *Corynebacterium spp.* y por mohos y levaduras (Cotrino, 2003).

La mastitis clínica origina anomalías, inflamación, infección en la ubre o alteraciones en la leche (grumos) a simple vista (Cézar, 2004). Así también la mastitis ambiental que se puede definir de manera general como las infecciones intramamarias (IMI) causado por patógenos cuyo reservorio principal es el entorno en el que vive la vaca y cuartos mamarios no infectados (Smith *et al.*, 1985). Actualmente en los hatos lecheros los métodos para controlar estos

patógenos no son los más indicados, los estreptococos ambientales y sus parientes los enterococos son una causa importante de infección intramamaria (IMI) y mastitis clínica (Godiño y Bramley, 1989).

(Bastos *et al.*, 2011) evaluaron la concentración bactericida mínima del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) frente a bacterias aisladas de leche mastítica entre ellas *Staphylococcus aureus* 3.17% y *Escherichia coli* 0.35% la técnica utilizada fue de dilución en microplaca y en los resultados se comprobó la actividad *in vitro* del aceite de orégano frente a las bacterias relacionadas con la mastitis bovina. Se planteó como objetivo demostrar el efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano”, en cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* y se concluyó que el aceite esencial de las hojas tiene efecto antibacteriano *in vitro* sobre estas bacterias (Garay *et al.*, 2015).

El reservorio primario de *S. aureus* y *S. agalactiae* para la infección de los no infectados es el cuarto infectado, que termina en el pezón por estar expuestos a estos patógenos en gran parte durante el proceso de ordeño (Dodd *et al.*, 1977) y (Natzke, 1981) el principal problema de la mastitis clínica en granjas lecheras modernas y bien administradas es causado generalmente por los patógenos ambientales. El control de la mastitis ambiental requiere una disminución de la exposición de la punta o esfínter del pezón a los patógenos del entorno y, optimizar la resistencia de la vaca a la infección intramamaria, el costo de los antibióticos en el control de la mastitis ambiental se reduce considerablemente en comparación con su costo en el control de los patógenos contagiosos (Smith, 1993).

2.2.2. El Orégano.

El orégano *Origanum vulgare* es una planta que crece de manera silvestre en el entorno y contiene compuestos fenólicos con propiedades terapéuticas. La familia de plantas de los *labiates* son conocida por sus múltiples efectos farmacológicos, como las actividades analgésicas y antiinflamatorias (Khanna-

Bhatia, 2003), (Tanko *et al.*, 2008) y Guginsky *et al.* (2008) *Origanum vulgare* es parte de la familia *Labiatae* (Rechinger-Druk, 1982) y pertenece al género *Origanum*.

Nativa del área mediterránea, crece con éxito en el mundo durante todo el año; el aceite esencial de orégano tiene predominio de monoterpenos y sesquiterpenos con múltiples actividades biológicas tales como insecticidas, expectorantes, antimicrobiano, antifúngico, antiinflamatorio y antioxidante (Bussata *et al.*, 2007), (Cleff *et al.*, 2010) y Sahin *et al.* (2004.). Infusiones tanto de aceites esenciales como de extractos de plantas (ya sean acuosos o etanólico) se pueden usar en formulaciones antimicrobianas ya que tienen actividad contra cepas de bacterias gram positivas y negativas (Saeed –Tariq, 2009) y Nazia *et al.* (2007).

La hidrofobicidad de los aceites esenciales les permite estar incrustado en la célula y en las membranas mitocondriales y las rompe, haciendo más permeable tirar los contenidos de la célula (Rodriguez-Garcia, 2013) y (Burt, 2004). Diferentes condiciones como bajo pH, temperatura, o los niveles de oxígeno aumentarán la acción antibacteriana de los aceites esenciales, posiblemente a la presencia de compuestos fenólicos como el carvacrol y el timol (Mehmet *et al.* 2013), (Christos *et al.*, 2011), (Marrelli *et al.*, 2015) y Sokmen *et al.* (2004). Estos productos que se encuentran en vegetales, a veces se sintetizan en respuesta a presiones ecológicas como el ataque de patógenos e insectos, radiación UV y heridas (Klepacka *et al.*, 2011).

Dentro de los aceites esenciales de orégano se destacan los compuestos fenólicos, en bioquímica, los fenoles naturales se refieren al grupo funcional fenol que se encuentra en productos naturales, (Khoddami *et al.*, 2013., Amorati y Valgimigli, 2012., Robbins y Rebecca, 2003). Todo parece indicar que la actividad antibacteriana del extracto del orégano se debe a sus componentes carvacrol y timol, los cuales debido a su naturaleza hidrófoba sobre la capa lipídica de las membranas citoplasmáticas provocan la pérdida de su identidad y a través de ellas, fuga de material celular tales como iones, ATP y ácidos nucleicos. (Nostro,

2007)

El orégano (*Origanum vulgare*) es una planta perenne perteneciente a la familia Lamiaceae de 30 a 70 cm de altura, de olor agradable y sabor aromático algo amargo, procedente de los territorios del mediterráneo y, es también sembrado en Europa, Asia, Taiwán y América del Sur. Exterioriza como componente primordial un aceite esencial con más de 34 misceláneos activos, de los cuales los polifenoles como el carvacrol, timol, alfa terpeno y p. cimeno, consiguen entre 80.2 y 98 % de la estructura del aceite (Albado *et al.*, 2001). Existen diversas ilustraciones sobre la actividad antibacteriana e insecticida de extractos de *Origanum vulgare* (Arcila *et al.*, 2004).

Estos compuestos tienen la destreza de alterar la permeabilidad de la célula, de deteriorar las membranas citoplasmáticas y obstruir el sistema de generación de energía celular (ATP), finalmente llevar a la muerte celular (Rivera *et al.*, 2015).

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales se debe a su capacidad para descomponer la pared celular bacteriana y, por lo tanto, da como resultado la destrucción de las células (Ghosh *et al.*, 2012). Estos están formados por una mezcla compleja de compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, producidos por plantas aromáticas como metabolitos secundarios y con aromas individuales; se obtienen mediante técnicas de extracción, como la destilación, presión en frío o maceración.

Los hallazgos, indican que existen numerosos estudios sobre la actividad antimicrobiana de diversos especímenes de oréganos. Estudios efectuados, determinan que aceites esenciales del género *Origanum*, presentan actividad contra bacterias que tiñen de rosado la tinción de Gram, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las que tiñen de color azul oscuro a violeta la tinción de Gram, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Algiannis, 2001)

En ensayos cualitativos del aceite de orégano que crece en forma rústica en el campo, se ha encontrado predominantemente la presencia de carvacrol y timol, estos componentes junto a los monoterpenos hidrocarburos γ terpineno y p-cimeno, los cuales son precursores biológicos del carvacrol y timol, estos cuatro compuestos constituyen entre el 80% y 90% de la composición total de aceite esencial de orégano (Kokkini *et al.*, 1997). Los métodos convencionales más utilizados para la extracción de aceites esenciales son el uso de solventes y la destilación con arrastre de vapor, no obstante, esta última tiene sus ventajas, entre las más importantes se encuentran, (Bandoni, 2002):

1. El vapor de agua es relativamente barato comparado con otros solventes orgánicos, lo cual disminuye los gastos de extracción.
2. Cuando se trabaja con la temperatura y presión adecuada del vapor en extracción se asegura que no exista recalentamientos de los aceites esenciales
3. Los dispositivos son baratos y accesibles en el mercado.
4. En símil con la hidrodestilación, este tipo de extracción admite usar toda la capacidad de la torre.
5. Se obtienen aceites esenciales más mayor pureza, en relación a los obtenidos con solventes orgánicos.

2.2.3. Emulsión de aceites esenciales

Los extractos acuosos de plantas obtenidos por destilación con arrastre de vapor que contienen este tipo de aceites esenciales son muy inestables y se degradan o volatilizan muy fácilmente, para preservarlos se está empleando emulsiones, que consiste en al menos dos líquidos inmiscibles (generalmente aceite y agua), en la que uno de los líquidos se dispersa en forma de pequeñas gotas esféricas en el otro (Dickinson, 1992a) (Friberg *et al.*, 2004) y McClements, (2005). Uno de los constituyentes de los aceites esenciales son los compuestos fenólicos, estos

compuestos consisten químicamente en terpenos (mono, sesqui- y diterpenos), alcoholes, ácidos, ésteres, epóxidos, aldehídos, cetonas, aminas y sulfidas (Rivera *et al.*, 2015) y Salvia-Trujillo *et al.* (2015). La protección por medio de emulsiones puede reducir su oxidación y preservar sus atributos utilizables (Watson *et al.*, 2013) y se presentan como sistemas transportadores, micro encapsulantes y preservadores de agregados bioactivos susceptibles a procesos de oxidación, procedimientos de liberación inspeccionada, innovación de las propiedades reológicas y caracteres organolépticos (Kuentz, 2011 y McClements, 2010). De acuerdo con el tamaño de gota, se consideran macro emulsiones aquellas que presentan dimensiones mayores a 500 nm (0.5 micra) y, se denominan nanoemulsiones a aquellas cuyo tamaño es inferior a 500 nm. La emulsión se logra con el uso de tensoactivos, su mecanismo de acción reside en conseguir que estos se sitúen en la interfase aceite y agua y debido a su distribución química, reducen la tensión interfacial y suministran la formación del sistema disperso de interés, como es la emulsión, (Dickinson, 2009; Guzey y McClements, 2006). En las emulsiones aceite en agua (denominada O/W), el contenido del componente acuoso es generalmente mayor a 31%, llegando tener hasta un 80% de agua; en este tipo de emulsión la fase discontinua es un aceite y la fase continua es agua (Cubero, 2002). Estos procesos a los aceites esenciales les ayudan a mejorar sus propiedades bioactivas, la reducción en el tamaño de partícula no sólo mejora el transporte de moléculas activas a través de las membranas biológicas, sino que además aumenta la relación de superficie área/volumen, lo que conduce a una funcionalidad mejorada (Salvia-Trujillo *et al.*, 2015).

Entre los aceites esenciales más comunes que han sido probados con propiedades antimicrobianas contra los microorganismos del deterioro, los principales son: aceite de cilantro, aceite de orégano, aceite de romero, aceite de salvia, aceite de clavo y aceite de tomillo (Burt, 2004). Se estima que la actividad antimicrobiana de estos aceites es por su habilidad a la hora de penetrar en el interior de la célula a través de la membrana y, desempeñar una actividad inhibitoria en sus propiedades funcionales y lipofílicas (Rivera *et al.*, 2015).

2.3. Bases Teóricas

2.3.1. Aceite Esencial de Orégano AEO

Generalidades. - Los extractos acuosos de aceites esenciales son composiciones complejas de compuestos químicos, normalmente líquidos oleosos, que en general son los responsables del olor de ciertas plantas, una particularidad usual de estas mezclas orgánicas es su volatilidad, por eso se obtienen por extracción en corriente de vapor de agua. (Arcila-Lozano *et al.*, 2004).

El orégano incluye cerca de 30 diferentes especies de plantas de las frecuentemente conocidas: el heleno (*Origanum vulgare ssp. hirtum*), el ibérico (*Coridothymus capitatus*), en los turcos (*Origanum onites L.*) y el mexicano de la especie *Lippia* nativo de América tropical, subtropical y África. Este vegetal se identifica por desarrollarse en entornos marginales e intervenir favorablemente evitando la erosión del suelo por las características de sus raíces, por lo que bien podría ser utilizado para la conservación del mismo (Leto y Salomone, 1996). El análisis dilucida hasta 56 compuestos en los aceites esenciales de orégano, con discrepancias en cantidades demostrativas en solo los fenoles isoméricos, el 3-isopropil-5-metilfenol (0.1- 56.6 %) o fenol no cristalizable y el 2-isopropil-4-metilfenol (7,9–53.6 %) o fenol cristalizable; conteniendo sus antecesores biosintéticos, y terpineno y el p. cimeno (Ruso *et al.*, 1988).

A plantas de *L. graveolens* Kunth procedentes de Jalisco se determinó un adjunto de timol mayor al 30% (Uribe-Hernández, 1992). En contraste, (Vernin *et al.*, 2001) hallaron 45 compuestos que crean entre 92-93 % del aceite esencial de *Lippia graveolens* HBK cuyos compuestos importantes fueron: 3-isopropil-5-metilfenol 71% y el 2-isopropil-4-metilfenol 5%.

Entonces se aprecian tantas composiciones en el aceite esencial de orégano dependiendo del tipo y producción natural con el que se obtenga, posiblemente porque la regulación en la obtención de aceites esenciales está íntimamente

relacionada a la fisiología del vegetal y estriba en el estado anabólico y catabólico de la misma (Sangwan *et al.*, 2001) así, como su ajuste al medio ambiente. De manera general y de un nivel fructífero se sugiere que un buen aceite esencial de orégano, con excelente rendimiento y buena obtención en el contexto multifuncional, es aquel que contiene al menos 55 % de 3-isopropil-5-metilfenol más 2-isopropil-4-metilfenol y una relación entre ambos isómeros superior a 10 (Nitsas, 2000).

No obstante, a pesar de que estos metabolitos tienen mecanismos que evitan la oxidación y la actividad de bacterias, se ha enfatizado más al carvacrol, posiblemente a que la mayoría de los estudios se han dirigido a la caracterización de diferentes variedades, cuyo componente principal es este compuesto en mención y, a los descubrimientos prácticos con las diferentes especies de orégano.

2.3.2. Características Antibacterianas y Antifúngicas

Existen vegetales con usos medicinales y nutraceuticos que demuestran tener actividades contra bacterias, hongos y virus y son objeto de evaluaciones mediante estudios *in vitro* e *in vivo*. Investigaciones revelan que los variados efectos de los aceites esenciales de orégano se deben a sus dos metabolitos secundarios más importantes, los isómeros: carvacrol y el timol, estos presentan un efecto antibacterial contra una vasta variedad de microorganismos; no así ocurre con los precursores γ terpineno y el p. cimeno (Afroditi *et al.*, 1996).

En discrepancia (Nitsas, 2000) asevera, que la presencia de γ terpineno y el p. cimeno en los aceites esenciales de orégano contribuyen a un efecto de combinación e interacción benéfica sobre la actividad antimicrobiana del aceite en general. Asimismo, se han efectuado ilustraciones sobre las características antifúngicas y antioxidantes de aceites esenciales, como los extractos de orégano, *Origanum vulgare* L.; tomillo, *Thymus vulgaris* L.; romero, *Rosmarinus officinalis* L.; cilantro *Coriandrum sativum* L.; cebolla, *Allium cepa* L.; ajo, *Allium sativum* L. y canela, *Cinnamomum zeylanicum* (Fernández *et al.*, 2007) Ayala y

Zavala *et al.* (2004).

Algunos antecedentes de la certeza de estos componentes químicos pueden ser obtenidas a partir de la concentración inhibitoria mínima, técnica empleada para determinar la concentración más baja que impida el crecimiento visible del microorganismo, estos métodos son más aplicables en bacterias (López- Malo *et al.*, 2005) y Wiegand *et al.* (2008).

2.3.3. Metodologías para valorar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales

La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha admitido este procedimiento a manera de norma para el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos, Turker y Usta (2008). El procedimiento de extensión del medio agarizado en disco, es el método técnico más comúnmente esgrimido para efectuar ensayos antimicrobianos de aceites esenciales y extractos.

2.3.4. Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida

La concentración inhibitoria mínima supone la acción antibacteriana de un agente en específico, a través de la mínima concentración de un antibiótico que advierte el desarrollo y elimina a un germen nocivo en particular. Un disco de papel goteado uniformemente con el antimicrobiano se ubica en el área inoculada de una caja Petri de agar y tras el aumento se deduce el círculo de alejamiento microbiano. La concentración mínima bactericida mide la capacidad del agente antimicrobiano para inhabilitar el crecimiento del microorganismo, en ella el método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana, es manipulado para determinarla y es ajustable también a la concentración mínima inhibitoria (Isada *et al.*, 2001) y McDermontt *et al.* (2005).

Generalmente los aceites esenciales poseen diferente actividad antimicrobiana, lo cual es generalmente medida por la concentración inhibitoria mínima (Reyes *et al.*, 2014). Investigadores estiman que esta depende principalmente de tres factores: su carácter hidrófobo e hidrófilo, sus componentes químicos y el tipo

de microorganismo que debe atacar (Kalenka y Kucnika (2003) Holley y Patel (2005) Fisher y Phillips (2008) y Solorzano-Santos y Miranda-Novales (2012) corroborando lo anterior, ellos mismo señalan que el fundamento del mecanismo de operación de los aceites esenciales depende de sus características hidrofílica e hidrofóbica, por eso ostentan esa capacidad de alterar y deteriorar la membrana celular lipídica de las bacterias, lo cual sufre la desnaturalización de los polipéptidos y destrucción de las paredes celulares, volviéndolas permeables y capaz a rompimientos, lisis celular y apoptosis.

Resultados de investigaciones señalan que los compuestos fenólicos serían los principales responsables de la actividad antimicrobiana (Delaquis *et al.*, 2002) Holley y Patel (2005). El aceite de orégano que posee estos componentes puede eliminar o puede sitiar el incremento de cualquier moho, así como también inhibir el crecimiento de la totalidad de microorganismos. En este grupo los isómeros carvacol y timol, son los más eficaces y estos ejercen acciones conjuntas con efectos sinérgicos que incrementan sus propiedades antisépticas (Gallegos, 2003) Gilling *et al.*, (2014a) examinaron los efectos del aceite de orégano y su componente antimicrobiano primario, el carvacrol, contra el norovirus morino MNV-1 causó reducciones estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) en la infectividad del cultivo celular dentro de los 15 minutos de exposición ($\sim 1.0\text{-log}_{10}$). A pesar de esto, la infectividad del MNV-1 se mantuvo estable con el tiempo con la exposición al aceite de orégano (1.07-log_{10} después de 24 h), mientras que el carvacrol fue mucho más efectivo, produciendo reducciones de hasta 3.87-log_{10} dentro de 1 h de exposición y $> 4.15\text{-log}_{10}$ después de 3 h. El aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens*) inhibió HSV-1 (cepas sensibles y resistentes al aciclovir), HRSV y BHV-2, tanto antes como después de la inoculación del virus, mientras que el carvacrol (su componente activo primario) causó la inhibición solo después de la inoculación del virus (Pilau *et al.*, 2011).

Se determinó en investigaciones de la universidad Nacional Del Callao la CMI de los extractos de orégano sobre diferentes colonias de bacterias aisladas de

alimento, por el discernimiento de sus características antifúngicas y antibacterianas que ayudan al control de padecimientos de origen microbiano en el hombre, animales y plantas. Se concluyó que la concentración mínima inhibitoria de los extractos de orégano para *Escherichia Coli* es de 2.34375 uL / ml. y para *Staphylococcus aureus* es de 2.3475 ul/ml. (Toledo, 2004).

2.3.5. Toxicidad de los aceites esenciales

Los aceites esenciales químicamente son hidrocarburos alicíclicos-aromáticos y combinados oxigenados derivados de ellos (alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres) que le dan el aroma y olor característico de la esencia, muchos son de origen terpenoide y pocos aromáticos, benzenoides mezclados con terpenos (Háuad, 2010). El aceite de orégano se estima que no es tóxico si se utiliza en su estado natural, dosis apropiadas y durante tiempos moderados, no obstante, podrían resultar descritos como tóxicos al ser consumidos en dosis altas, si bien es cierto que se trata de una planta intensamente beneficiosa, están pueden presentar efectos adversos secundarios asociados al uso del orégano, no obstante, estos suelen ser leves y muy poco deletéreos, entonces es menester moderar su consumo en mujeres en estado de gestación y en etapas de lactancia, así como en menores de edad. Se emplean como promotores de crecimiento en animales mamíferos domésticos, aves, cerdos, y bovinos. (Tekippe *et al.* 2011) determinaron que al suministrar *Origanum vulgare* (500 g/día) no afectó la obtención de leche, asimismo, Hristov *et al.* (2013) reportaron que al utilizar orégano (250-750 g por vaca al día) no perturba la elaboración, composición y perfil de ácidos grasos de la leche de vaca, pero sí reduce la cantidad de metano metabolizado. Por regla general, los extractos naturales de aceites esenciales por vía oral tienen una toxicidad frágil o muy débil: la mayoría de los que se emplean corrientemente tienen una dosis letal ⁵⁰, vislumbrada en alrededor de 2 y 5 g por Kg de peso, anís, eucalipto, clavo, canela etc., son raros aquellos que tienen una dosis letal ⁵⁰ inferior a 2 g por Kg. (Burbano, 1998).

2.3.6. Emulsionantes

Una emulsión se define como un sistema agregado por dos líquidos inmiscibles, uno de los cuales se dispersa en forma de gota (la fase dispersa o interna) a través del otro (la fase continua o externa) (Jafari *et al.*, 2008). La sustancia que conforma las gotas de una emulsión se denomina fase dispersa, discontinua o interna, mientras que la sustancia que compone el líquido circundante se llama fase continua o externa (McClements, 2005b). Una emulsión de aceite en agua contiene pequeñas gotas de aceite dispersas dentro de una fase acuosa continua, cada una de ellas rodeada por una capa protectora de moléculas emulsionantes (Driscoll, 2007). Otra propiedad de las emulsiones es su efecto o interacción hidrofóbica, que es una predisposición relativa de moléculas no polares de estar juntas en soluciones acuosas, esto por la incapacidad que poseen las moléculas lipídicas para formar uniones mediante puentes de hidrógeno, por lo que éstas se mantienen unidas entre sí por interacciones dipolo-dipolo inducido, (Southall *et al.*, 2002). Este tipo de productos son ampliamente utilizadas en una gran variedad de aplicaciones debido a su capacidad para transportar o solubilizar las sustancias hidrófobas en una fase continua de agua (Leal-Calderón *et al.*, 2007a). Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables de dos líquidos inmiscibles generalmente agua y aceite que por diferentes mecanismos tienen tendencia a separarse en las fases que las componen a través del tiempo. Debido a esto, es necesario el uso de emulgentes que brinde una estabilidad cinética por períodos razonables de tiempo (Rao, 1999) (Choi *et al.* 2007) y De Hoog (2011).

Un emulgente es una molécula anfifílica que tiene una cabeza hidrofílica afín al agua y una cola hidrofóbica afín a la grasa. Los emulsificantes suelen ser compuestos ambifílicos (De Castro Santana *et al.*, 2012) es decir, que son paralelamente hidro y lipofílicos; o según sea su similitud por compuestos polares y no polares respectivamente, guardando en ambos casos su capacidad de disolverse en ambos tipos de disolventes Kralova y Sjoblon (2009).

2.3.7. Formación de Emulsiones

Para la formación de emulsiones se debe efectuar un proceso de la conversión de la fase dispersa a gotas de pequeño tamaño y su distribución homogénea en la fase continua (Remington, 2003).

En la industria alimentaria esto se puede lograr utilizando un mezclador que produzca un corte, altas presiones, un molino coloidal, un microfluidizador o un homogeneizador ultrasónico, entre otros (Mc Clements, 2007).

2.3.7.1. Mezcladores mecánicos

Un sistema de homogenización por rotación mecánica se utiliza para producir emulsiones, utilizando líquidos con viscosidad que va de media a alta; los líquidos se alimentan de manera gruesa o en forma de fase separadas y pasan a través de los discos rotatorios y estáticos, formando la emulsión (McClements, 2005) y Mahdi (2009).

2.3.7.2. Molinos coloidales

Estos forman la emulsión al pasar los líquidos entre el rotor y el estator, son sometidos a una acción de corte que produce una dispersión fina y de tamaño uniforme, donde el tamaño de las gotas disminuye a medida que aumenta el tiempo de homogenización y la intensidad de ésta (Remington, 2003).

2.3.7.3. Homogeneizadores de alta presión o de rotación mecánica

La homogeneidad y la heterogeneidad están relacionados con la uniformidad o falta de ella en una sustancia, la primera es uniforme en carácter y composición, la segunda carece de esa cualidad. Así, una sustancia puede ser homogénea en una mayor escala, en comparación con ser heterogéneo en menor escala dentro de la misma sustancia (Dhankhar, 2014). Estos métodos de agitación son utilizados para lograr una mayor reducción en el tamaño de las gotas, así como para lograr una mayor uniformidad y mejor estabilidad (Mahdi, 2009).

2.3.7.4. Dispositivos ultrasónicos

El ultrasonido son ondas acústicas cuya frecuencia es inaudible al oído humano. El espectro acústico audible va desde 16 Hz hasta 16 kHz y dentro del rango la potencia disponible varía inversamente con la frecuencia; solo ultrasonidos potentes 16-100 kHz y en menor medida 100 kHz-1 MHz), pueden interactuar con la materia, produciendo cambios físicos y químicos, esencialmente por fenómenos de cavitación (Canselier *et al.*, 2012), siendo esta el principal fenómeno responsable de efectos inducidos por ultrasonidos. La emulsión se genera mediante vibraciones ultrasónicas, ya que se producen ondas de alta frecuencia que fluyen a través del líquido. En los medios líquidos su mecanismo de acción funciona generando burbujas de cavitación, debido a los diferenciales de presión durante la propagación de la onda acústica (Servant *et al.*, 2001). El ultrasonido es un método eficaz y respetuoso con el medio ambiente para preparar emulsiones de aceite en agua (Gou *et al.*, 2014). Diversos trabajos de investigación hasta el momento, indican que estos dispositivos producen emulsiones estables con líquidos de baja viscosidad. Sin embargo, este no es método práctico para la elaboración de emulsiones a gran escala (Remington, 2003).

2.3.8. Surfactantes

Los surfactantes son compuestos anfifílicos capacitados para reducir la tensión superficial del medio en el que se hallan solubilizados, así como la tensión interfacial en la interfase de fluidos inmiscibles (IUPAC, 2001). También llamados agentes tensioactivos, son moléculas anfifílicas que disminuyen la tensión en la interfase (Gautam y Tyagi, 2006), estos tienen una dupla de similitud química, esto por su organización de tipo polar y apolar o hidrofílica e hidrófoba.

También llamados emulsificantes son compuestos que ostentan grupos con solubilidad disímil, por un lado, una cadena hidrocarbonada soluble en disolventes no polares citado grupo liofóbico o hidrófobo y un grupo funcional que tiene una afinidad fuerte hacia disolventes polares, este grupo es llamado liofílico

o hidrófilo (Myers, 1991). La cabeza polar o hidrofílica, funciones de carácter iónico o no iónico formada por heteroátomos como O, S, N y P, que admiten un elevado nivel de disolución en disolventes polares como el agua; la parte apolar o hidrófoba, ordinariamente es una sucesión hidrocarburos de tipo alquil o alquilbenceno, con apariencia en algunos casos, de átomos de un halógeno u oxígeno, la cual tiene solubilidad en disolventes orgánicos apolares, especialmente derivados del petróleo y compuestos de naturaleza oleosa, Marquez (1999) y Aguirre (2013).

Estos dos grupos presentes, visiblemente diferenciados en sus átomos, les confieren desiguales propiedades, como reducir la tensión superficial del agua, la formación de monocapas de esparcimiento o de impregnación en la interfase agua y aire, la formación de emulsiones, microemulsiones y la formación de partículas coloidales, entre otros (Ríos, 2014). Es por esta razón que las moléculas de los tensioactivos se sitúan en la interfase de fluidos como son los sistemas aceite con agua y aire con agua (Stoyanov *et al.*, 2003).

Todas estas propiedades vuelven muy versátiles a estos compuestos y con muchas aplicaciones en alimentos, medicamentos y regeneradores del medio ambiente. Éstos se identifican por acrecentar la solubilidad, inestabilidad, biodisponibilidad y subsecuente biodegradación de compuestos orgánicos insolubles en agua (Singh *et al.*, 2002). Los tensioactivos provocan efectos nocivos sobre las membranas celulares y las proteínas bacterianas debido a la actividad superficial que presentan (Hartmann, 1996) y como consecuencia de estos efectos pueden ser inhibidores de bacterias, Schwuger y Barnitk (1980).

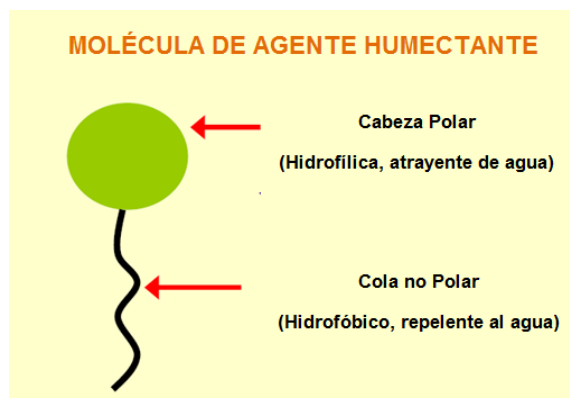


Figura 2.1. Esquema de la molécula tensioactiva con parte polar (hidrofílica) atrayente del agua y no polar (hidrofóbica) adherida a la capa orgánica hidrofóbica de la arena. Dr. Keith J. Karnok, University of Georgia.
Fuente: Schwuger, (1980)

2.3.9. Clasificación de los Surfactantes

Los surfactantes son catalogados comercialmente de acuerdo con su aplicación, no obstante, sus propiedades y su uso dependen también del ambiente fisicoquímico. Se los encasilla de acuerdo con la naturaleza del grupo hidrofílico o más exactamente según la forma como se disgregan en el agua. En función del carácter iónico del grupo hidrófilo, los tensoactivos se dividen en cuatro grandes familias:

2.3.9.1. Tensioactivos aniónicos

Estos ostentan funciones orgánicas que se disocian en solvente acuosos, suscitando aniones orgánicos, responsables de disminuir la tensión superficial. Contienen frecuentemente grupos solubles, sulfatos y sulfonatos de sodio y son muy utilizados en fórmulas detergentes en polvo para lavado de indumentarias y en productos líquidos para uso en lavavajillas (Salager, 2002).

2.3.9.2. Tensioactivos catiónicos.

Estos tienen funciones orgánicas que se disocian en soluciones acuosas produciendo cationes orgánicos, comprometidos con la actividad superficial. Son especialmente elementos de amonio cuaternario y presentan la ventaja de que son relacionados con los tensioactivos aniónicos y los que pueden actuar

como ácido o como base y la desventaja de ser incompatibles con los tensioactivos catiónicos. Igualmente, su característica detergente y su biodegradabilidad es baja y su precio económico es más elevado que el de los tensioactivos no iónicos. Generalmente se utilizan como agentes emulsionantes a pH inferiores a 7, además, muestran propiedades que suavizan y desinfectan, (Salager, 2002).

2.3.9.3. Tensioactivos no iónicos

En solución acuosa no presentan ionización de átomos y tienen grupos funcionales que son afín y solubles en agua. Unos proceden de la condensación de polímeros de óxido de etileno con compuestos fenólicos o grasos, muy compatibles con la mayoría de tensioactivos de desarrollada y variada aplicación. En general exhiben bajo poder espumoso y pueden ser productos líquidos o viscosos (Salager, 2002).

2.3.9.4. Tensioactivos anfotéricos.

Poseen grupos funcionales que consiguen la ionización en solución acuosa, otorgando según los contextos del medio circundante, propiedades de poseer moléculas con cargas positivas y negativas. No son compatibles con detergentes no alcalinos, poseen buen nivel de espumación y pequeña irritabilidad epidérmica y ocular. Resultan muy aplicables en formulaciones para elaboración de champú (Salager, 2002). Este tipo de surfactantes son compatibles con todos los tipos de tensioactivos (Sibila, 2008).

En el grupo de los surfactantes no iónicos está el Tween 80 que pertenece a la familia de los polisorbatos. Químicamente, los polisorbatos se derivan del sorbitano etoxilado, un derivado del sorbitol que se esterifica con ácidos grasos. Tween 80 es hidrofílico (HLB: 15) y es nombre propietario de CRODA TM (fabricante de productos químicos especiales) y sus valores numéricos son específicos, derivado del ácido graso oleico.

2.3.10. Micelas y asociación de micelas

En medios acuosos diluidos, el surfactante se localiza en el seno del líquido bajo la representación de solución molecular. A una explícita concentración en la cavidad de la disolución, las interacciones de moléculas apolares entre si se hacen más características que las acciones reciprocas de las cabezas polares con moléculas de agua, formando congregación espontánea de estas moléculas en solución, como consecuencia de los hidrófobos en un grado de organización del sistema o control entrópico así, se forjan disgregados de tamaño coloidal conocidos como micelas (Paula *et al.*, 1995). La llamada concentración micelar crítica (CMC), es la relación entre la cantidad de soluto y solvente de surfactante en que la fase acuosa se colma, así como la añadidura de más moléculas en este, provocando la formación de incorporados, denominados micelas. El valor de esta cuantificación es particular para cada surfactante, ya que estriba en la ordenación de la molécula en particular (Rosen, 2004).

2.3.10. Surfactantes tipo Alquil Fenol y Alcohol Polietoxilados

Los surfactantes del tipo no iónicos, tienen un uso estimable en formulaciones de detergentes líquidos, efectos farmacéuticos y cosméticos. La mayoría de los surfactantes no-iónicos del tipo poli éter se sintetizan adicionando óxido de etileno a las sustancias con un átomo de hidrógeno reactivo, como el alquilfenol (Shick, 1987). La etoxilación o polietoxilación es un proceso industrial químico en el que se añade óxido de etileno (Nombre IUPAC, 1,2-epoxietano) a alcoholes, aminas y fenoles para dar diferentes tensioactivos (mal llamados de la traducción literal del inglés, surfactantes). Se sintetizan en dos etapas: una, concentración de una molécula de óxido de etileno sobre los radicales fenol o alcohol para establecer el alquilfenol monoetoxilado y la otra, policondensación de óxido de etileno sobre el mono y polietoxilados con una rapidez de reacción autónomo del número de grupos de óxidos de etileno establecidos (Eduard *et al.*, 2007).

2.3.11. Sistema Surfactante – Agua – Aceite

Es de considerable importancia en la preparación de emulsiones, la proporción de sus componentes, ya que los sistemas surfactantes, agua y aceite son registrados por diferentes variables en función de la naturaleza de sus disgregados y de las cuantías en las cuales están presentes. La naturaleza y procedimiento del sistema estribara por factores físicos, especialmente aquellos que actúan durante su formulación, así como de factores fisicoquímicos; el influjo de estos últimos corresponde al resultado de las variables de formulación y de sus pertinentes concentraciones o composición. Las formulaciones que han tenido éxito en la industria son muy complejas y obtenidas por tanteo, implicando que la comprensión teórica se limite a algunos modelos muy simplificados que poco se asemejan con la realidad (Salager, 1998). Las formulaciones exteriorizan un conjunto de variables capaces de influir en las propiedades fisicoquímicas del sistema, estableciendo el proceder de fase y las características de los servicios logrados. Estas variables son clasificadas en tres grupos:

2.3.11.1. Variables de formulación.

Son afines con la naturaleza de formulación y composición de los constituyentes del sistema emulsionado. Intrínsecamente en las variables de proporción de sus componentes se consideran: salinidad, similitud y espécimen de surfactante (iónico, no iónico, valor del balance hidrofílico-lipofílico), índice de hidrogeno de la disolución y presencia de cosolventes (Salager *et al.*, 2001)

2.3.11.2. Variables de composición

La variable de composición se refiere a las proporciones relativas que se añaden de cada componente (Chuan *et al.*, 2014). Se deberá entonces representar el comportamiento de fase en función de la composición del sistema, en general sobre un diagrama ternario o cuaternario como el de la Figura 2.2, Salager y Antón (1991). Internamente en las variables de formulación existen la proporción

de grasa, agua y la concentración del tensioactivo (Salager *et al.* 2001).

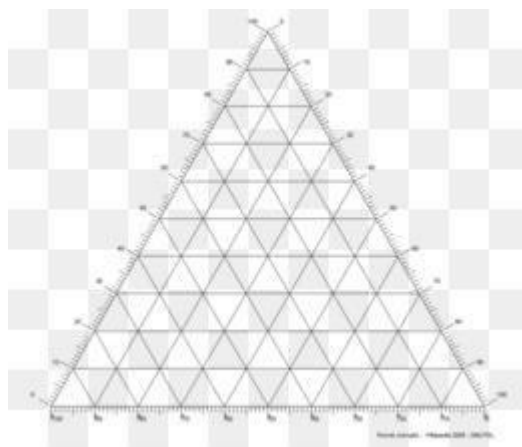


Figura 2.2. Esquema de las variables. **Fuente** Salager (2001)

2.3.11.3. Variables externas

También llamadas variables de misceláneos, contienen el rigor y lapso de agitación, el tipo y geometría del propulsor utilizado, además del procedimiento de composición (Salager *et al.* 2001). Se puede incluir además en este tipo de variables a los métodos de elaboración, si es de alta o baja energía, así como la temperatura.

2.3.12. Método de HLB (Balance Hidrofílico – Lipofílico)

Según Griffin (1949) el balance hidrófilo-lipófilo o HLB es el cálculo del tamaño y fuerza entre la parte polar y la porción apolar de una molécula tensioactiva, esboza la presencia de una relación entre la característica del surfactante y sus propiedades como agente tensioactivo y emulsionante. Es un promedio cercano para definir exclusivamente al tensioactivo y está establecido en un procedimiento práctico, que radica en imputar un determinado número de HBL a los surfactantes, en un nivel de 1 a 20, a partir de datos concernientes a la estabilidad de las fases en una emulsión (Griffin, 1954). En la actualidad existen más métodos para determinar el equilibrio hidrofílico lipofílico, no obstante, después de unos 65 años, el método de Griffin, es el más utilizado para predecir las propiedades de tensioactivos no iónicos (Pasqualie, 2009).

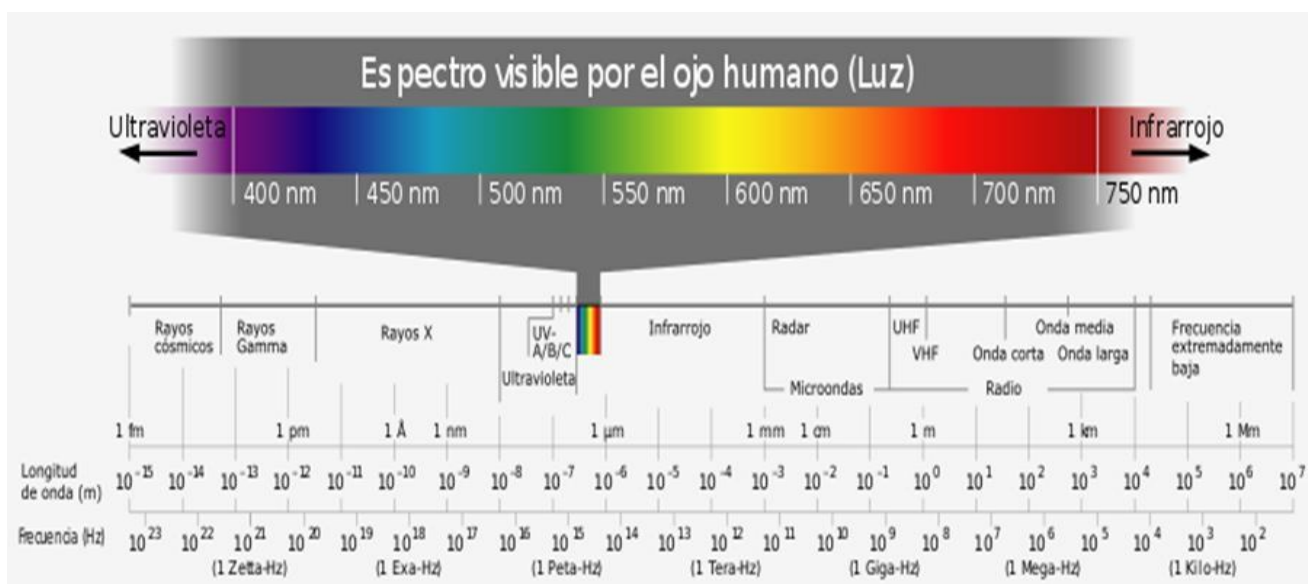
El prototipo de emulsión es dependiente del balance entre las características polares y apolares del agente surfactante. Un emulsionante con un valor de balance hidrófilo-lipófilo menor de 7 solubiliza la fase hidrófoba y favorece una emulsión agua en grasa, aquellos que posean un HLB por encima de 7, solubiliza la fase acuosa y la emulsión será grasa en agua (Wilkinson y Moore, 1990). Los emulsificantes con un valor superior a 7 se dispersarán en la fase acuosa y originarán la formación de emulsiones grasa en agua, Alfonso, (2003) y Ippincott (2006). El método ha sido motivo de discusión durante mucho tiempo, eternizando este concepto, se propone establecer el HLB de un emulsionante según la ecuación (1) basándose en la asignación de un valor numérico a los compuestos químicos que componen a él emulsionante (Davies, 1959).

Balance hidrófilo-lipófilo = $7 + \sum \text{número de grupo hidrófilo} - \sum \text{número de grupo lipófilo}$ (1).

2.3.12. Espectrofotometría UV visible

Es una habilidad metódica que admite establecer la concentración de compuestos en disolución, en donde las moléculas absorben radiaciones en un campo electromagnético y a su vez, la cuantía de radiación absorbida estriba en la representación lineal de la concentración de analitos. Para concebir este tipo de medidas se utiliza un espectrofotómetro, en el que se obtiene seleccionando la longitud de onda (λ) de la luz que pasa por una solución, calculándose la intensidad de luz absorbida por la disolución (Nieves *et al.*, 2004). La espectroscopia es una ciencia que investiga la interacción de la luz con la materia, esta puede ser emitida, transmitida, reflejada, absorbida; entonces cuando una sustancia es iluminada se puede calcular cuanta emisión de luz ha sido reflejada o transmitida, entonces podemos medir cuanta luz fue absorbida y cuál es la cantidad que interactuó con el objeto, (Arenas y López, 2004). Los espectrofotómetros de luz ultravioleta son instrumentos que miden en función de la intensidad de dos haces de luz en la región invisible, sus determinaciones espectrofotométricas se utilizan para determinar la cantidad de

especies moleculares que absorben radiaciones y utiliza radiación electromagnética (luz) de las regiones: visible, UV a una longitud de onda entre 180 nm y 780 nm, es así como la radiación absorbida por las moléculas desde esta región del espectro induce transiciones electrónicas que pueden ser cuantificadas (U. de Alicante, 1996-2019). La espectrofotometría UV vis resulta una opción fácil para cualquier laboratorio, no requiere de cuantiosos recursos, lo cual no siempre ocurre con métodos de análisis en donde se emplean cromatografía líquida de alta resolución y de gases. Además, es una técnica de relativo bajo costo, precisa, sensible y aplicable a moléculas de distinta naturaleza y estados de agregación, Brunatti y Martín (2010). Estas técnicas que utilizan la luz para medir concentraciones químicas (Harris, 2001) a determinada longitud de onda, sirven para cuantificar componentes de una muestra. En espectrofotometría de absorbancia se utilizan las regiones del ultravioleta de



195-400 nm y el visible 400-780 nm. Figura 3.

Figura 2.3. Espectro visible que el ojo humano puede percibir.

Autor: Horst, con algunas modificaciones de Jailbirdico, 2006.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación de la Investigación

Los datos meteorológicos presentados en este documento son tomados en la Estación Meteorológica de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí “Manuel Félix López” (ESPAM MFL), ubicada en el sitio El Limón, provincia de Manabí, Ecuador, situado geográficamente entre las coordenadas 0° 49’ 23” Latitud Sur; 80° 11’ 01” Longitud Oeste y una altitud de 15 msnm.

Años	Humedad Relativa (%)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Temperatura media (°C)	Oscilación Térmica °C	Evaporación (mm)	Precipitación (mm)	Recorrido del viento (km/hora)	Heliofania (Horas sol)
2011	80,9	30,7	21,5	25,6	9,3	1739,5	528	498,5	110,5
2012	82,9	30,4	22,0	25,6	8,4	1397,7	1639	547,7	98,6
2013	83,8	29,9	21,7	25,1	8,2	1341,4	962	632,4	85,6
2014	82,0	30,7	21,2	25,9	9,5	1269,6	777	555,3	77,1
2015	82,3	31,4	22,3	26,6	9,1	1323,7	993	519,0	94,6
2016	80,3	31,2	22,1	26,3	9,1	1291,1	953	583,8	93,2
2017	83,5	30,7	22,1	25,9	8,6	1207,7	1339	615,2	90,0
2018	81,4	30,7	21,4	25,7	9,3	1256,3	783	570,2	92,5
Media	82,1	30,7	21,8	25,8	8,9	1353,3	996,7	565,3	92,7

Cuadro 3.1. Ubicación de la Investigación.

Fuente. Estación meteorológica ESPAM MFL

3.2. Obtención del extracto emulsionado de orégano

En la obtención del extracto emulsionado de orégano se procede a realizar:

3.2.1. Recolección y extracción

Se recolectaron ramas con hojas de orégano del entorno y se seleccionaron las de mejor estado, en el laboratorio usando guantes se lavó con agua de pozo limpia de la llave y con agua destilada, luego se secó a temperatura ambiente interna de 25 - 30 grados centígrados. El extracto se obtuvo mediante el método de destilación con arrastre de vapor (Günther, 1948), los aceites esenciales están

constituidos químicamente por terpenos y fenilpropanoides, que son volátiles y arrastrados por vapor de agua (Molero *et al.*, 2006). Para el efecto se armó un destilador con un equipo de material de vidrio y caucho acoplado a una fuente térmica, armado y operado en el lugar, según el esquema de la figura 3.1. Una vez aislada la esencia, ésta destila a temperaturas muy inferiores a su punto de ebullición, influyendo favorablemente en la cantidad de agua presente, los componentes volátiles y el agua generados como vapores a temperaturas menores a su punto de ebullición, salen del destilador se enfrían en un refrigerante donde regresan a la fase líquida, agua y aceite esencial, finalmente se separan en un decantador o vaso florentino (García, 2014). Se obtuvo extracto acuoso del destilado y separo de la mayor cantidad de agua por diferencia de densidad, finalmente se almacenó en un matraz aforado ámbar con tapa en refrigeración a 4°C. hasta su uso. Los materiales de vidrio utilizados para su obtención se los esterilizó previamente.

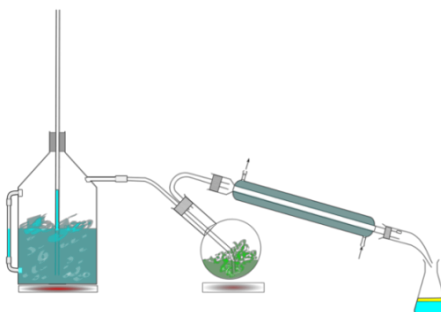


Figura 3.1. Esquema destilador con arrastre de vapor. Por Joanna Kos (s/f)

3.2.2. Caracterización del extracto de orégano en base a:

Dentro de la caracterización del extracto de orégano se demuestra lo siguiente:

3.2.2.1. Densidad del extracto acuoso

Se determinó la densidad absoluta empleando un picnómetro tipo Gay Lussac de 25 ml previamente colocado en una estufa a 110°C y en un desecador. Se pesó el picnómetro vacío con una balanza analítica, se llenó con el extracto acuoso a la temperatura de 25°C, se ajustó el líquido al nivel empleado y con la

ayuda de una tira de papel filtro se extrajo el exceso de muestra. Se pesó el picnómetro vacío y con la muestra y se aplicó la fórmula:

$$\rho = \frac{m}{V}$$

M1= Peso del picnómetro con la muestra (g).

M2= Peso del picnómetro con la muestra (g).

V= Volumen en el picnómetro (ml).

NTP 319.081 (1974), precisa a la densidad como la dependencia entre la masa de un volumen dado de un aceite esencial y el volumen establecido del picnómetro, explícitos a 20°C y, la densidad relativa, como la correspondencia entre la densidad del aceite a 20°C y la del agua destilada a igual temperatura. En densidad relativa empleando aceites esenciales, se repitió la operación con agua destilada a 25°C (Vargas, 2017).

3.2.2.2. Índice de Refracción

Determina la relación existente entre la velocidad de la luz en el vacío y en el interior de la sustancia, de este modo indica la calidad y pureza de un compuesto, ya que cada tipo de aceite esencial tiene un índice de refracción característico (Torrenegra, 2014). Se le determinó el índice de refracción con un refractómetro de mano a 25°C, previamente se limpió el prisma con agua destilada a 20°C, se secó suavemente con papel absorbente y se colocó una gota de muestra (extracto acuoso) sobre el prisma de medición del refractómetro, antes se repite el mismo procedimiento con una gota de agua destilada para calibrar, se realizaron tres lecturas y se calculó el promedio de las mismas (Vargas *et al.*, 2012)

3.2.2.3. Acidez del extracto del orégano

La acidez es el contenido en porcentaje de ácidos grasos libres presentes en la

muestra, que expresan el número de miligramos de hidróxido de potasio necesarios para neutralizar los ácidos grasos libres en 1 gramo de aceite o grasa como ácido oleico (Soto, 2011). Procedimiento según norma NMX-K- 418- (1976).- En un matraz de 100 a 200 mililitros, pesar 2 gramos, más menos 0.05 g del producto con precisión de 0.5 miligramos y adicionar con una pipeta 5 mililitros de etanol, 5 gotas de fenolftaleína (o 5 gotas de rojo fenol en el caso de que el producto contenga grupos fenólicos) y equilibrar la disolución con KOH 0.1 normal, hasta la aparición de una tonalidad rosada que permanezca al menos 15 segundos, considerando a éste como el punto final de la valoración:

Expresión de resultados:

Cálculos. - Número de acidez = $V \times 5.61/P$.

Donde: V = volumen de la solución de KOH 0.1 N utilizado en la neutralización en ml; P = peso del producto en g; 5.61=peso equivalente del KOH en una solución 0.1 N.

3.2.3. Formación de grupos cromóforos

Se preparó 25 ml de cloruro de hierro III en alcohol etílico (95% v/v), para la formación de cromógenos y funciones de blanco. Los grupos funcionales hidroxilo de los compuestos fenólicos del extracto que actúan como auxocromos, con el cloruro de hierro III forman un complejo metálico y/o cromóforo, un compuesto químico competente de absorber cuantos de luz selectivamente, repercutiendo en la tonalidad de ciertos elementos orgánicos, comprometidos con proporcionar el color, Allen y Koumanova (2005), Gupta y Suhas (2009), lográndose bandas de absorción a 330 nm. Así, de una forma muy general, las transiciones de electrones $\pi \rightarrow \pi^*$ son típicos para cromóforos en las regiones ultravioleta y visible (Olsen, 1990).

3.2.4. Método espectrofotométrico UV visible

Esta técnica también proporciona mediciones de alta sensibilidad y no requiere

preparación y calibración de muestras complejas, además de ser amigable con el ambiente, proporciona rápidos resultados y se puede utilizar para análisis con fines cualitativos y cuantitativos, Baeten y Dardenne (2002). Para la determinación se preparó una disolución de etanol al 95% v/v de cloruro de hierro III. La prueba de cloruro férrico se usa para determinar la presencia de fenoles en una muestra o compuesto dado (por ejemplo, fenoles naturales en un extracto vegetal). Los enoles, los ácidos hidroxámicos, las oximas y los ácidos sulfinicos también dan resultados positivos (Chemistry.ccsu.edu. 2013) y, a partir de un estándar al 99.7% en concentración de carvacrol (5-isopropil-2-methylphenol), que se obtuvo de Sigma-Aldrich (EE. UU.), se elaboraron una serie de 5 patrones en matraces aforado de 10 ml: 9.97, 11, 12, 13 y 14 % de concentración. Para el ensayo cuantitativo se cimenta habitualmente una recta de calibrado con estándares, gestionando que la matriz sea igual o muy parecida al espécimen y la absorbancia de la muestra, se interpola en esta recta de calibrado con el fin de conseguir la concentración (Guasch, 2006).

3.2.5. Preparación de la curva estándar

Se encendió el espectrofotómetro, se realizó el espectro característico de la sustancia hasta encontrar la λ de mayor absorbancia, 320 nanómetros y un factor de 14. Con una micropipeta se colocaron 500uL de etanol al 95%, se adicionó correspondientemente 10uL de los estándares preparados y el extracto de orégano y 10uL de cloruro de hierro III a cada una de las cubetas; se agitaron y después de 5 minutos se calibró con el blanco y midió las absorbancias de los patrones elaborados juntos con la muestra. El blanco se ubicó en el equipo y se acordó luego la extinción a cero (100% de transmisión) antes de leer las lecturas de los analitos y, se ejecutó justamente en la experiencia experimental (Plummer, 1981). La ley fundamental que rige el análisis cuantitativo espectrofotométrico es la ley de Lambert - Beer (Higson, 2007) y aplicándola se efectuó una curva de calibración para lograr la recta e interpolando se obtuvieron las concentraciones. Los resultados se tabularon aplicando un análisis de la varianza para la suma de los mínimos cuadrados y con estos resultados

comprobar parámetros exactitud, linealidad, límite de detección, cuantificación, y correlación lineal con el fin de instaurar un comprobable grado de confianza para el estudio de estos compuestos en el laboratorio de química de la carrera de Medicina veterinaria ESPAM MFL.

3.2.6. Elaboración de la emulsión del extracto de orégano

La elaboración de emulsiones requiere de altas energías obtenidas por medios mecánicos, o bajas energías proveniente del potencial químico de los componentes (Silva *et al.*, 2004).

Dos métodos de alta energía se emplearon en la elaboración de la emulsión del extracto acuoso de orégano, en ambos se empleó Tween 80, este tipo de tensioactivo se usa con frecuencia como emulsionante para la industria alimentaria y cosmética, tiene una toxicidad muy baja y una química ecológica, Florence y Whitehill (1982), Moreno y Sánchez (2016) Sánchez *et al.* (2012) y también goma arábiga, polielectrolito con carga negativa muy utilizado en la industria por su alta solubilidad y baja viscosidad a altas concentraciones, así como sus propiedades emulsionantes y formadoras de barrera (Sandoval, 2008).

3.2.6.1. Método del ultrasonido

El propósito en la elaboración de una emulsión es conseguir que compuestos inmiscibles de naturaleza hidrofílica e hidrofóbica, logren coexistir de manera más estable (Hsieh *et al.*, 2006). Al extracto de orégano se lo emulsionó con goma arábiga al 0.5% y tween 80 al 1.0% p/p, se disolvieron en los extractos con concentraciones de 12 y 14 % en vasos de 250 ml y agitando con agitador de vidrio, se colocaron en el equipo del ultrasonido por 30 minutos. Investigadores, Chendke y Fogler (1975), establecieron las ventajas del ultrasonido: el diámetro de las partículas, muestra un rango sub-micrómetro, las emulsiones son más estables, no es obligatorio la adición de surfactante y la energía necesaria en el proceso es mínima, en relación a la empleada en los

métodos convencionales de emulsificación. Estas cavitaciones inducidas acústicamente provocan la interrupción de las gotas de fase dispersa de tamaño micrométrico y nanométricos, facilitando la formación de gotas de emulsión submicrométrica (Gogate *et al.*, 2011). Al presente, es apreciada como una técnica de procesamiento sustentable, porque típicamente emplea menos tiempo, agua y energía (Chemat *et al.*, 2011). Ulteriormente los extractos emulsionados se almacenaron en envases ámbar y en refrigeración hasta su empleo.

3.2.6.2. Método de agitación magnética

Se emulsionó extracto de orégano con goma arábiga al 0.5% y tween 80 al 1.0% p/v se disolvió en los extractos con concentraciones de 12 y 14 % de compuestos fenólicos en vasos de vidrio de 250 ml y se procedió a agitar con agitador magnético (Márquez *et al.*, 2005) en un equipo calentador - agitador modelo HSD 180 por 15 minutos a 3.500 rpm. Posteriormente se almacenaron en envases ámbar y en refrigeración.

3.2.7. Detección de la mastitis bovina

En dos hatos bovinos del entorno y en la UDIV de la ESPAM MFL se usó la prueba de campo California Mastitis Test CMT, durante décadas se ha usado y sigue siendo el ensayo más utilizado a nivel de campo para el análisis de mastitis en los bovinos de leche (Morresey, 1999), (Radostits, 2002) Medina y Montaldo (2003) (Erskine, 2001) y Bedolla *et al.* (2007). Sin embargo, para detectarla es necesario recurrir a técnicas de laboratorio como el número de células somáticas (Sixtos, 2011). Su contenido en la leche nos admite conocer sobre la función y el estado de salud de la glándula mamaria lactante y por su cercana correspondencia con la composición de la leche, resulta un criterio muy importante de su calidad (Wolter y Kloppert, 2004). A las muestras de leche que dieron positiva a la prueba de campo, se les volvió a recolectar de las ubres y cuartos mamarios, previa limpieza con agua limpia, secada con toallas de papel de un solo uso y asepsia con algodón estéril y alcohol etílico al 75% v/v, en

viales que contenían el conservante bromopol, se las almacenó herméticamente en termos refrigerados para mantenerlas a 4°C y se enviaron al laboratorio para el conteo de células somáticas (CCS). La metodología utilizada es la ISO13366-2/IDF148-2. /2006.

El conteo de células somáticas en la leche se utiliza como un indicador de la salud de la glándula mamaria, Bradley y Green (2005). Los CCS se han utilizado como un indicador de mastitis bovina en vacas lecheras para estimar los efectos terapéuticos para el control de mastitis (Zhen *et al.*, 2009). Para la determinación de *Staphylococcus aureus*, que causa inflamación de la glándula mamaria al promover el incremento de conteo de células somáticas y de citocinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β , IL-12 y el reclutamiento de linfocitos CD8 (Oviedo-Boyso *et al.*, 2007) y la bacteria medioambiental causante de mastitis bovina, *Escherichia coli*, se empleó envases descartables para conteo de UFC/ml de y se trasladaron en termos a 4°C, al laboratorio de Microbiología de Medicina veterinaria ESPAM MFL. A las muestras se las mantuvo en termos y refrigeración hasta su análisis.

3.2.8. Aplicación intramamaria del extracto emulsionado

Se aplicó durante tres días vía intramamaria con sondas de acero inoxidable, marca DLaura, previamente colocadas en estufas a 120 °C x 2 horas el extracto emulsionado de *Origanum vulgare* con concentraciones de 12 y 14 % en compuestos fenólicos previo ordeño de las ubres, lavado, secado con toallas de papel de un solo uso y desinfectadas con alcohol etílico al 75 %. La ventaja de la aplicación intramamaria es su elevada concentración alcanzada en el compartimiento lácteo de la glándula mamaria y los requerimientos de menor cantidad de drogas antimicrobianas (Pyorala, 2002b). Ulterior al tratamiento, se recolectó en envases descartables la leche siguiendo los pasos anteriores para toma y procesamiento de muestras en el laboratorio.

3.2.9. Determinación de UFC/ml de *S. aureus* y *E. coli*

Su presencia en alimentos industrializados o naturales se debe a la contaminación introducida por los operadores que manipulan tanto los alimentos como los sistemas adherentes al mismo, o bien a la utilización de materia prima contaminada como la misma leche de vacas enfermas o infectadas con mastitis, siendo ésta una enfermedad bastante común en las ubres de los bovinos productores de leche (López, 2011). En el laboratorio de Microbiología de la ESPAM MFL se efectuaron los ensayos para el conteo de UFC/ml de *S. aureus*, empleándose como medio de cultivo agar manitol, siguiendo referencias para aplicar la norma NTE INEN 1528. / 2012, recomendada para el aislamiento de estafilococos patogénicos obtenidos a partir de muestras clínicas, alimentos, productos cosméticos y otros materiales de importancia sanitaria (Britanialab, 2016). Se empleó el procedimiento semicuantitativo de consenso en cajas Petri de cultivo, sembrado en agar por estrías, medio de cultivo manitol y desinfectados en autoclave a 121°C x 15 min.

Para las bacterias gram negativo, la amenaza de esta patología está determinada por varias interacciones entre el anfitrión, el ambiente y el agente contagioso, sin embargo, según Burvenich *et al.* (2003), *E. coli* en la ubre bovina, es afín con la aparición de mastitis, principalmente clínica, en torno al parto y durante la lactación temprana, liberando importantes síntomas locales, a veces graves signos sistémicos. Se emplea el caldo MacConkey para el cultivo de bacterias gram negativas (-) fermentadoras de lactosa y el aislamiento de *Escherichia coli*, ya que estas se presentan en forma de colonias grandes, rojas y con un halo (Agurto, 2009).

Se efectuaron las pruebas confirmativas de los microorganismos antes y después de la aplicación intramamaria del extracto emulsionado de *Origanum vulgare*, las muestras de leche se sembraron en medio agarizado, previamente fundido y enfriado a 45°C. y luego a una estufa a 37°C durante 24 horas. Transcurrido este período se efectuó la lectura de las unidades formadoras de colonia por mililitro mediante un contador digital.

3.4. Diseño Metodológico de la Investigación

Diseño Metodológico de la investigación. - Se aplicó un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo bifactorial 2x2 siendo el factor A las concentraciones 12% y 14% de compuestos fenólicos del extracto de orégano y el factor B los métodos ultrasonido y agitación magnética. Para el estudio de las variables respuestas previamente se comprobaron la homogeneidad de varianza (Prueba de Bartlett) y normalidad de los errores (Prueba de Shapiro-Wills). Además, se efectuó una curva de calibración y por medio de un análisis de la varianza y aplicando el método de los mínimos cuadrados, determinar % de concentraciones de compuestos fenólicos en el extracto acuoso de orégano. Teniendo como modelo lineal de efecto fijos el siguiente:

3.4.1. Modelo Lineal Aditivo I

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con arreglo Factorial 2x2, donde el factor A se representó por las diferentes concentraciones de extracto (12 y 14 %) y el factor B, métodos de elaboración (ultrasonido y agitación magnética).

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = observación j-ésima del i-ésimo tratamiento μ = media general

τ_i = efecto del i-ésimo tratamiento; $i = 0, 1, 2, 3, 4$.

ε_{ij} = error experimental de la j-ésima observación en el i-ésimo tratamiento.

En caso de existir diferencias estadísticas entre los tratamientos se realizará una prueba de promedios de Duncan al 5%. Igualmente, para conocer el efecto del método de obtención y su interacción con la concentración del extracto acuoso emulsionado.

3.4.2. Modelo Lineal Aditivo II

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde

Y_{ijk} : Observación k-ésima del i-ésimo nivel del factor A y

j-ésimo nivel del factor B.

μ : Media general.

α_i : *Efecto* del i-ésimo nivel del factor A. (Concentraciones % del extracto). $i = 1$ y 2

β_j : Efecto del j-ésimo nivel del factor B. (Absorbancias). $j = 1$ y 2 .

$\alpha\beta_{ij}$: Efecto de la interacción de primer orden del i-ésimo nivel del factor A con el j-ésimo nivel del factor B.

ε_{ijk} : Efecto aleatorio o error experimental.

En caso de existir diferencias significativas a nivel de las interacciones o factores principales se realizaron las comparaciones múltiples con pruebas de promedio (Duncan al 5%).

3.4.3. Análisis de la Varianza Anova

El siguiente cuadro 3.2. se muestra los diferentes tratamientos para determinar si existen diferencias significativas o al contrario indicar que sus medias poblacionales no difieren:

Cuadro 3.2. Fuentes de varianza y grados de libertad.

Fuentes de varianza	Grados de libertad
---------------------	--------------------

Concentración (A)	(A-1) 3-1 = 2
Método (B)	(B-1) 2-1 = 1
Concentración x Método	
Mastitis bovina	(A-1) (B-1) 2x1 = 2
Error experimental	x – Diferencia = 44
Total	d.m.r – 1 3x2x5-1 = 45

Fuente: Elaboración propia

Tabla 3.3. Combinaciones o tratamientos.

Combinaciones		Factor	Factor	Repeticiones				
Tratamientos	Código	A	B	1	2	3	4	5
1	A1B1	Conc.1	UFC/ml	0	0	0	0	0
2	A1B2			0	0	0	0	0
3	A1B3			0	0	0	0	0
4	A1B4			0	0	0	0	0
5	A1B5			0	0	0	0	0
1	A2B1	Conc.2	UFC/ml	0	0	0	0	0
2	A2B2			0	0	0	0	0
3	A2B3			0	0	0	0	0
4	A2B4			0	0	0	0	0
5	A2B5			0	0	0	0	0
1	A3B1	Método	UFC/ml	0	0	0	0	0
2	A3B2			0	0	0	0	0
3	A3B3			0	0	0	0	0
4	A3B4			0	0	0	0	0
5	A3B5			0	0	0	0	0
1	A4B1	Método	CCSS	0	0	0	0	0
2	A4B2			0	0	0	0	0
3	A4B3			0	0	0	0	0
4	A4B4			0	0	0	0	0
5	A4B5			0	0	0	0	0

1	A4B2			0	0	0	0	
	A4B3							
2	A4B4			0	0	0	0	
3	A4B5	Método	UFC/ml	0	0	0	0	
4			CCSS	0	0	0	0	
5				0	0	0	0	

Fuente. Elaboración propia.

3.5. Unidad de Análisis

La unidad de análisis es el extracto de aceite de orégano (*Origanum vulgare*) emulsionado.

3.6. Población de Estudio

Concentración del extracto de orégano 12% y 14% de compuestos fenólicos y métodos de elaboración de la emulsión: ultrasonido y agitación magnética.

3.7. Tamaño de Muestra.

El tamaño de muestra se efectuó un análisis de la varianza según método factorial de ANOVA.

3.8. Selección de Muestra

La muestra se seleccionó completamente al azar con arreglo bifactorial entre la totalidad de ensayos.

Muestra: Cuarterones infectados, previa identificación en leche de bacterias *S. aureus* y *E. coli*, elevado conteo de células somáticas.

3.9. Técnicas de recolección de datos

Para la identificación y comportamiento de las variables se consideraron los

procedimientos de recolección de muestras en los hatos bovinos y las técnicas de laboratorios de química y microbiología.

3.10. Análisis e Interpolación de la Información

Se analizaron 44 muestras de leche diagnosticadas con mastitis bovina en medios de cultivo agar MackConkey y manitol para *S. aureus*, y *E. coli*, y 44 muestras para conteo de células somáticas.

3.11. Análisis inferencial.

La estadística descriptiva y la teoría de la probabilidad interpretan la información suministrada por el análisis de las 44 muestras del ensayo. Entonces se plantea, H0 El extracto de orégano *Origanum vulgare* emulsionado no tiene actividad antibacteriana en UFC/ml y CCSS en la mastitis bovina?

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo como propósito determinar la actividad antibacteriana de extracto de orégano emulsionado en vacas con mastitis bovina, aplicándolo vía intramamaria en los cuarterones que resultaban positivo a las pruebas de ensayo para la detección de mastitis. Se analizó la influencia de dos métodos en la elaboración de la emulsión (agitación magnética y ultrasonido) y concentración de compuestos fenólicos del extracto (12 y 14 %). Además, se determinó la concentración de compuestos fenólicos en el extracto de orégano mediante un espectrofotómetro UV visible formando un cromóforo con cloruro férrico al 1% en solución etanólica.

De los resultados de los ensayos de 44 muestras de leche de vacas con mastitis, ambos métodos presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) para UFC/ml de *Staphylococcus aureus* y CCS no así, para UFC/mL de *E. coli*, tabla 5. También se denotó que no presentó diferencias estadísticas ($p > 0.05$) las variables concentraciones: 12 y 14 % de compuesto fenólicos. Al respecto, las bacterias ambientales cuyo reservorio es el ambiente donde permanecen los animales y no las glándulas mamarias infectadas, son *Streptococos* ambientales y en menor medida los coliformes (Soca *et al.*, 2005), así mismo, es posible que influyeran las estructuras diferentes que poseen ambos tipos de microorganismos, la mayor resistencia de las bacterias Gram negativas a los aceites esenciales se atribuye en parte, a la complejidad de la membrana celular doble presente, en contraste con la estructura de las bacterias Gram positivas (Zweifel *et al.*, 2012).

Cuadro 4.1. Variables en estudio

Variables	MS	F	P
Concentraciones: 12 y 14%	65,9E±13	4,18	0,2497
Métodos: ultrasonido y agitación magnética	5,420E±12	1,36	0,0476

Fuente. Elaboración propia.

Para desvirtuar H_0 el método del ultrasonido para la elaboración de emulsiones presenta que uno de los dos métodos es diferente, la prueba de comparación de Tukey en relación al método de agitación magnética, tabla 5. Los ultrasonidos están volviendo a ser muy utilizados para elaborar emulsiones aceite en agua por la reducción en el tamaño de gota, en las nanoemulsiones y, en particular, el mecanismo esencial de ruptura de gotitas que ocurre durante la emulsión, Bondy y Söllner (1935) fue una de las primeras aplicaciones de ultrasonido potente y la primera patente relacionada que se obtuvo desde hace cincuenta años, Wood y Loomis (1927). El ultrasonido de alta intensidad es efectivo y ya ha mostrado resultados prometedores en la preparación de nanoemulsiones alimenticias o farmacéuticas (Kaur *et al.*, 2011). Estas cavitaciones inducidas acústicamente provocan la interrupción de las gotas de fase dispersa de tamaño micrométrico y facilitan la formación de gotas de emulsión submicrométrica (Gogate *et al.*, 2011).

Cuadro 4.2. Prueba de comparación Tukey HSD para los métodos.

Métodos.	Media	Grupos homogéneos
Ultrasonido	1,2003	A
Agitación magnética	1,5726	B

Fuente. Elaboración propia

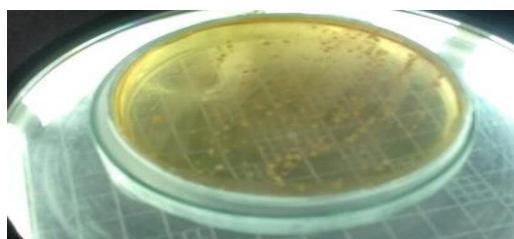
Al respecto de método de agitación magnética, Ramírez *et al.*, (2002) indican que en emulsiones el diámetro de gota está en relación con la velocidad de agitación, es como decir que el tamaño de las gotas depende de la agitación. El mismo autor ensayó con 2000 rpm con un tamaño de gota de cerca de 30 micras, mientras que a 8000 rpm alrededor de 9 micras, en el presente ensayo se realizó a 3500 rpm en el método de agitación magnética. Estos métodos de agitación son utilizados para lograr una reducción en el tamaño de las gotas, así como para lograr una mayor uniformidad y mejor estabilidad (Mahdi, 2009).

La actividad antibacteriana se refleja en la disminución de UFC/ml de *Staphiloccocus aureus* y CCS, en la tabla 6 se observa la diferencia estadística ($p < 0,05$) aunque, no existió para las colonias de *E. coli* bacteria ambiental, posiblemente a que la mayor cantidad de muestreo se efectuó en temporada de estación seca, donde existe menos proliferación que en la lluviosa por ser considerado el suelo reservorio de *E. coli* al respecto: aunque no es factor de estudio, los cambios estacionales afectan la ocurrencia de la bacteria mencionada (Samaha *et al.*, 2012).

Cuadro 4.3. Análisis de la Varianza de UFC/ml para el método ultrasonido, UFC/ml

Fuente:	DF	SS	MS	F	P
Conc.	1	0.02323	0.02323	0.11	0.7377
Método 1		1.10874	1.10874	5.46	0.0268
Concentra*Método 1	1	0.03903	0.03903	0.19	0.6644
Error	28	5.68465	0.20302		
Total	31	6.85565			
Gran media 1.3864 CV.					

En la figura 4.1 se observan las placas luego de 24 - 48 horas (37°C) y en el medio su cambio de coloración con las colonias circulares gris a amarillo dorado intenso. Los *Estafilococos coagulasa* (+) (*Staphylococcus aureus*), originan colonias de color amarillo y un medio adyacente de color amarillo, mientras que los *Estafilococos* negativos a la coagulasa provocan colonias de color rojo y no inducen cambios en el color del indicador rojo fenol (Chapman, 1945). En las placas con coloración rosada con su forma característica. Se definen porque se fraccionan en agrupaciones que asemejan racimos de uva (Aliaga, 2011).



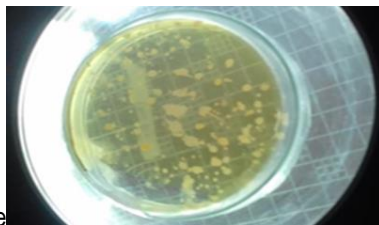


Figura 4.1. Colonias circulares grises y amarilla UFC/ml de *S. aureus* antes de la aplicación del extracto.



Figura 4.2. Las colonias de *S. aureus* en leche de vacas con mastitis.

Las figuras 4.2 y 4.3 muestran la disminución de las UFC/ml de *S. aureus* en el medio de cultivo manitol, luego de la tercera aplicación intramamaria del extracto de orégano emulsionado en vacas con mastitis bovina.



Figura 4.3. Se observa disminución de las colonias grises y amarillas de *S. aureus*, ulterior a la aplicación



Figura 4.4. Cultivo en medio agar Manitol en muestras de leche para UFC/ml de *S. aureus* ulterior a la aplicación del extracto.

Aunque las concentraciones al 12%, y 14% de compuestos fenólicos no tuvieron diferencias estadísticas entre sí para medir la actividad antibacteriana del extracto emulsionado en los dos métodos, como indican la estadística de las tablas 7 y 8. Sin embargo, el efecto antibacteriano en vivo del extracto de orégano emulsionado sí presentó disminuciones en CSS y UFC/ml luego de las aplicaciones,

Cuadro 4.4. Estadística descriptiva para concentración 12%.

	RCS	UFC1	UFC2
N	10	10	7
Media	2.660E+06	31.600	11.571
SD	1.730E+06	30.438	17.906
SE Media	546964	9.6254	6.7678
C.V.	65.027	96.324	154.74
Mínimo	276000	4.0000	2.0000
Maximo	5.528E+06	98.000	50.000

Fuente: elaboración propia

Tabla 4.5. Estadística descriptiva para concentración 14%.

	RCS	UFC1	UFC2
N	10	10	5
Media	1.915E+06	39.200	3.8000
SD	1.474E+06	72.859	4.0866
SE Media	466194	23.040	1.8276
C.V.	76.970	185.86	107.54

Mínimo	306.00	4.0000	1.0000
Máximo	4.516E+06	240.00	11.000

Fuente. Elaboración propia

No obstante, lo observado luego de las determinaciones muestra la actividad antibacteriana del extracto de *Origanum vulgare* emulsionado, evidenciado con la disminución del conteo de células somáticas y Unidades Formadoras de Colonia por mililitro, en la mastitis bovina. Evaluaron la actividad antibacteriana del aceite de orégano *in vitro*, en cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* y se concluyó que el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. —orégano tiene efecto antibacteriano *in vitro* sobre estas bacterias (Garay *et al.*, 2015), otras investigaciones similares concluyen del efecto inhibidor y bacteriostático de aceite de orégano. Investigadores evaluaron la actividad antibacteriana de *Origanum vulgare* frente a 71 bacterias aisladas de leche bovino positivas a la prueba de Mastitis California, la concentración bactericida mínima fue 3.17% para *Staphylococcus aureus* y 0.35% para *Escherichia coli*, demostrando efectividad para esta cepa (Bastos *et al.*, 2011). Todo parece indicar la actividad antibacteriana del extracto.

Nostro (2007) demostró que la actividad antibacteriana del orégano se debe principalmente a sus isómeros ópticos, carvacrol y timol, pues su naturaleza hidrófoba sobre la capa lipídica de las membranas citoplasmáticas provoca pérdida en su equivalencia y, a través de ellas, fuga de material celular tales como iones, ATP y ácidos nucleicos. (Burt, 2004) describe su mecanismo de acción durante su actividad antimicrobiana, el cual se debe a su marcado carácter hidrofóbico, que se acumula en la membrana plasmática de la bacteria, que al igual que el timol afecta a su integridad y origina una disminución del potencial de membrana. En este contexto los estudios indican que la hidrofobicidad es un factor importante por su interacción con los ácidos graso-insaturados de las membranas y la presencia de un grupo hidroxilo libre permiten el intercambio de protones creando abertura en las membranas celulares. A continuación, se muestran resultados del conteo de células somáticas para los 2 métodos y las dos concentraciones.

En el cuadro 4.6 se muestran resultados del recuento de células somáticas y se observan en orden decreciente las disminuciones del conteo, luego de las aplicaciones intramamarias del extracto acuoso emulsionado de *Origanum vulgare*, siendo más evidente las disminuciones para el método del ultrasonido. El extracto presenta efecto sobre el conteo de células somáticas. En contraste a la interrogante planteada sobre la actividad antibacteriana del extracto de orégano emulsionado existen suficientes datos para rechazar la H0

Cuadro 4.6. Métodos y tratamientos. Fuente: Elaboración propia. - Resultados del laboratorio de la UPS acreditado por SAE muestra disminuciones en el conteo de células somáticas antes de la aplicación de los extractos y ulterior a su aplicación.

REP	METODO	CONCENTRACIÓN (12%) y (14%)	RCS	TRATAMIENTO
1	1	1	4841000	1
2	1	1	4430000	1
3	1	1	2238000	1
4	1	1	1276000	1
5	1	1	2251000	1
6	1	1	916000	1
7	1	1	460594	1
8	1	1	5728000	1
9	1	1	1045000	1
10	1	1	2024000	1
11	1	1	2305000	1
1	1	2	3000000	2
2	1	2	1325000	2
3	1	2	306000	2
4	1	2	384000	2
5	1	2	4516000	2
6	1	2	9472921	2
7	1	2	7357000	2
8	1	2	3791000	2
9	1	2	3668000	2
10	1	2	2237000	2
11	1	2	3537000	2
1	2	1	1031000	3
2	2	1	276000	3
3	2	1	2500000	3
4	2	1	5528000	3
5	2	1	2228000	3
6	2	1	976000	3
7	2	1	1538000	3
8	2	1	460000	3
9	2	1	1525000	3
10	2	1	1110000	3
11	2	1	1148000	3

1	2	2	1081000	4
2	2	2	1616000	4
3	2	2	1697000	4
4	2	2	3945000	4
5	2	2	1667000	4
6	2	2	2100000	4
7	2	2	1047000	4
8	2	2	1616000	4
9	2	2	1848000	4
10	2	2	5826000	4
11	2	2	5743000	4

Para determinar la concentración de compuestos fenólicos en el extracto de orégano se realizó una correlación entre absorbancia y concentración y se denotó diferencia en los valores, cuadro 4.7 y 4.8; así mismo se observa proporcionalidad directa en el coeficiente de correlación.

Cuadro 4.7. Correlación (Pearson) para absorbancia vs concentración

Absorbancia

Concentración

0.4823

P-Valor 0.0008

Casos incluidos 45 Casos perdidos 0

Predictor

Variables Coeficiente Std Error T P Constante -

1.31280 0.43469 -3.02 0.0042

Concentración 0.12993 0.03599 3.61 0.0008

R-Cuadrado 0.2326 Resid.Cuadrado de la media

(MSE) 0.11798 Adjuste de R-Cuadrado 0.214

Desviación Estándar 0.34348

Cuadro 4.8. Mínimos cuadrados no ponderados Regresión lineal de Absorbancia

Fuentes	SS	MS	F	P
Regresión 1	1.53779	1.53779	13.03	0.0008
Residual 43	5.07318	0.11798		6.61097
Total 44				

Linealidad. - La curva de calibración del compuesto fenólico carvacrol con un

coeficiente de variación 38.96475 y un R cuadrado de 0.5203 indicando que la recta tiene linealidad. Con 45 repeticiones se observa un ajuste de confianza del 95% para límites de confianza y precisión. De igual modo en el gráfico absorbancia vs concentración de fenoles (carvacrol), se muestra la linealidad del compuesto fenólico. Observamos la recta en la figura 4.5.

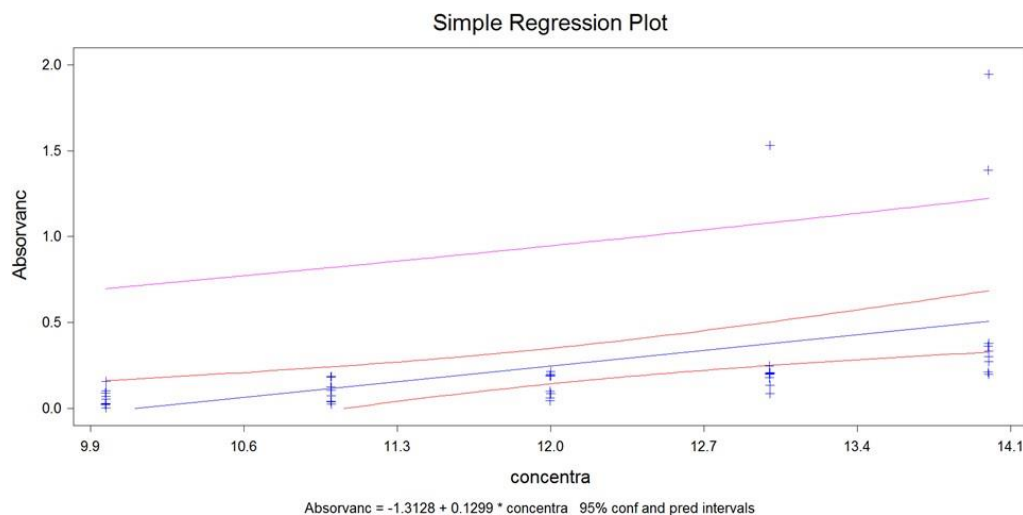


Figura 4.5. Regresión simple para la gráfica.

Se pudo alcanzar absorbancias en el espectrofotómetro UV visible a una longitud de onda a 320 nanómetros mediante la formación de un cromógeno al hacerlo reaccionar con Cl_3Fe al 1% en solución etanólica, mostrando una coloración verde amarilla. Los grupos funcionales hidroxilo de los compuestos fenólicos del extracto que actúan como auxocromos con el cloruro de hierro III forman un complejo metálico y/o cromóforo, compuesto químico idóneo para absorber luz selectivamente, repercutiendo en los espectros de algunos compuestos orgánicos, siendo responsables de provocar coloraciones, Allen y Koumanova (2005) Gupta y Suhas (2009). La naturaleza del solvente, el índice de hidrogeno de la disolución, la temperatura, la concentración de electrólitos y la presencia de compuestos interferentes logran influir en los espectros de absorción de los agregados, así como las diversificaciones en la amplitud de la abertura o ancho de banda en el espectrofotómetro (Gutierrez, 2002).

Se cuantificaron concentraciones entre 12 y 14 %, de compuesto fenólicos al

efectuar curvas de calibración con 45 repeticiones para las variables concentración y absorbancia. Estas técnicas para determinar compuestos fenólicos son simples y económicas, pero solo dan una estimación de las concentraciones de estos por encima de un cierto nivel mínimo y no los cuantifican individualmente; sin embargo, pueden ser útiles para la detección rápida y relativamente económica de numerosas muestras (Ignat, 2010). Este mismo autor coincide, que a pesar de que hay un gran número de investigaciones publicadas. Entonces, hay un gran margen para desarrollar métodos de cuantificación basados en el tipo de grupo fenólico (Liu *et al.*, 2008).

Precisión - Se comprobó con 45 réplicas comprobándose el coeficiente de variación.

En la figura 4.6. muestra el diagrama de dispersión de los datos junto con la recta ajustada y el diagrama de dispersión de los residuos vs la concentración para los datos intermedios (12 - 14%), los residuos que están por encima de la línea son positivos y los que están por debajo negativo y la suma de ellos tiende a cero.

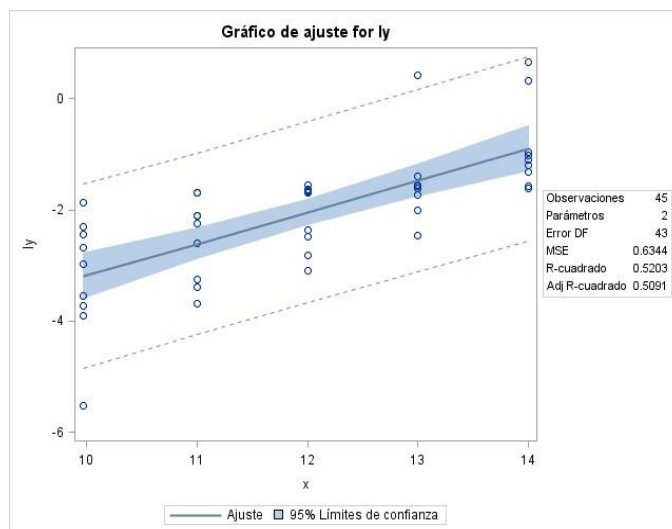


Figura 4.6. La grafica muestra la linealidad de la recta.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El método del ultrasonido para la elaboración de la emulsión cuya fase interna es el extracto de orégano y la externa agua o/w, resultó con un mayor incremento en la actividad antibacteriana por la disminución en el conteo de CCS, así como en la disminución de las UFC/ml de *S. aureus* luego de la aplicación intramamaria a las vacas con mastitis bovina
- El extracto de orégano *Origanum vulgare* emulsionado tiene actividad antibacteriana sobre los microorganismos infecciosos y ambientales precursores de la mastitis bovina, se denotó mayor actividad en microorganismos Gram + como es el caso de *S. aureus*, en relación a *E. coli*.
- Las concentraciones 12 y 14 % no mostraron diferencias significativas entre sí, a pesar de su baja concentración en aceite y formando un cromóforo se pudo detectar y cuantificar los porcentajes de compuestos fenólicos en el extracto por UV visible, con límites de detención entre 12% y 14%, proporcionando un instrumento de análisis con la cual se puede conseguir resultados confidenciales y repetibles para la determinación de aceites esenciales como el de *Origanum vulgare*.

5.2. Recomendaciones

- Se recomienda efectuar ensayos con extractos de aceites esenciales por ser productos de origen natural con muchas aplicaciones como el orégano *Origanum vulgare*.
- Que se realicen investigaciones con extractos de orégano con mayor concentración en compuestos fenólicos.

- Que se efectúe evaluaciones sobre la actividad antibacteriana del extracto de orégano con otras bacterias o agentes etiológicos causantes de mastitis.
- Se recomienda efectuar la última validación con un resultado de la muestra de un laboratorio acreditado, frente a la propuesta del método para determinar la concentración de fenoles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acot, Pascal. 2005. Historia del clima. El Ateneo. ISBN 10: 950023078X
ISBN 13: 9789500230780. Editorial: Panorama México.
- Acuña, V.; Rivadeneira, 2008. A. Aislamiento, identificación y antibiograma de patógenos presentes en leche con mastitis en ganaderías bovinas de la provincia de Pichincha. Ecuador. URI: <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/2553>.
- Afroditi S, Papanikolaou C, Nikolaou S, Kokkini T, Lanaras y Arsenakis M. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. J. Agric. Food Chem. 44. pp 1202 - 1205.
- Aguirre, N.; 2013. Estudio de las Interacciones Polímero-Surfactante, para la Recuperación de Crudo Extrapesado en Yacimiento de la Faja Petrolífera del Orinoco. Trabajo Especial de Grado para optar por el título de Ing. De Petróleo. Escuela de Petróleo, Facultad de Ingeniería – UCV, Caracas – Venezuela
- Agurto, Tomás. 2009. Manual de Técnicas en Microbiología: Coloraciones, Medios de Cultivo y su Bioquímica, Clorimetría/Agurto Saenz, Tomás/ Lima: s.e. (1989).
- Albado Plaus Emilia; Saez Flores Gloria; Grabiell Ataucusi Sandra. Rev Med Hered, 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano).
- Aliaga M.E.; Morfología y estructura de las bacterias. Parte I. 2011. URL Disponible en: <http://medicinaupv.files.wordpress.com/2011/04/2-3-clasemorfologcada-y-estructura-dela-bacterias.pdf> Accedido en fecha: 5 de septiembre del 2014.
- Allen, S. J., and Koumanova, B. (2005). Decolorization of water/wastewater using 231 adsorptions. J. Univ. Chem. Technol.

Metallurgy, 40, 175-192.

Alfonso R. Gennaro, 2003, Remington Farmacia, Editorial médica panamericana, 20 edición, Tomo I, Argentina, página 370-384

Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB, 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum species*. J. Agric. Food Chem. 2001; 49: 4168-4170

Álzate, N., López, V., Marín, H. y Murillo, A. 2009. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, *Myrtaceae*) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, *Rutaceae*) sobre algunos hongos Filamentoso. Revista Tumbaga 4: 59-71.

Amorati, R; Valgimigli, L. 2012. "Modulación de la actividad antioxidante de los fenoles por interacciones no covalentes". Org Biomol Chem. 10 (21): 4147–58. doi: 10.1039 / c2ob25174d. PMID 22505046

Andresen H., 2001. Mastitis: Prevención y control. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, v.12, n.2, p.55-64

Árcila-Lozano CC, Loarca G, Lecona S, González E. 2004. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN). 2004;54. Orégano. Propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos latinoamericanos de nutrición. 54(1). Artículo numero 14

Arenas Sosa, Iván y López Sánchez, José. 2004. Espectrofotometría de absorción. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Maestría en Ciencias Bioquímicas. Cuernavaca de sus componentes.

Avellán, R., Zambrano, M., De La Cruz, L., Cedeño, C., Delgado H., Rezabala, P. y Macías Y. 2019. Revista Amazónica y Ciencia y Tecnología, Ene. - Abr. Volumen 8 (1): 62-70. Impresa ISSN 1390-5600 • e-ISSN 1390-8049

Ayala-Zavala JF, Fernando, Shiow Y. Wang, Chieng. Y. Wuant, Gustavo

- A. Gonzáles-Aguilar. 2004. Effect of storage temperatures on antioxidant capacity and aroma compounds in strawberry fruit.
- Baeten, V.; Dardenne, P. 2002, Spectroscopy: Developments in instrumentation and analysis. *Grasas Aceites* 53, 45–63.
- Bandoni Arnaldo L., 2002. Los recursos vegetal aromáticos en America latina. CYTED. Ciencia Tegnologia y Desarrollo. Universidad de Buenos Aires
- Bastos M., Damè L, Souza L., Almedia D., Alvez M., Braga J., 2011. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas con leche de bovino. *Rev. Cubana PlantMed.*
- Bastos Oyarbazal, Marta Elaine et al. Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. ante bacterias aisladas en leche de bovino. *Rev cubana Plant Med.* 2011, vol.16, n.3 pp. 260-266
 Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000300006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1028-4796
- Bautista, S., Hernández, M. y Bosquez, E. 2004. Growth inhibition of select fungi by chitosan and plant extracts. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol 22 núm 2. pp. 178-186.
- Barrera, L. y S. Bautista. 2008. Actividad antifúngica de polvos, extractos y fracciones de *Cestrum Nocturnum* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill. *Revista Mexicana de Fitopatología* 26 (1): 27-31
- dley, A. y Green, M. 2005. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. *In practice*. 27: 310-315.
- Bedolla, C. C., Castañeda, V. H. y Wolter, W. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina. *REDVET. Rev. Electrón. Vet.* Vol. VIII, No 9, Septiembre. 17 pp.
- Bondy, C. y Söllner K. 1935 On the Mechanism of Emulsification by

- Ultrasonic Waves Trans. Faraday Soc. 1935, 31, 835-842
- Bradley, A. y Green, M. 2005. Use and interpretation of somatic cell count data in dairy cows. In practice. 27: 310-315,
- Bravo, L. L.; T. Bermúdez y B. Montes. 2000. Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. Manejo Integrado de Plagas 57: 29-34.
- BritaniaLab, Manitol salado agar. Buenos aires-Argentina: Britania lab. 2016, Consulta: 20 de enero de 2016. Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/manitolsalagar.htm>
- Brunatti, C., y Martín, A. 2010. Introducción a la Espectroscopía de Absorción Molecular Ultravioleta, Visible e Infrarrojo Cercano. Recuperado el 26 de 02 de 2017, de <http://materias.fi.uba.ar/6305/download/Espectrofotometria.pdf>.
- Burbano, J. Plantas Medicinales, Hierbas y Vitaminas. 1998. 3a. ed., Guayaquil- Ecuador.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology, 94, 223-253.
- Burvenich, C.; Van Merris, V.; Mehrzad, J.; Diez-Fraile, A.; Duchateau, L. 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. Vet. Res. 34, 521-564.
- Bussata C., Mossi A.J., Rodrigues M.R.A., Cansian R.L. y Oliveira J.V. 2007. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. Brazilian Journal of Microbiology. 38: 610-616.
- Canselier, J. P. H. Delmas, A. M. Wilhelm y B. Abisrnil. Ultrasound Emulsification-An Overview. 2012. Journal of Dispersion Science and Technology Publication details, including instructions for authors and subscription information: <http://www.tandfonline.com/loi/ldis20>.

- Capra, F. 1982: El punto crucial. Ciencia, sociedad y cultura naciente, Integral, Barcelona.
- Cárdenas, N.; Zavala, M. Aguirre, R. Pérez, C. y Pérez, S. 2005. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia Mexicana* gray. Journal of Agricultural and food chemistry 53: 4347-4349.
- Cardozo VF, Lancheros CAC, Narciso AM, Valereto ECS, Kobayashi RKT, Seabra AB, Nakazato G. 2014. Evaluation of antibacterial activity of nitric oxide- releasing polymeric particles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* from bovine mastitis. Int J Pharm, 473, 20-29
- Ceron-Muñoz M, H Tonhati, J Duarte, J Oliveira, M Muñoz-Berrocal, HJurado- Gámez. 2002. Factors affecting somatic cell counts and theirrelations with milk and milk constituent yield in buffaloes. J. Dairy Sci.85, 2885-2889.
- César CR 2004. Bioseguridad y control de mastitis. Revista electrónica de investigación Mundo Ganadero: (167). Consultado en: http://www.cuencarural.com/lecheria/bioseguridad_y_control_de_mamitis
- Coulon, JB; Gasqui, P; Ba rouin, J; Ollier, A; Pradel, P y Pomies, D., 2002. Efecto de mastitis y gérmenes relacionados en la producción de leche y composición durante la ubre natural infecciones en vacas lecheras. Anim. Res., 51:383-393.
- Chapman, G.H. 1945. The significance of sodium chloride in studies of *staphylococci*. J. Bacteriol. 50:201-203
- Chemat F., Zill-e-Huma, Muhammed Kamran Khan. 2011. Applications of ultrasound in food technology. Processing, preservation and extraction. Ultrasonic Sonochemistry 18(4), 813. 835.
- Chemistry. ccsu.edu. 2013. Cloruro férrico, página de prueba de piridina.

- Chendke P.K. y H.S. Fogler. 1975. Macrosonics in industry: 4. Chemical processing. *Ultrasonics*. 13, 31-37.
- Cheng, S.; Cheng Liu, J.; Huang, C. y Hsui, W. Ch. and Chang, S. 2009. Insecticidal activities of leaf essential oils from *Cinnamomum osmophloeum* against three mosquito species. *Biores. Technol.* 100(1):457-464.
- Choi, M.J. et al, 2007. Effect of cryoprotectan and freeze-drying process. *Dryns technology* 25(5) 809-819.
- Christos Liolios, Konstantia Graikou, Eleni Skaltsa y Ioanna Chinou. 2010. Dittany of Crete: A botanical and ethnopharmacological review. *Journal o ethnopharmacology.*; 131: 229-241
- Chuan-Chuan L., Y. Hung-Yin, C. Ming-Hung, S. Chin-Min, C. Hwan-wen, Y. WenJen, L. Mei-Hwa 2014. Preparation of curcumin microemulsions with food- 54 grade soybean oil/lecithin and their cytotoxicity on the HepG2 cell line, *Food Chemistry*, 154: pp. 282-290.
- Cleff M.B., Meinerz A.R.M., Faria R.O., Xavier M.O., Santin R., Nascente P.N., Rodrigues M.R. y Meirelles M.C.A. 2010. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 62: 1291-1294.
- Chemistry.ccsu.edu Cloruro férrico página de prueba de piridina
Consultado el 11 de septiembre de 2013.
- Cooke, D. E. L.; V. Young, P. R. J. Birch, R. Thoth, F. Gourlay, J. P. Day, S. F. Carnegie and J. M. Duncan. 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora* infectants populations in Scotland (1995-97). *Plant Physiology* 52:181-192.
- Correa, M. G. P., y Marin, J. M. 2002. O-serogroups, ease gene and EAF plasmid in *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis in

Brazil. Veterinary Microbiology. 85:125-132.

Cotrino BV 2003. Como se determina la calidad microbiológica de la leche cruda. Consultado

<http://www.lmvltda.com/cms/index.php?section=19>.

Cubero, N; Monferrer, A; Villalata, J. 2002. Aditivos alimentarios. Mundi-Prensa, España.

Davies J.T., (1959) "Proc. 2nd Int. Congr. Surface Activity", Butterworths, London., Vol I, 426

Dhankhar Poonam Homogenization Fundamentals IOSR Journal of Engineering 2014 (IOSRJEN) www.iosrjen.org ISSN (e): 2250-3021, ISSN (p): 2278-8719.

Vol. 04, Issue 05 (May. 2014), ||V4|| PP 01-08

De Castro Santana R, Kawazoe Sato A C, Lopes da Cunha R. 2012. Emulsions stabilized by heattreated collagen fibers. Food Hydrocolloids 2012; 26(1) 73-81

DeHoog, E. 2011. Emulsions for new functionalites prepared foods. 180(6):99- 115.

Delgado, H; Zambrano, L. 2003. Identificación de los agentes causales de la mastitis en bovinos lecheros en los cantones: Montecristi, Rocafuerte, Portoviejo y Santa Ana, mediante cultivo en agar nutritivo y agar MacConkey y reconocimiento por tinción de Gram. Tesis Dr. Medicina Veterinaria y Zootecnia. UTM. Portoviejo-Manabí. EC. p.81.

Delaquis, P., Stanich, K., Girard, B., y Mazza, G., 2002. Antimicrobial activity of individual and mixes fractions, of dill, cilantro, coriander, and eucalyptus essential Oils. International Journal of Food Microbiology. 74, (1-2): 101- 109.

Díaz Nieves Abril Bárcena Ruiz. Antonio, Fernández Reyes Emilio, Galván Cejudo Aurora, Jorrín Novo Jesús, Peinado Peinado José, Meléndez-

- Valdés Fermín Toribio, Túnez Fiñana Isaac, 2004. Espectrometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas.
- Dickinson, E. (1992a). Introduction to food colloids. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. Food hydrocolloids, 23(6), 1473-1482.
- Driscoll DF., 2007, Calidad, estabilidad y seguridad de las emulsiones lipídicas Clin Nutr 2., Pp 11 – 15 Ver registro.
- Dyson, Freeman. 1985. "El cuerpo, la carne y el demonio". En Comunicación con inteligencias extraterrestres, editado por Carl Sagan, 345-358. México: Planeta
- Dodd, F. H., D. R. Westgarth, and T. K. Griffin. 1977. Strategy of mastiffs control. J. Am. Vet. Med. Assoc. 170:1124.
- Eduard Smulders, Wolfgang von Rybinski, Eric Sung, Wilfried Rähse, Josef Steber, Frederike Wiebel, Anette Nordskog —Laundry, 2007. DetergentsII in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim.
- Erskine, R. J. 1998. Recombinant bovine interleukin-2 and dry cow therapy: efficacy to cure and prevent intramammary infections, safety, and effect on gestation. J. Dairy Sci. 81(1): 107-115
- Fagundes H., Barchesi L., Nader A., Ferreira L.M. y Oliveira C.A.F. 2010. Occurrence of Staphylococcus aureus in raw milk produced in dairy farms in Sao Paulo State, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 41(2): 376-380
- Fernández-L. Katherine; Viña-Patiño, Amparo; Murillo-P, Elizabeth y Méndez, Jonh Jairo. 2007. Actividad antioxidante y antimicrobial de los volátiles de cuatro variedades de albahacas cultivadas en el departamento del Tolima. Scientia Et Technica. XIII (33):339-341.
- Fisher, K. y Phillips, C. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils

- in Food: in citrus the answer? Food Science and Technology. 19(3): 156-164.
- Flesh, Kurt. 2000. Nicolás de Cusa. México: Siglo XXI.
- Florence AT, Whitehill D., 1982; Stabilization of water/oil/water multiple emulsions by polymerization of the aqueous phases. The Journal of Pharmacy and Pharmacology. 34(11):687-691
- Friberg, S.; Larsson, K.; Sjoblom, J. 2004. Orthokinetic Stability of Food Emulsions, en: Food emulsions. 4^a Edición. New York, Marcel Dekker: 327 – 352
- Gallegos J. 2003. Manual de Prácticas de Microbiología de Alimentos: Texto básico. Riobamba.
- Garay, M. H., Torrez, M., I. 2015 Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. —orégano sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, in vitro. Cajamarca.
- García R. 2014. Obtención de aceite esencial de citronela (*Cymbopogon winterianus*) extraído por arrastre con vapor a escala piloto: estudio de la influencia de variables en el rendimiento y la calidad del aceite. Tesis de Maestría. Argentina. Universidad Tecnológica Nacional.
- Gadamer, Hans Georg. 1993. Verdad y método. Salamanca: Taurus.
- Garduno, C. Barrera L. y Rios, Y. 2010. Evaluation of the fungicidal activity of leaves powders and extracts of fifteen mexican plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *gadioli* (Massey) Snyder and Hansen. Plant Pathology Journal 9: 103-111.
- Gautam K.K. y Tyagi V.K. (2006). Microbial surfactants: a review. J. Oleo Sci. 55, 155–166.
- Gilling DH, Kitajima M, Torrey JT, Bright KR (2014a) Eficacia antiviral y mecanismos de acción del aceite esencial de orégano y su componente principal carvacrol contra el norovirus murino. J Appl

Microbiol 116:1149–1163

Gautam K.K. y Tyagi V.K. (2006). Microbial surfactants: a review. J. Oleo Sci. 55, 155–166.

Godinho, K.S. and A.J. Bramley. 1980. The efficacy of teat dips of differing persistence on teat skin in preventing intramammary infection by *Streptococcus uberis* and *Escherichia coli* in dry cows. Br. Vet. J. 136:574.

Gogate, PR. Sutkar, 2011 VS. AB Pandit Reactores sonoquímicos, importantes consideraciones de diseño y ampliación con un énfasis especial en sistemas heterogéneos Chem Ing. J., 166 (3) (2011), pp. 1.066 - 1 08, 10.1016 / j.cej.2010.11.069.

Ghosh V., A. Mukharjee, N. Chandeasekaran. 2012. Mustard oil microemulsion formulation and evaluation of bacterial activity Int. J. Pharm. Pharm. Sci.

González, R. Giraudo J, Busso J. 1980. Investigación de mastitis subclínicas: II Agentes etiológicos bacterianos. Rev. Med. Vet. (Bs. As.); 61: 225-234.

Guo X, Ye X, Sun Y, Wu D, Wu N, Hu YQ., 2014. Efectos de ultrasonido en la cinética de degradación, estructura y actividad antioxidante del pepino de mar fucoidan. J Agric Food Chem 62: 1088–1095. PMID: 24437708 Ver artículoPubMed / NCBI Google Académico

Griffing W.C., (1954), J. Soc. Cosmet Chem, 5; 249.

Guasch Torres Josep. 2006, Reflexiones sobre el análisis Enológico (II): El Laboratorio Enológico (1ª) "Enólogos" nº 41

Guerrero, E.; S. Solis, F. Hernández, A. Flores, V. Sandoval y D. Jasso. 2007. Actividad biológica invitro de extractos de *Flourensia cernua* D. C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. y *Sacc y*

Penicillium digitatum (Pers.: Fr.) Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología 25: 48-53.

- Guginski G, Luiz AP, Silva MD, Massaro M, Martins DF, Chaves J, Mattos RW, Silveira D, Ferreira VM, Calixto JB, Santos AR., 2009. Mecanismos involucrados en la antinocicepción causada por el extracto etanólico obtenido de las hojas de *Melissa officinalis* (bálsamo de limón) en ratones. Pharmacol. Biochem. Behav.; 93: 10–6.
- Günther, E. 1948. The Essential Oils. Vol. 1: History and origin in Plants Production Analysis. Krieger Publishing: New York, USA,
- Gupta, V. K., y Suhas, 2009. Application of low-cost adsorbents for dye removal- a 240 review. J. Environ. Manage., 90, 2313-2342.
- Gutiérrez R, Roa ML. 2003, Determinación de algunos compuestos químicos en cuatro plantas arbóreas forrajeras. Rev Col Cienc Pec.; 16: 2.
- Guzey, D., y McClements, D. J., 2006. Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. Advances in colloid and interface science, 128, 227-248.
- Harris D. C., 2001. Análisis Químico Cuantitativo 2ª ed., Ed. Reverte. Capítulos 14 al 18 C. Baird, Química Ambiental, Ed. Reverté Capítulo 9.
- Háuad, L. 2010, Manual de Fitoterapia, 1ra. ed. México, Trillas, 176 p.
- Hedreul, C., Frens, g., 2001. Foam stability. Colloids and surfaces A. 186(1- 2):7382.
- Harmon, J.R., 1996. Controlando la mastitis causada por patógenos contagiosos. Consejo Nacional de Mastitis. Queretaro, México: 11-18
- Higson, S. P. J. Química Analítica. 1ª ed. 2007. Capitula 5. Ed. Mc Graw

Hill.

Holley, R. y Patel, D., 2005. Improvement In shelf-life and safety on perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobial. *Food Microbiology* 22(4) 273-292.

Hristov An, Lee C, Cassidy T, Heyler K, Tekippe JA, Varga GA, Corl B, Brandt RC. 2013. Effect of *Origanum vulgare* L. leaves on rumen fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 96(2):1189-202. doi: 10.3168/jds.2012-5975

Hurtado-Dianderas, Eulogio; Rivera, Félix., 2006 El requerimiento del marco epistemológico en las tesis de post grado. *Gestión en el Tercer Milenio*, Perú, v. 9, n. 17. P. 103-105, jul. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/publicaciones/administracion/n17_2006/a10.pdf. Acceso: 11 de abril del 2015

Hsieh YC, Choudhry MA, Yu HP *et al.*, 2006. Inhibition on cardiac PGC-1 alpha expression abolishes ERbeta agonist-mediated cardio protection following trauma-hemorrhage *et al.*, 2006. *FASEB J* 20:1109-1117.

Ibrahim HMM, Ahmed AM, El-seedy YY., 2015. El-Khodery SA Distribución de bacterias gramnegativas multirresistentes que causan mastitis clínica en vacas lecheras. *Glob Vet.*; 15: 268-277.

Ignat I., Volf I., 2011. Popa VI Una revisión crítica de los métodos para la caracterización de compuestos polifenólicos en frutas y verduras. *Food Chem.*; 126: 1821–1835. doi: 10.1016 / j. foodchem.2010.12 PubMed Google Scholar.

Ippincott Williams y Wilkins, 2006, Remington The Science and Practice of Pharmacy, 21st edition, United States of America, página 332, 759-765.

Isada C. M., L. K. Bernard, M. P. Goldman, L. D. Gray, J. A. Aberg, 2001

"Infectious Diseases Handbook including Antimicrobial Therapy & Diagnostic Test/Procedures.", pp. 163,

ISO 13366-2/IDF148-2/2006. Enumeración de células somáticas en leche LCL- PE-02 CSS. Referencia Laboratorio de Ensayo de Calidad de la leche de la Universidad Politécnica Salesiana acreditado por SAE N.º SAE LEN-17-008.

IUPAC. 2001 Surface Active Agents, Manual of Symbols and Terminology for Physicochemical Quantities and Units, International Union of Pure and Applied Chemistry. http://old.iupac.org/reports/2001/colloid_2001/manual_of_s_and_t/node36.html. Fiche de acceso: 29/12/2016.

Jafari M, Assadpoor E., Y. He, B. Bhandari., 2008. Re-coalescencia de gotas de emulsión durante la emulsificación de alta energía Food Hydrocolloid, 22 (), págs. 1191 – 1202.

Ana Jiménez Zabala, Mónica Otazua Font, Pepa Maiztegi Gallastegi, Elena Serrano Ibarbia, Ana Juaristi Arrieta, Loreto Santa Marina Rodríguez, 2011. Situación de los desinfectantes de uso ambiental y en industria alimentaria registrados en España tras la publicación de la directiva 98/8/ce. Rev Esp Salud Pública; 85: 175-188.

Khanna N, Bhatia J., 2003. Acción anti nociceptiva de *Ocimum sanctum* (Tulsi) en ratones: posibles mecanismos implicados. J. Ethnopharmacology. 2003; 88: 293–6.

Kalenka, D. y Kucnika, A. 2003. Antibacterial and Antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry. 10(10). 813-829.

Kim DH, Lim JJ, Lee JJ, Kim DG, Chang HH, Lee SJ, Lee YB, Chang DI, Lee HJ, Min WG, Kim SH, Oh KY, Kim S., 2009. Dehydrating and bacterial elimination effects of fecal dehydrating system for reducing bovine mastitis derived from environmental contamination. Korean J Vet Res 2009, 49, 257-263.

- Khoddami, A; Wilkes, M., Roberts, T.H. 2013. "Técnicas para el análisis de compuestos fenólicos de plantas". *Moléculas*. 18 (2): 2328–75. CiteSeerX 10.1.1.386.9960. doi: 10.3390 / moléculas18022328. PMC 6270361. PMID 23429347.
- Klepacka, J. Gujska, E. Michalak, J., 2011. "Compuestos fenólicos como factores distintivos de cultivares y variedades en algunos productos vegetales". *Alimentos de plantas Hum Nutr*. 66 (1): 64–69. doi: 10.1007 / s11130-010-0205-1. PMC 3079089. PMID 21243436
- Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, N., y Lanaras, T. 1997. Autumn essential oils of Greek oregano, *Phytochemistry*. 44:883-886.
- Kralova I, Sjöblom J. Surfactans used in food industry: a review. *Journal of Dispersion Science and Technology* 2009; 30(9) 1363-1383.
- Kuentz, M., 2011. Oral self-emulsifying drug delivery systems, from biopharmaceutical to technical formulation aspects. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 21(1), 17-26.
- Kaur, D; Wani, AA; Singh, DP; Sogi, DS. 2011. Shelf Life Enhancement of Butter, IceCream, and Mayonnaise by Addition of Lycopene. *International Journal of Food Properties* 14(6):1217-1231
- Leff, Enrique. 2007. *Aventuras de la epistemología ambiental*. México: Siglo XXI
- Leff, Enrique, coord. 2000a., 2007. *La complejidad ambiental*. México: Siglo XXI.
- Leal-Calderon F, Schmitt V, Babette J., 2007a. Introduction. In: *Emulsion Science Basic Principles*, second edition. New York: Springer; p1-4.
- Leroux, P. 2003. Mode of action of agrochemical towards plant pathogens. *Comptos Rundunes Biologías* 326: 9-21.
- Leto, C. y Salomene, A. 1996. Bio-agronomical behavior in *Sicilian Organum* ecotypes. Proceedings of the IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) International Workshop on Oregano. 8-12 May.

CIHEAM, Valenzano, Bari, Italy

- Li, J., Ye, F., Lei, L., Zhao, G., 2018. Combined effects of octenyl succinate and oregano essential oil on sweet potato starch films with an emphasis on water resistance. *Int. J. Biol. Macromol.* 115, 547–553.
- López-Malo. A., Palou. E, Leon-Crúz. R. y Alzamora. S., 2015. Mixtures of natural and synthetic antifungal agents. *Avances in Food mycology* 571(4): 261-286.
- López, Martín., 2011. Brote de enfermedad alimentaria en la localidad de El Huecú, provincia de Neuquén. Naquén-Argentina, *Revista Argentina de Mmicrobiología*, pp 198-203
- Lugo-Medina, Garcia-Gutierrez, Ruelas-Ayala, 2010. Nanotecnologías y encapsulación de plaguicidas.
- Lovelock, James. 2007. La venganza de la tierra. Madrid: Planeta.
- Ma Y, Ryan C, Barbano DM, Galton DM, Rudan MA, Boor KJ., 2003. Effects of somatic cell count on quality and shelflife of pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci* 2003, 83, 264-274
- Mahdi, J. S. 2009. Encapsulation of nano emulsions by spray drying. Lambert. Academic. Publishing. Iran. 19-23p.
- McDonald JS. 1984. Streptococcal and staphylococcal mastitis. *Vet Clin North Am Large Anim Pract.*; 2: 269-285.
- McDermott P.F., S. M. Bodeis-Jones, T. R. Fritsche, R. N. Jones, R. D. Walke, 2005. "Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejune* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents." *Clinical Microbiology and Infection*, Vol. 43, pp. 6136,
- Márquez, N., 1999. Química de los surfactantes usados en recuperaciones mejoradas del petróleo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Química*, 22: 14-18.
- Márquez, A., Palazolo, G., Wagner, J., 2005. Emulsiones tipo crema

preparadas a base de leche de soja 2: Efecto de la agitación controlada sobre la reología de las cremas. *Grasas y Aceites* Vol. 56. Fasc. 2 (2005), 89-95s cremas.

- Martinez J. 2005. Desinfección. *Medicina Veterinaria*. Medellin Colombia
- Martins N, Barros L, Santos-Buelga C, Henriques M, Silva S, Ferreira IC Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry*. 2014; 158: 73-80.
- Marrelli M, Cristaldi B, Menichini F y Conforti F., 2015. Inhibitory effects of wild dietary plants on lipid peroxidation and on the proliferation of human cancer cells. *Food Chemical Toxicology*. 2015; 86: 16-24.
- McClements, D. 2007. Critical reviews of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical reviews in food science y nutrition*, 47(7): 611-649.
- McClements, D.J. 2005. Food emulsions: principles, practice, and techniques. CRC Press. Boca Raton. 295-33p.
- McClements, D. J., 2010. Emulsion design to improve the delivery of functional lipophilic components. *Annual review of food science and technology*, 1, 241-269.
- McClements D J. 2005b Colloidal interactions. In: *Food emulsions, principles, practices and techniques*, second edition. New York: CRC Press; 2005b. p53 94.
- Medina, C. M. y Montaldo, V. H., 2003. El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. IV Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes. México. pp. 21-23
- Mehmet Hakki Alma, Ahmet Mavi, Ali Yildirim, Metin Digrak, y Toshifumi Hirata., 2003. Screening Chemical Composition and in Vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oils from

- Origanum syriacum* L. Growing in Turkey. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 26: 1725- 1729.
- Molero, J., Consuelo, M., Camino, S., y Alonso, V., 2006. Química física para ingenieros químicos (primera Ed). Valencia: Serve de Publication's
- Moreno-Trejo MB, Sánchez Domínguez M., 2016. Mesquite gum as a novel reducing and stabilizing agent for modified tollens synthesis of highly concentrated Ag nanoparticles. Materials. 9(10):817.
- Morin, Edgar. 2003. Introducción al pensamiento complejo. Barcelona: Gedisa.
- Morresey, P. R. 1999. Bovine Mastitis. In: Howard JL, Smith RA, editor. Current Veterinary Therapy 4 Food Animal Practice. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co. pp. 563-568.
- Myers, D., 1992. Surfactant Science Technology, (2^o Edition). VSH Publisher. Inc. Nueva York. EE. UU
- Natzke, R. P. 1981. Elements of mastitis control. J. Dairy Sci. 64:1431.
- Nazia Masood Ahmed Chaudhry, Sabahat Saeed y Perween Tariq., 2007. Antibacterial effects of oregano (*Origanum vulgare*) against gram negative
- Nieves Abril Díaz, J. Antonio Bárcena Ruiz Emilio Fernández Reyes, Aurora Galván Cejudo, Jesús Jorrín Novo, José Peinado Peinado, Fermín Toribio Meléndez-Valdés, Isaac Túnez Fiñana 2007. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba, Facultad de Medicina, Avda. Menéndez Pedal s/n, 14004-Córdoba.bacilli. Pakistan Journal of Botany. 39: 609-613.
- Ninkov, D. 2005. Pharmaceutical composition suitable for use against Histaminases. United States Patent No. 5990, 178.
- Nitsas FA. 2000. Pharmaceutical composition containing herbal-based

active ingredients; methods for preparing same and uses of same for medical and veterinary purposes. United States Patent 6, 106, 838, 22 August.

Norma Afnor NFT 75-103. 1976. Determination de L'Indice D'acide (1969). NMX-K-418.

Norma Técnica Peruana NTP 319.081: 1974. Aceites esenciales: Determinación de la densidad y densidad relativa.

Nostro A, Sudano A., Besignano G., Marino A., Cannatelli M., Pizziment F., *et al.*, Effects of oregano, carvacrol and timol, on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermis* biofilms. Journal of medical Microbiology, 2007.

Olsen, Eugene. Métodos ópticos de análisis. Editorial Reverté. S.A. Barcelona, 1990. p.p 94-95.

Oviedo-Boyso J., Valdez-Alarcón J.J., Cajero-Juárez M., Ochoa-Zarzosa A., López-Meza J., Bravo- Patiño A., Baizabal-Aguirre M. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. J. Infect. 54: 399-409.

Pasqualie, R.C., Sacco, N., Bregni, C., 2009. The studies on hydrophilic-lipophilic balance (HLB): sixty years after William C. Griffin's pioneer work (1949-2009). Se.Di.C.I. - Servicio de Difusión de la Creación Intelectual UNLP (inglés)

Paula, S.; Sues, W.; Tuchtenhagen, J.; Blume, A., The Journal of Physical Chemistry 1995, 99, (30), 11742-1175.

Pellegrino, MS; Frola, ID; Odierno, LM; Bogni, CI. 2011. Mastitis Bovina: Resistencia a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* asiladas de leche REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. 12, núm. 7 pp. 1- 14 Veterinaria Organización Málaga, España.

Pilau MR, Alves SH, Weiblen R, Arenhart S, Cueto AP, Lovato LT., 2011. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential

oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Braz J Microbiol* 42:1616–1624

- Plummer, DT., 1981. *Práctica bioquímica*. Editorial McGrawHill. Latinoamericana. Traducido de la segunda edición. Bogotá-Colombia.
- Popper, Karl. 1980. *La lógica de la investigación científica*. Madrid: Tecnos.
- Prabhu KN, Isloor S, Hegde R, Rathnamma D, Veeregowda BM, Narasimha Murthy HN, Shome R, Suryanarayana VVS. 2013. Desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de aislamientos estreptocócicos predominantes que causan mastitis bovina subclínica. *Indian J. Biotechnol.*; 12: 208–212
- Pyórálá, S. 2002b. Antimicrobial treatment of Mastitis - Choice of the Route of Administration and Efficacy. Institute of Animal Health/Milk Development Council. Proceeding of the British Mastitis Conference. pp 20-29.
- Rabello RF, CR Souza, RS Duarte, RMM Lopes, LM Teixeira, ACD Castro. 2005. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Dairy Sci.* 88(9), 3211-3219.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Blood, D. C., y Hinchcliff, K. W. 2002. *Medicina Veterinaria. Mastitis Bovina*. 9ª ed. Vol. I. Ed. Mcgraw-Hill. Madrid. pp. 728, 810.
- Ramirez M., Bullon J., Anderez J., Mira I., Salanger J. L., Drop size distribution bimodality and its effect on O/W emulsion viscosity. *J. Dispersion Sci. Technology*, 23 (1/3) 309-321 (2002). –
- Rampone H, Bogni C, Giraudo J, Calzolari A. 1993. Identification of staphylococci from bovine milk in Argentina. *Zbl. Bakt.*; 279: 537-543.
- Rao, M.A. 1999. *Rheology's of fluids and semisolid foods: principles and*

- applications. Springer. New York. 48-50p.
- Rechinger KH, Druk A. Flora Iranica. Pastar: No. 150. Labiatae. Academia de Druck Verlagsantalt; 1982. pp. 150-151.
- Remington, R. 2003. The science and practice of pharmacies. Medica pan Americana. Philadelphia 859-867p.
- Reyes-Jurado, F., Palou, E., y López-Malo., 2014. Método de determinación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los compuestos químicos de los aceites esenciales. Universidad de las Américas Puebla.
- Ríos, F., 2014. Comportamiento ambiental de tensoactivos comerciales: biodegradabilidad, toxicidad y ozonización. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, Colombia.
- Rivera Calo, J.; Crandall, P. G.; O'Bryan, C.A.; Ricke, S.C., 2015. Essential oils as, antimicrobials in food systems - A review. Food Control, 54: 111 – 119.
- Robbins, Rebecca J., 2003. "Ácidos fenólicos en los alimentos: una visión general de la metodología analítica". Revista de Química Agrícola y Alimentaria. 51 (10): 2866–2887. doi: 10.1021 / jf026182t. PMID 12720366
- Rodríguez, A; Morales, D.y Ramírez, M. 2000. Efecto de extractos vegetales in vitro sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos. Cultivos Tropicales 21 (2): 79-82.
- Rodríguez-García, I., 2013. Aceite esencial de Orégano Adicionado a Recubrimientos de Pectina como Tratamiento Antifúngico, Antioxidante y Saborizante en Frutos de Tomate. Maestría en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Hermosillo, Sonora
- Rosen, M. J., 2004. Surfactants and Interfacial Phenomena. 3rd ed.; Wiley-Intercedence: Hoboken.

- Russo M, Galletti GC, Bocchini P, Carnacini A. 1998. Essential oil chemical compositions of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *Hirtium*). Netsmart; A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis, I. Inflorescences. J Agric Food Chem.
- Saeed S y Tariq P. 2009. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. Pakistan Journal of Pharmaceutical Science. 22: 421-424.
- Singh A., Van Hamme JD., Ward OP., 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. Biotechnol Adv 25:99–121. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.10.004.
- Sahin F., Gulluce M., Daferera A.D., Sökmen E.M., Sökmen F.M., Polission N.D., Agar C.H. y Ozer G. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control. 15: 549-5557.
- Salager J., 1998. Formulación HLB, PIT, R de Winsor, Laboratorio de formulación, interfases reología y procesos, Cuaderno FIRP S210A: pp.1- 16.
- Salager, J.L. y Anton de Salager, R. (1992). Formulación. Cuaderno FIRP 210. HLB, PIT y R de Winsor. Laboratorio de Formulación, Interfases, Reología y Procesos. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Salager, S., Tyroide, E., Celis, M., Salager, J., 2001. Influence of the Stirrer Initial Position on Emulsion Morphology. Making use of the Local Water-to-Oil Ratio Concept for Formulation Engineering Purpose. Indust. Eng. Chem. Res. 40; pp. 4808-4814.
- Salager, J.-L.; (2002). Surfactantes. Tipos y Usos. Cuaderno FIRP S300-A. Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería - Universidad de los Andes, Mérida –Venezuela.

- Salvia-Trujillo, L.; Rojas-Grau, A.; Soliva-Fortuny, R.; Martìn-Belloso, O., 2015. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food grade emulsions and nano emulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocolloids*, 43: 547 – 556.
- Samaha, H. A.; Haggag, Y. N.; Nossair, M. A.; Ayoub, M. A. y Alla, A. 2012 Epidemiological Survey on Environmental Bacterial Pathogen Causing Mastitis in Cattle. ISSN 110-2047 Alex. J. Vet. Science Vol. 37 N^o.1: (41--47).
- Sánchez, M. F. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. 1ra. edición. Editorial Aiyana. España. 7-14. pp. Links.
- Sanchez-Dominguez M, Pemartin K, Boutonnet M., 2012. Preparation of inorganic nanoparticles in oil-in-water microemulsions: A soft and versatile approach. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2012;17(5):297-305. DOI: 10.1016/j.cocis.2012.06.007.
- Sandoval, E.A., 2008. "Coacervación compleja con mezclas de tres polisacáridos (Goma Árábica, goma de Mezquite, Quitosano) y su efecto en la estabilidad de emulsiones simples". Universidad Autónoma Metropolitana
- Sangwan NS, Farooqi AHA, Shabih F, Sangwan RS., 2001. Regulation of essential oil production in plants. *Plant Growth Regul.* 34: 3-21.
- Servant, G., Laborde, JL, Hita, A., Caltagirone, JP, Gérard, A., 2001. Dinámica espacio temporal de las nubes de burbujas de cavitación en un reactor de baja frecuencia: comparación entre resultados teóricos y experimentales. *Ultrasonido Sonochem* 8 (3), págs. 163–74. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11441594> >.
- Schwuger, M., J., Bartnik, F., 1980. M. Interaction of surf ants with on proteins, enzymes and membranes. In Goldhaber C., Ed Anionic surf ants-Biochemistry, Toxicology, Dermatology. Marcel Dekker, New York, USA pp 1-49.
- Sibila, MA 2008. Evaluación de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de

tensoactivos en el medio acuático marino. Tesis Doctoral departamento de Ingeniería Química, Tecnologías de Alimento, y Tecnologías del Medio ambiente, Universidad de Cádiz.

- Silva, C., Livings, S., Sher, A., Niranjana, K., Espiga, A., Gumy, J. C., 2004. "Formation and stability of nano-emulsions". *Avances in Colloid and Interface Science*. 109(1): p. 303-318,
- Sixtos, E., 2011. Frecuencia y etiología de la mastitis bovina en Cherán, Michoacán. México: Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo.
- Singh, R.P.; Murthy, K.N.C. y Jayaprakasha, G.K., 2002. —Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Chicago. v. 50, p. 81-86
- Smith KL, DA Todhunter, PS Schoenberger. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J. Dairy Sci.* 68:1531-1553
- Smith, K.L. 1983. Mastitis control — A discussion paper. *J. Dairy Sci.*; 66: 1790.
- Soca, PM; Suarez, YE; Soca, PM; Rivero, J; Fuentes, CM y Alberto, PC. 2005. Comparación de la Incidencia Epizootiológica de la Mastitis Clínica en Dos Rebaños Lecheros Después del Uso del Agua para la Antisepsia Final del Pezón. *Revista Electrónica de Veterinaria* Vol. VI, No. 3: 1-11
- Sökmen M, Serkedjieva J, Daferera D, Gulluce M, Polissiou M, Tepe B, *et al.* 2004; *In vitro* antioxidant, antimicrobial, and antiviral activities of the essential oil and various extracts from herbal parts and callus cultures of *Origanum acutene*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004; 52: 3309- 3312.
- Solórzano-Santos, F., y Miranda-Novales, M., 2011. Essential Oils from Aromatic Herbs as Antimicrobial Agents. *Current Opinion in Biotechnology*.

- Soto, M.R., 2011. Control de calidad de aceites vegetales. Recuperado el 15 de octubre del 2013 de <http://www.slideshare.net/>
- Southall N T, Dill K A, Haymet A D J., 2002. A View of the Hydrophobic Effect. *The Journal of Physical Chemistry B*; 106(3) 521–533
- Stoyanov, S.; Rehage, H.; Paunov, V. 2003. Novel surface tension isotherm for surfactants based on local density functional theory. *Phys. Rev. Lett* 91(8): 86-102
- Tanko Y, Magaji GM, Yerima M, Magaji RA, Mohammed A., 2008. Actividades anti- nociceptivas y antiinflamatorias del extracto de hojas acuosas de *Ocimum gratissimum* (Labiata) en roedores. *Afr. J. Tradit. Complemento. Alternativa Medicina.*; 5: 141–146.
- Tekippe JA, Hristov AN, Heyler KS, Cassidy TW, Zheljazkov VD, Ferreira JFS, Karnati SK, Varga GA. 2011. Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94: 5065-5079
- Toledo Palomino María, 2004. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*) sobre distintas cepas aisladas de alimentos.
- Torrenegra Alarcon, M 2014 Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar extraído de especies de orégano (*Origanum vulgare*, orégano –borde blanco (*Origanum vulgare* spp) y oreganito (*Lippia alba mill*). Cultivado en la zona norte de Bolívar. Universidad de Colombia, Cartagena, 2014.
- Turker, A., y Usta, C. 2008, *J. Nat. Prod. Res.*, 22, 136.
- Universidad de Alicante. Servicios técnicos de Investigación. Espectroscopía ultravioleta visible. Fundamento Disponible en: <http://sstti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-rayos-x-de-monocristal-y-espectroscopias-vibracional-y-optica/espectroscopia-ultravioleta-visible.html>.
- Vargas, T. 2017. Calidad de la leche: visión de la Industria láctea.

Recuperado el 25 de abril de 2017, de Fundación. INLACA; Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV
http://avpa.ula.ve/docuPDFs/xcongreso/P297_CalidadLeche.pdf

Vargas, Azofeifa, Arguedas, W. (10 de noviembre de 2012). Índices de refracción de la quitina, el quitosano y el ácido úrico con aplicación en análisis de color estructural. doi: <http://dx.doi.org/10.7149/OPA.46.1.55>

Vera Palma Ana P., Cevallos Martínez Edison X., 2013. Aprovechamiento sostenible de plantas medicinales en una farmacia natural en la comunidad Balsa en Medio del cantón Bolívar. Escuela Superior Politécnica de Manabí

Vernin, G. Lageot, C. Gaydou, E.M y Parkanyi, C. 2001. Analysis of essential oil of *Lippia graveolens* HBK fom Salvador. Flavour and Fragante Jornal 16:219-226

Viuda - Martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J.; Pérez-Álvarez, J., 2008. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradise L.*) and orange (*Citrus Sinensis L.*) essential oils. Food Control, 19: 1130 – 1138.

Watson, R. R., Preedy, V. R., y Zibadi, S. 2013. Polyphenols in human health and disease (pp. 37-38): Academic Press.

Watts J. Etiological agents of bovine mastitis. Vet. Microbiol. 1988; 16: 41-66

Wellenberg, G. J., van der Poel, W. H. M. y Van Oirschot, J. T., 2002. Viral infections and bovine mastitis: a review. Vet. Microbiol. 88: 27-45.

Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R. E. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Natura protocolos, 3(2), 163- 175

- Wilkinson J.B. y Moore R.J., (1990), *Cosmetología de Harry*, E dígrafos, Madrid, 1990, página 825-828.
- Wood, R.W.; Loomis, A.L., 1927. Physical and Biological Effects of High-Frequency Sound Waves. *Phil. Mag.* 1927, 4, 417--436
- Wolter, W., y Kloppert, B., 2004. Interpretación de los resultados del conteo celular y de la aplicación de la terapia. *Avances en el Diagnóstico y Control de la Mastitis Bovina*. Guadalajara, Jalisco, México. 5 pp.
- Zafalon L.F., Arcaro J.R.P., Nader Filho A., Ferreira L.M., Castelani L. y Benvenuto F. 2008. Investigation of the antimicrobial resistance patterns in *Staphylococcus aureus* isolated in the milking of cows in the lactation. *Revest do Instituto Adolfo Lutz*. 67(2): 118-125.
- Zhen YH, Jin LJ, Li XY, Guo J, Li Z, Zhang BJ, Fang R, Xu YP. Efficacy of specific egg yolk immunoglobulin (Ig.Y) to bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*. *Vet Microbiol* 2009, 133, 317-322
- Zhou, Y., Sun, S., Bei, W., Zahi, M.R., Yuan, Q., Liang, H., 2018. Preparation and antimicrobial activity of oregano essential oil Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. *Int. J. Biol. Macromol.* 112, 7–13.
- Zweifel, C.; Stephan, R. 2012 Spices and herbs as source of *Salmonella*-related foodborne diseases. *Food Res. Int.* 2012, 45, 765–769.

ANEXOS

ANEXO 1. Datos de las variables y x; para la determinación de la concentración de compuestos fenólicos en el extracto acuoso de *Origanum vulgare*.

Data Input X2=x*x; ly=log(y); lx=log(x+0.00001); cards;	y	data	regre; x;
0.087		9.97	
0.122		11	
0.213		12	
0.207		13	
0.363		14	
0.069		9.97	
0.184		11	
0.19		12	
0.2		13	
0.333		14	
0.051		9.97	
0.122		11	
0.195		12	
0.21		13	
0.38		14	
0.1		9.97	
0.105		11	
0.189		12	
0.198		13	
0.3		14	
0.029		9.97	
0.039		11	
0.084		12	
1.532		13	
1.941		14	
0.024		9.97	
0.075		11	
0.095		12	
0.135		13	
0.2		14	
0.153		9.97	
0.183		11	
0.186		12	
0.248		13	
0.269		14	

0.02	9.97
0.025	11
0.045	12
0.085	13
0.208	14
0.004	9.97
0.034	11
0.06	12
0.177	13
1.384	14

```
Proc reg; model y=X;
  model ly=x; model
  ly=lx; model y= x x2;
Run;
```

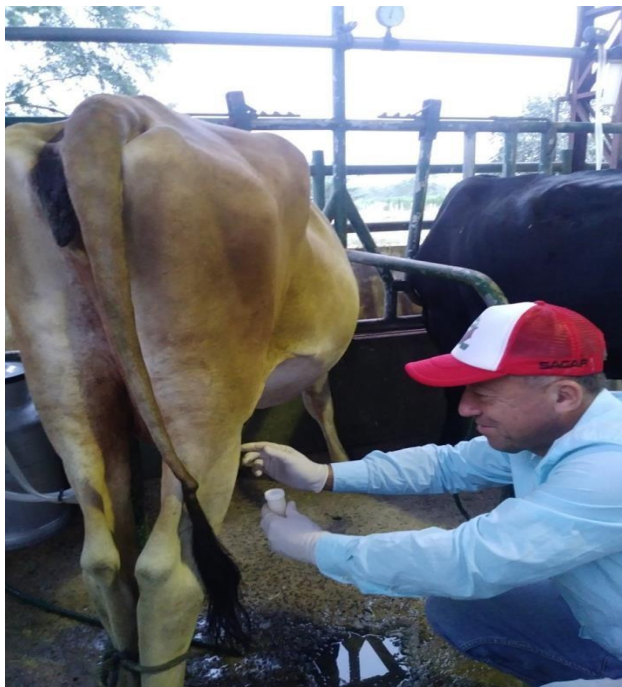
	RCS	UFC1	UFC2
N	10	10	8
Media	2.418E+06	60.000	9.6250
SD	1.749E+06	69.541	16.587
SE Media	553015	21.991	5.8644
C.V.	72.314	115.90	172.33
Minimum	306.00	7.0000	2.0000
Maximum	4.841E+06	240.00	50.000

Tabla 1. Estadística descriptiva para el método ultrasonido

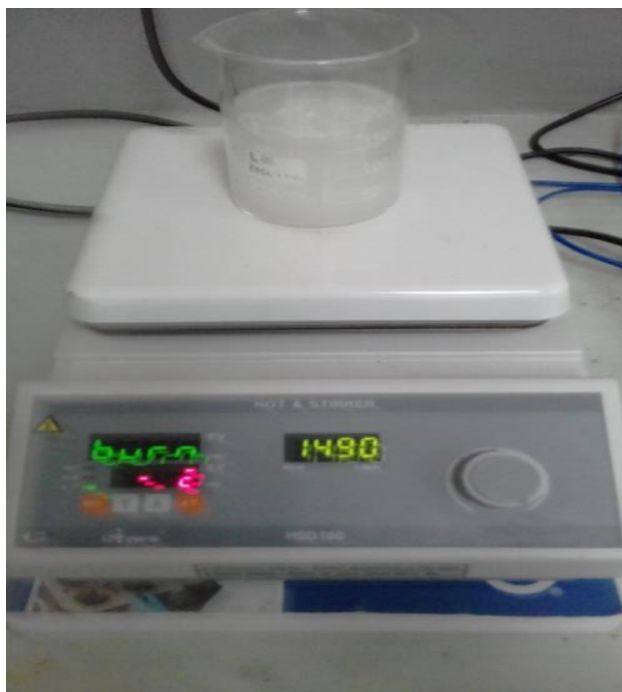
	RCS	UFC1	UFC2
N	10	10	4
Media	2.157E+06	10.800	5.7500
SD	1.542E+06	9.2832	8.1803
SE Media	487527	2.9356	4.0901
C.V.	71.477	85.956	142.27
Minimo	276000	4.0000	1.0000
Maximo	5.528E+06	30.000	18.000

Tabla 2. Estadística descriptiva para el método Agitación magnética

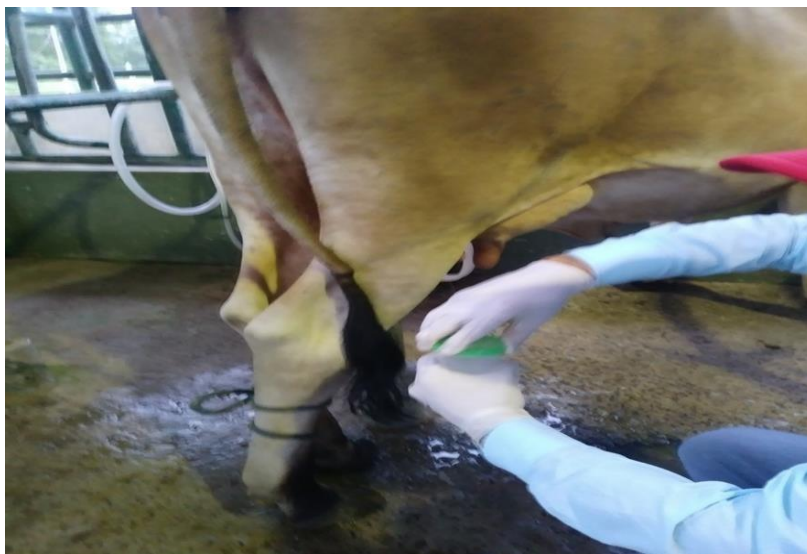
ANEXO 2. Imágenes de la Investigación



Toma de muestra para análisis



Método de Agitación magnética



Toma de muestras UFC/ml



Prueba de campo CMT



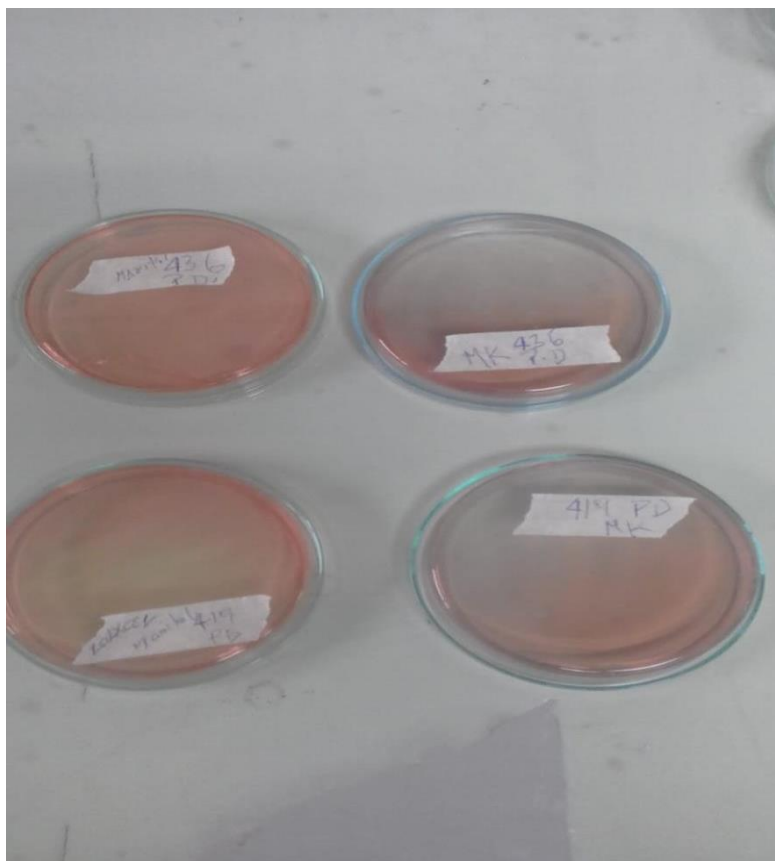
Equipo de destilación con arrastre vapor



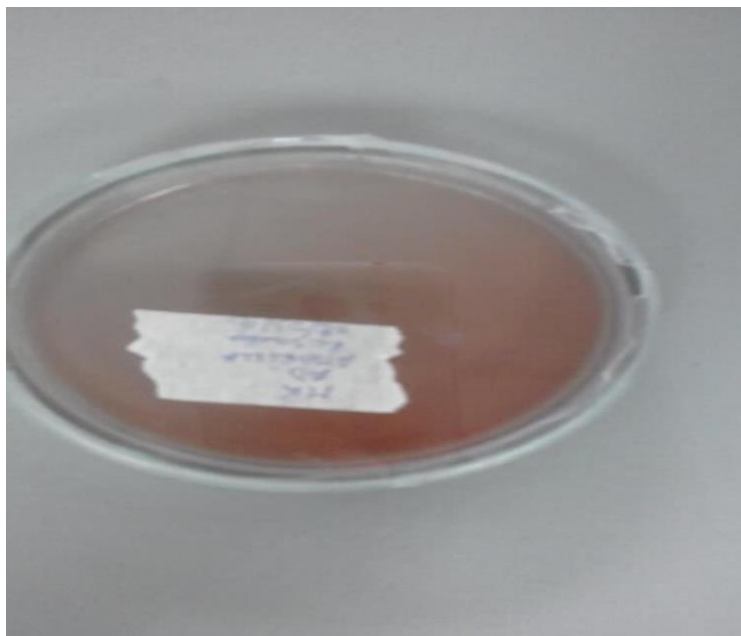
Equipo de ultrasonido para emulsionar



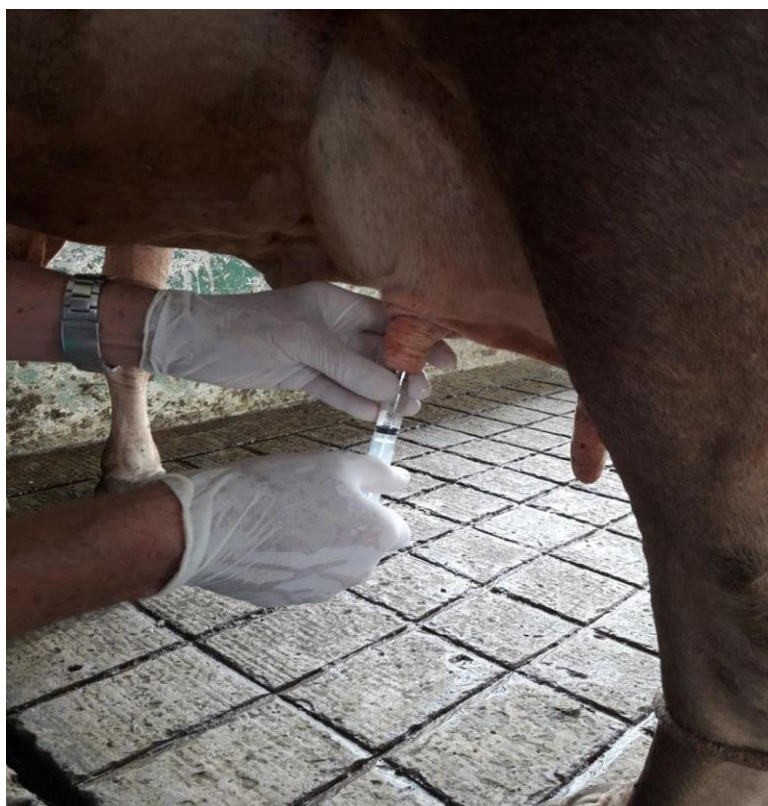
Jeringa y sonda de acero para aplicación



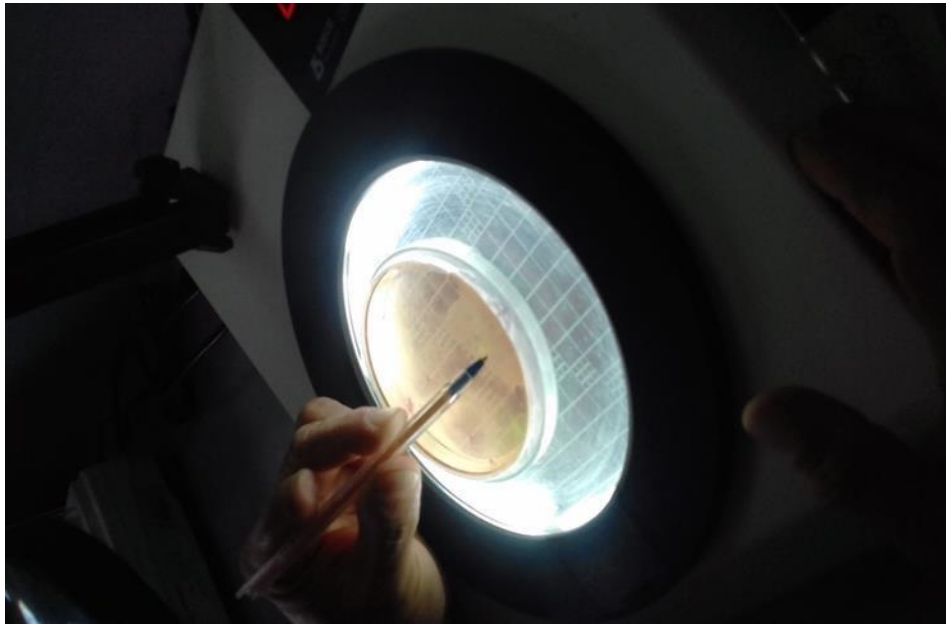
**Medios de cultivo de Manitol y
MacKonkey**



Medio cultivo agar MacCkonkey



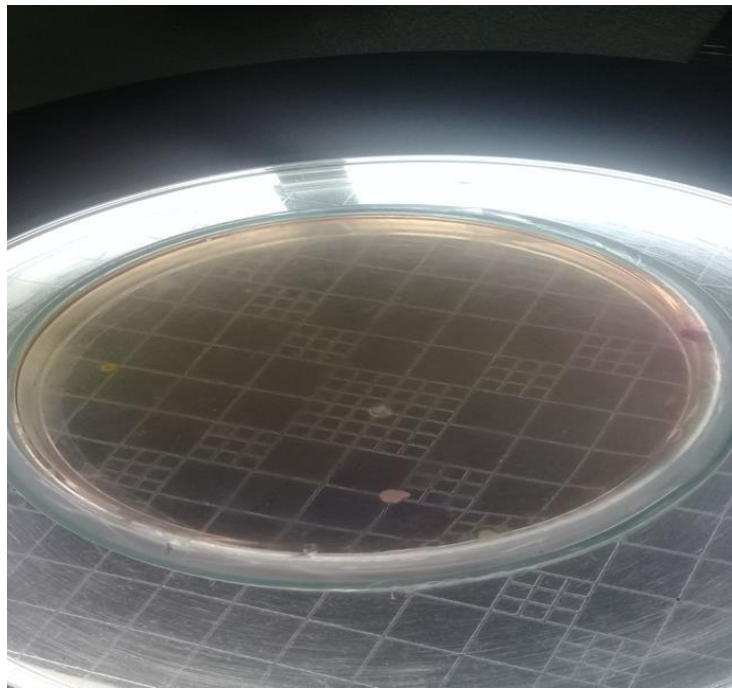
**Aplicación del extracto acuoso
emulsionado**



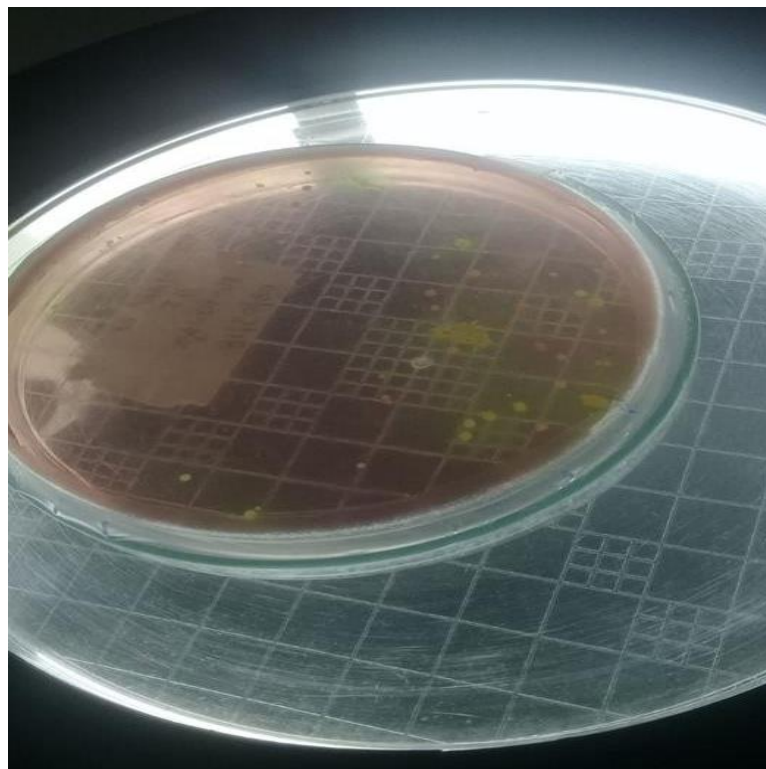
Contando en cámara cuenta colonias



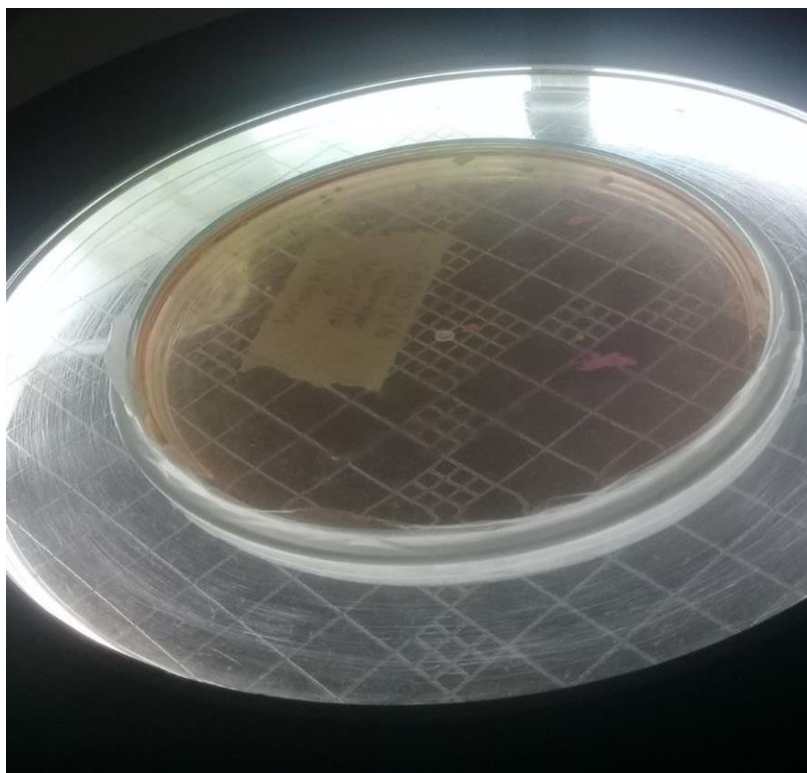
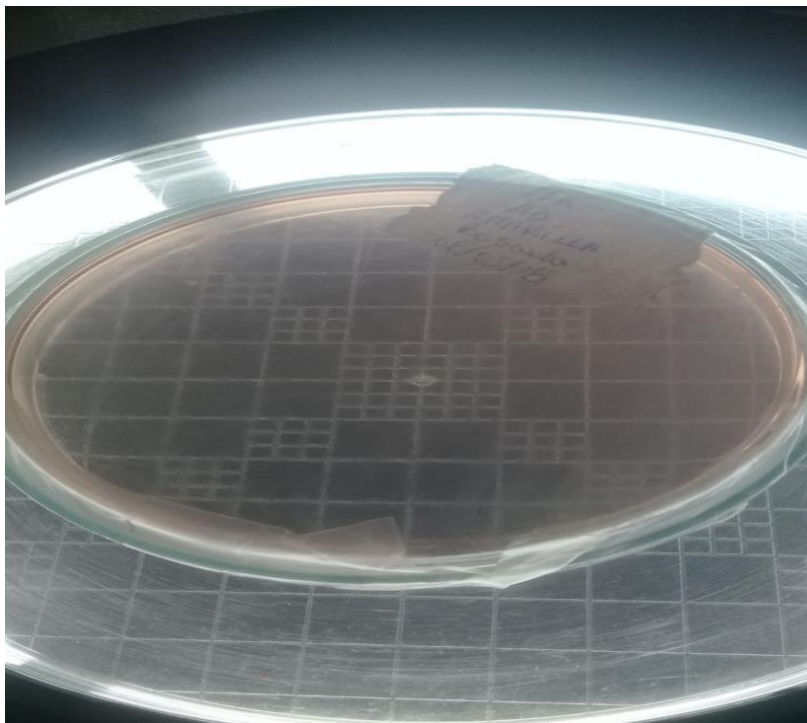
Cámara cuenta colonias



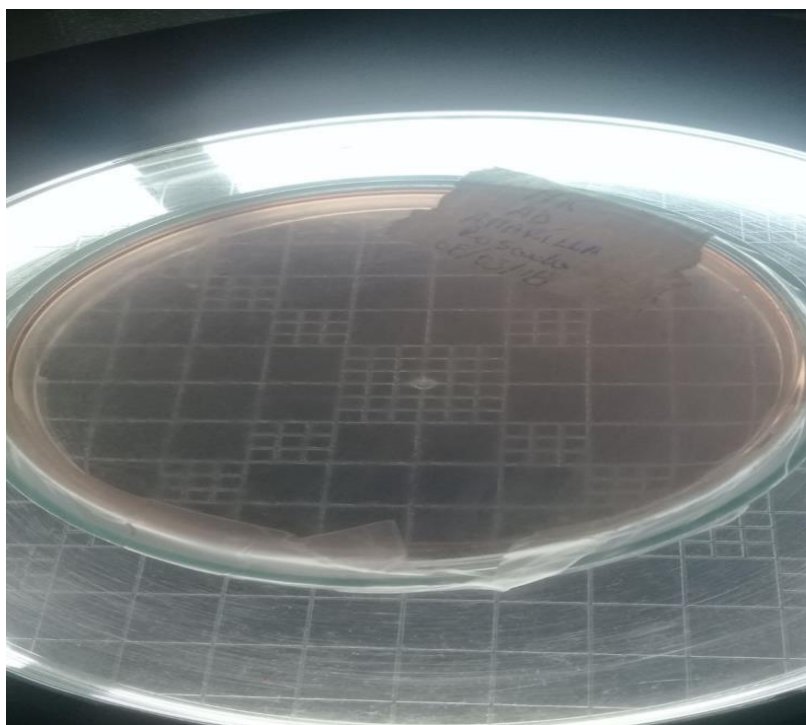
Cultivo de manitol, se observa el cambio de color



Cultivo para *S. aureus*, después de aplicación.



**Cultivo para *S. aureus* después de
tratamiento**



**Conteo de colonias de *S. auerus* antes del
tratamiento**