

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE DE GIRASOL (*Helianthus annuus*)
OZONIZADO EN CEPAS BACTERIANAS GRAM POSITIVAS Y GRAM
NEGATIVAS.**

Trabajo de investigación previo a la obtención del grado de:

MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

Autor:

Daniel Alejandro Moposita Yanza

Tutora:

Dra. Mayra Montero

Ambato – Tungurahua – Ecuador, 2017

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

El suscrito, DANIEL ALEJANDRO MOPOSITA YANZA, portador de la cédula de identidad número: 1804562187, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: **“EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE DE GIRASOL (*Helianthus annuus*) OZONIZADO EN CEPAS BACTERIANAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS”** es original, autentico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.

.....

Daniel Alejandro Moposita Yanza

C.C: 1804562187

DERECHOS DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “**EFEECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE DE GIRASOL (*Helianthus annuus*) OZONIZADO EN CEPAS BACTERIANAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS**” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario y Zootecnista, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él”.

.....

Daniel Alejandro Moposita Yanza

C.C: 1804562187

“EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE DE GIRASOL (*Helianthus annuus*) OZONIZADO EN CEPAS BACTERIANAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS”

REVISADO POR:

Dra. Mayra Montero

TUTOR

Dr. Marco Rosero

ASESOR DE BIOMETRÍA

APROBADO POR EL TRIBUNAL:

Ing. Hernán Zurita Vásquez.
PRESIDENTE

.....
Fecha

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....
Fecha

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....
Fecha

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la guía y la fuerza necesaria para poder cumplir esta meta planteada en mi vida, también a la Universidad Técnica de Ambato y especialmente a sus Docentes, aquellos Doctores e Ingenieros que supieron brindarme parte de su conocimiento y así seguir creciendo como persona y como profesional.

A mi estimada tutora Dra. Mayra Montero quien con mucha paciencia me brindo una gran ayuda en el transcurso de la elaboración de mi tesis, al igual que mi redactor y biometrista.

A mi mamá, mi papá, mi hermano y mis hermanas que a pesar de los momentos malos son una fuente de inspiración, porque sin importar lo que pase la familia es lo más importante en la vida y así cada uno me ayudo de distinta manera para llegar al final de mi camino universitario.

A mis sobrinos, porque yo sé que debo hacer bien las cosas para que ellos vean en mí un ejemplo positivo y lo pongan en práctica en sus propias vidas.

Al Dr. César Álvarez, quien ha sido un excelente maestro en mi crecimiento profesional como Veterinario aportando parte de su conocimiento como Doctor y como amigo, conocimiento que en estos momentos me ayuda en la vida.

A mis amigos, aquellos verdaderos amigos que siempre han estado en los buenos y malos momentos haciendo de esta carrera algo más ameno.

Un especial agradecimiento a mi novia, aquella hermosa persona que conocí en esta misma carrera y que se ha venido convirtiendo en el pilar de mis días, en la amiga incondicional, en la compañera de experiencias y en la fuerza sin la cual yo creo que hubiese sido muy difícil llegar a esta meta.

En fin Muchas Gracias a todas las personas que han pasado en mi vida universitaria.

DEDICATORIA

Dedico primeramente a Dios, por guiar mi camino con la luz perfecta, corrigiéndome justo en el momento exacto para poder llegar a una meta más en mi vida, además de la ayuda de toda mi familia sin exceptuar a nadie que estuvieron presentes cuando más apoyo necesitaba.

A mi papá y mi mamá por enseñarme que a pesar de que hay días demasiados tristes siempre habrá esperanza y fe para salir adelante, por darme consejos de vida que me han ayudado a no rendirme y seguir mi camino siempre con la mirada hacia adelante.

Dedico este triunfo a mi querida novia, que me supo brindar su apoyo en el momento justo, dándome la certeza de que yo cuento con ella y ella cuenta conmigo para juntos salir adelante ahora como colegas de profesión.

En fin dedico a cada una de las personas que han pasado por mi vida porque con cada una de ellas he venido aprendiendo nuevas experiencias geniales en la vida, en este camino que nunca acaba lo único que cambia son las metas planteadas acompañadas de nuevas personas y nuevas experiencias, pero sin olvidar todo lo vivido y conocido.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.....	1
1 INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	3
2.2. MARCO CONCEPTUAL	11
2.2.1. ACEITE DE GIRASOL OZONIZADO.....	11
2.3. BACTERIAS	12
2.3.1. <i>Salmonella</i>.....	12
2.3.2. <i>Escherichia coli</i>.....	13
2.3.3. <i>Staphylococcus</i>.....	13
2.3.4. <i>Streptococcus</i>.....	14
2.4. MEDIOS DE CULTIVO	14
2.4.1. CALDO CEREBRO CORAZON.....	14
2.4.2. AGAR MUELLER HINTON	14
CAPÍTULO III.....	15
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	15
3.1. HIPÓTESIS	15
3.2. OBJETIVOS.....	15
3.2.1. OBJETIVO GENERAL	15
3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
CAPÍTULO IV	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. Ubicación del experimento	16
4.2. Equipos, Materiales y Reactivos.....	16
4.2.1. Equipos.....	16
4.2.2. Materiales	16
4.2.3. Materiales Biológicos	17
4.2.4. Reactivos	17
4.3. Factores en estudio.....	17

4.3.1. Tiempo de exposición del aceite de girasol en la máquina generadora de ozono.	17
4.3.2. Cepas bacterianas	17
4.4. Tratamientos.	18
4.5. Manejo de la investigación.	19
4.5.1. Obtención del material biológico.	19
4.5.2. Elaboración de los medios de cultivo.	19
4.5.3. Obtención del aceite de girasol expuesto en la máquina generadora de ozono.	20
4.5.4. Obtención y Preparación de los discos.	20
4.5.5. Activación de la cepa.	20
4.5.6. Colocación de los discos.	20
4.6. Variable Respuesta.	21
4.6.1. Método de disco difusión.	21
4.7. Diseño experimental y análisis estadísticos.	21
CAPÍTULO V	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	22
5.1. RESULTADOS.	22
5.1.1. MÉTODO DE DISCO DIFUSION	22
5.2. DISCUSIÓN	24
CAPÍTULO VI	27
6. CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS	27
6.1. Conclusiones.	27
6.2. Bibliografía.	27
6.3. Anexos.	31
CAPITULO VII	38
7. PROPUESTA	38
7.1. DATOS INFORMATIVOS	38
7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA	38
7.3. JUSTIFICACIÓN	38
7.4. OBJETIVOS	39
7.4.1. Objetivo general	39
7.4.2. Objetivos específicos	39

7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD.....	39
7.6. FUNDAMENTACIÓN	39
7.7. METODOLOGÍA.....	40
7.8. ADMINISTRACIÓN.....	40
7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN	40

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS, BACTERIAS Y REPETICIONES UTILIZADAS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN	18
TABLA 2. HALOS DE INHIBICIÓN (TOMADOS EN MM) DE LA CEPA BACTERIANA DE SALMONELLA CHOLERAESUIS A TRATAMIENTOS DE ACEITE DE GIRASOL EXPUESTO EN LA MÁQUINA GENERADORA DE OZONO A DIFERENTES TIEMPOS.	22
TABLA 3. HALOS DE INHIBICIÓN (TOMADOS EN MM) DE LA CEPA BACTERIANA DE ESCHERICHIA COLI A TRATAMIENTOS DE ACEITE DE GIRASOL EXPUESTO EN LA MÁQUINA GENERADORA DE OZONO A DIFERENTES TIEMPOS.....	23
TABLA 4. HALOS DE INHIBICIÓN (TOMADOS EN MM) DE LA CEPA BACTERIANA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS A TRATAMIENTOS DE ACEITE DE GIRASOL EXPUESTO EN LA MÁQUINA GENERADORA DE OZONO A DIFERENTES TIEMPOS.	23
TABLA 5. HALOS DE INHIBICIÓN (TOMADOS EN MM) DE LA CEPA BACTERIANA DE STREPTOCOCCUS AGALACTIAE A TRATAMIENTOS DE ACEITE DE GIRASOL EXPUESTO EN LA MÁQUINA GENERADORA DE OZONO A DIFERENTES TIEMPOS.	24

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. DATOS DE HALOS DE INHIBICIÓN TOMADOS EN MILÍMETROS.	31
ANEXO 2. MATERIALES.	33
ANEXO 3. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.....	34
ANEXO 4. IMPREGNACIÓN DE DISCOS Y ACTIVACIÓN DE BACTERIAS.	34
ANEXO 5. DETERMINACIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN.....	35

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto antimicrobiano del aceite de girasol (*Helianthus annuus*) ozonizado en cepas bacterianas Gram Positivas y Gram Negativas: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella choleraesuis* y *Escherichia coli*. La obtención del aceite de girasol ozonizado se realizó sometiendo aceite de girasol comercial a un proceso de ozonificación mediante burbujeo en la maquina generadora de ozono, calculando el tiempo de exposición en la máquina de 90, 120 y 150 minutos, respectivamente. Teniendo en cuenta que a mayor tiempo de exposición en dicha máquina, existe mayor formación de compuestos oxidativos, tales como los peróxidos, siendo estos a los que se les atribuye el efecto antimicrobiano. La sensibilidad de las bacterias ante los diferentes tratamientos se lo realizó mediante la técnica de disco difusión en agar, se sembró las cepas bacterianas en el agar Mueller Hinton, colocando los discos de sensibilidad con los tratamientos respectivos, incubándose a 37°C por 24 horas y posteriormente evaluándose el diámetro del halo de crecimiento con una regleta milimétrica Hiantibotic ZoneScale. Se realizó el diseño completamente aleatorizado, con cuatro tratamientos y 16 repeticiones. Asimismo se realizó el análisis de varianza según el diseño planteado y la prueba de Tukey 5% para comparar los tratamientos. Como resultado en el método de disco difusión se obtuvo que la cepa de *Salmonella choleraesuis* fue la que mayor grado de sensibilidad presento, especialmente ante el aceite de girasol expuesto 150 minutos en la maquina generadora de ozono, dando halos inhibición de entre 30 y 32 mm, no obstante todas las cepas fueron sensibles. El tratamiento que presento mejores resultados fue el de aceite de girasol expuesto 150 minutos en la máquina generadora de ozono, en todas las cepas bacterianas, esto nos indicó que mientras más tiempo de exposición tenga el aceite de girasol en la máquina de ozono presentó mayor efecto antimicrobiano.

Palabras claves.

Halos de Sensibilidad.

Aceite Ozonizado.

Salmonella choleraesuis.

Staphylococcus aureus.

Streptococcus agalactiae.

Escherichia coli.

Antibiograma.

Kirby-Bauer.

SUMMARY

The main objective in this work was to evaluate the antimicrobial effect of sunflower oil (*Helianthus annuus*) ozonized in Gram Positive and Gram Negative bacterial strains: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella choleraesuis* and *Escherichia coli*. Obtaining the ozonated sunflower oil was done by submitting commercial sunflower oil to an ozonation process by bubbling in the ozone generating machine, calculating the exposure time in the machine of 90, 120 and 150 minutes, respectively. Taking into account that the longer exposure time in said machine, there is greater formation of oxidative compounds, such as peroxides, being these to which the antimicrobial effect is attributed. The sensitivity of the bacteria to the different treatments was carried out using the agar diffusion disc technique, the bacterial strains were seeded in the Mueller Hinton agar, placing the sensitivity discs with the respective treatments, incubating at 37°C for 24 hours and subsequently The diameter of the growth halo was evaluated with a millimeter Hiantibotic ZoneScale. The design was completely randomized, with four treatments and 16 repetitions. Likewise, the analysis of variance was carried out according to the proposed design and the Tukey test 5% to compare the treatments. As a result of the diffusion disc method, it was obtained that the strain of *Salmonella choleraesuis* was the one that showed the highest degree of sensitivity, especially before the sunflower oil exposed 150 minutes in the ozone generating machine, giving haloes inhibition of between 30 and 32 mm However, all the strains were sensitive. The treatment that showed the best results was sunflower oil exposed 150 minutes in the ozone generating machine, in all the bacterial strains, this indicated that the longer exposure time sunflower oil has in the ozone machine had a greater effect antimicrobial.

Keywords:

Halos of sensitivity.

Ozonated oil.

Salmonella choleraesuis.

Staphylococcus aureus.

Streptococcus agalactiae.

Escherichia coli.

Antibiogram.

Kirby-Bauer.

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN

Las diversas enfermedades infecciosas de origen bacteriano causan un alto índice de morbilidad y mortalidad, afectando en parte importante la economía en animales de producción, causados por una alta gama de agentes etiológicos (Gil & Samartino, 2001). Las bacterias Gram-Positivas como: *Staphylococcus* y *Streptococcus*, causan trastornos como la mastitis, metritis, osteomielitis, piodermas, otitis, conjuntivitis entre las más importantes de estos géneros; dándose así una amplia lista de patologías que afectan a los animales (Velasco & Yamasaki. 2002).

Si mencionamos bacterias del genero Gram-Negativas nos dirigimos hacia las patologías entéricas las cuales son producidas por varios géneros bacterianos entre los cuales destacan: *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Helicobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* y *Pseudomonas* (Andrea & Cynthia, 2014). La mayoría de estas bacterias son propias de la flora intestinal, pero que por diversos factores ya sean nutricionales, inmunológicos, metabólicos, entre otros; aumentan en su número normal produciéndose una translocación bacteriana y ocasionando procesos patológicos que desencadenen alteraciones orgánicas y cambios de la salud de los pacientes (Fraser & Fraser, 1993).

Se han realizado estudios de distintos fármacos y sustancias para combatir los efectos dañinos de estas bacterias siendo la mayoría eficaz; pero con el paso de los años las bacterias han venido evolucionando y creando resistencia a distintos fármacos (García, 2001), además de las bacterias Gram-Negativas, también las bacterias Gram-Positivas como el *Staphylococcus* y el *Streptococcus* han venido presentado resistencia a los diferentes antimicrobianos (Tavares, 2000), siendo esto un problema grave debido a que se necesita cada día mejores productos que alcancen los niveles terapéuticos y con menor cantidad de efectos secundarios (Tafur *et al.*, 2011). Una vez mencionado todo esto podemos decir que uno de los productos que se han venido usando en los últimos años a nivel de Medicina Veterinaria es el aceite de girasol con ozono (Rodríguez *et al.*, 2006),

que según los estudios realizados brindan una gran cantidad de efectos terapéuticos ante ciertos agentes patológicos (Lezcano *et al.*, 1998).

Lozano (2004), menciona que, en el caso del aceite de girasol ozonizado, este compuesto es un agente germicida de amplio espectro. Díaz *et al.* (2006), relatan que estas propiedades germicidas, han motivado que haya sido investigada su acción en el tratamiento de diversos procesos sépticos locales, de infecciones dermatológicas, fúngicas (Menendez *et al.*, 2002) (Delgado, 2015), oftalmológicas (Noblet *et al.*, 2012) y en parasitosis (Zamora Rodríguez *et al.*, 2015).

En esta investigación nos enfocamos a los efectos bactericidas sobre los siguientes agentes etiológicos: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Abarcando así bacterias Gram-Positivas y Gram-Negativas.

Realizando los estudios *in vitro* y con cepas certificadas de las bacterias previamente mencionadas podemos dar a conocer que el objetivo general de este proyecto fue: Evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* del aceite de girasol (*Helianthus annuus*) ozonizado en cepas bacterianas Gram Positivas y Gram Negativas.

CAPÍTULO II

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.

Rodríguez *et al.* (2006), mencionan que, el Aceite de girasol (*Helianthus annuus*) ozonizado es un producto que ha demostrado tener un efecto germicida a nivel de veterinaria. Se utilizaron en este estudio ratones de la línea NMRI macho de peso corporal entre 20-25g y fueron mantenidos en condiciones de temperatura de 20-22 °C y humedad relativa entre 50-55%. Los animales fueron divididos en cinco grupos: el primero recibió, aceite de croto; el segundo grupo, recibió acetona como vehículo del aceite de croto; el tercero, aceite de croto con indometacina como fármaco de referencia; al cuarto grupo, se le aplicó aceite de croto con aceite de girasol y al quinto, se le aplicó aceite de croto con el aceite de girasol ozonizado. Los resultados mostraron que en el grupo de animales que recibieron tratamiento con el aceite de girasol ozonizado, la actividad de la Mieloperoxidasa (MPO) disminuyó significativamente al igual que el peso del tejido. Estos resultados constituyen la primera evidencia de que el efecto antiinflamatorio del Aceite de girasol ozonizado pudiera estar determinado al menos en parte por una disminución de la infiltración de neutrófilos en el tejido.

Ramírez *et al.* (2006), relatan que, el aceite ozonificado posee poder cicatrizante y regenerador del tejidos en heridas, aplicándolo en forma de aceite por vía tópica, en lesiones realizadas por castración a 15 cerdos de la categoría Yorshire. Para el tratamiento se consideró la Raza, edad de 90 días, peso 63 libras y en condiciones de alojamiento y manejo normales. Se procedió a realizar a 15 de ellos, la práctica de una incisión en la región escrotal. Los animales tratados fueron separados en tres grupos de 5 animales. Al primer grupo (A) se le aplicó placebo tópicamente una sola vez al día durante 5 día, al grupo (B) se le administró Aceite de girasol ozonizado 1 veces al día en el mismo período y frecuencia de aplicación y al tercer grupo (C) se le aplicó Aceite de girasol ozonizado 2 veces al día durante cinco días. Los resultados que tenemos en evidencia, es que la aplicación tópica de esta terapia es efectiva para esta especie, y mejor aún en el caso que se usó doble aplicación en el día, siempre y cuando sea empleada en lesiones dérmicas con fines cicatrizantes.

Lezcano *et al.* (1998), menciona que, el Aceite de girasol (*H. annuus*) ozonizado tiene efectos antimicrobianos contra diferentes microorganismos. En su estudio se examinó, la actividad antibacteriana del aceite ozonificado sobre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y los aislados clínicos de *Escherichia coli* y *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *E. coli* ATCC 25922. La Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida, se llevaron a cabo por dilución en agar y macrodilución; así como las pruebas de bioactividad mediante la técnica de microcalorimetría. Los resultados mostraron la potente actividad antimicrobiana del aceite de girasol ozonizado contra las cepas bacterianas analizadas en este estudio. Se hizo su recomendación hacia otros experimentos con el fin de establecer la eficacia, la dosis y el procedimiento terapéutico apropiado para esta enfermedad.

Skalska *et al.* (2009), establecieron que, el objetivo de su trabajo fue establecer la Concentración Mínima de Inhibición (MIC) del aceite de girasol ozonizado para varios microorganismos, determinando la influencia del medio ozonizado en el crecimiento de las bacterias *Bacillus subtilis*, *E. coli* y de la levadura *Candida albicans*, utilizándose el método de la placa de Petri. Se estudiaron adicionalmente las propiedades químicas y físicas del aceite de girasol ozonizado. Los estudios microbiológicos demostraron que estos microbios tienen una gran sensibilidad contra el aceite ozonizado, aunque los que presentaron mayor resistencia es la bacteria Gram-Negativa *E. coli* y la levadura *C. albicans*. Las bacterias Gram-positivas, *B. subtilis* resultaron ser menos resistentes, debido a que no se observó crecimiento para la preparación con una dosis de ozono de 200 mg/L en aceite.

En Curtiellas *et al.* (2008), mencionan que, el mecanismo de acción de los aceites vegetales ozonizados sobre los microorganismos no está aún establecido. Dada la naturaleza oxidante de sus principales componentes es posible que ocurran daños, tanto en los lípidos insaturados como en las proteínas que presentan grupos sulfhidrilos de los microorganismos. Para lo cual los autores ya mencionados realizaron su trabajo para evaluar el efecto del Aceite de girasol ozonizado sobre la cepa *S. aureus* ATCC 25923, en cuanto a la viabilidad, la permeabilidad de la membrana plasmática y posibles variaciones de su ultraestructura. A los 1, 3, 10 y 30 minutos de exposición al Aceite de girasol

ozonizado, se realizó un estudio de susceptibilidad de los cultivos y se determinó el contenido de iones K^+ liberados al medio por las células bacterianas, como criterio de alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática. Se realizaron exámenes por Microscopía Electrónica de Transmisión a muestras expuestas al Aceite de girasol ozonizado durante 30 min y 24 h para evaluar los posibles cambios ultraestructurales. Se presentó un marcado efecto bactericida sobre la cepa de *S. aureus* ATCC 25923, que se manifestó en una disminución de la viabilidad de más del 90 % desde el primer minuto de contacto. Se presentó una modificación en la permeabilidad de la membrana plasmática de *S. aureus*, al detectarse la pérdida del contenido intracelular de iones K^+ con posterioridad a la afectación de la viabilidad celular.

Por otro lado, Delgado (2015), dice que, es habitual en la consulta veterinaria diaria casos clínicos de otitis y dermatitis crónicas recurrentes causadas por micosis, y muy especialmente las producidas por una levadura denominada *Malassezia pachydermatis* que coloniza los oídos y piel de perros y gatos. Una terapia alternativa para el tratamiento de estas afecciones son los aceites ozonizados, en micosis han sido más que contrastados y fundamentados en diferentes artículos científicos, no disponiéndose de suficientes estudios clínicos específicos sobre su uso frente a esta levadura. Y sabiendo estos efectos se puso como objetivo evaluar la eficacia terapéutica del aceite de girasol ozonizado en estos casos. Se establecieron dos grupos de 25 casos clínicos cada uno, el grupo 1 de casos de otitis, y el grupo 2 de casos de dermatitis, todos confirmaron la presencia de la levadura, ambos grupos fueron tratados por vía ótica y tópica respectivamente. Transcurridos 15 días de terapia se observó una mejoría de los signos clínicos evaluados de todos los casos hasta un 84% para el grupo 1 y un 80% para el grupo 2. Demostrándose la eficacia del aceite ozonizado sobre la *M. pachydermatis*.

Álvarez *et al.* (2007), dice que, el aceite de girasol ozonizado es un fármaco registrado en Cuba para el tratamiento de la giardiasis con el nombre de Oleozon. Los ensayos clínicos realizados han demostrado que posee efectividad terapéutica comparable con un fármaco de referencia, Ornidazol. El objetivo de su estudio fue determinar si el aceite de girasol es capaz de ejercer efecto protector contra las lesiones gástricas inducidas por la indometacina en las ratas. Estos animales fueron divididos para dos diferentes diseños

experimentales con 6 grupos cada uno. En el primer experimento las ratas fueron pretratadas oralmente con aceite de girasol ozonizado (4, 12 y 24 mg/kg) y 4 horas después con indometacina. En el segundo experimento las lesiones gástricas fueron inducidas por indometacina y 4 horas después tratadas con Aceite de girasol ozonizado en el mismo rango de dosis que en el anterior experimento. Las lesiones gástricas fueron evaluadas determinando el índice de ulceración. La cimetidina fue utilizada como fármaco antiulceroso de referencia. Los resultados demostraron que el pretratamiento con aceite ozonificado no impidió el daño gástrico inducido por la indometacina y no tuvo efecto citoprotector. En contraste con esto el tratamiento con aceite de girasol ozonificado indujo reversión de las lesiones gástricas inducidas previamente por la indometacina demostrando su efecto anti-ulcerogénico en este modelo.

Por ende, Noblet *et al.* (2012), relatan que, la Conjuntivitis Hemorrágica Epidémica (CHE) es una inflamación conjuntival de etiología viral, autolimitada que afecta a todas las edades y cursa de forma epidémica. Teniendo en cuenta el poder germicida de amplio espectro del aceite de girasol (*H. annuus*) ozonizado, así como su cierto carácter antiinflamatorio. El objetivo de su trabajo fue evaluar la efectividad de este medicamento en su forma de colirio para el tratamiento de la CHE. En el Hospital Docente Dr Salvador Allende fueron atendidos 20 pacientes con CHE en Octubre del 2009. De ellos 12 recibieron tratamiento con Aceite de girasol ozonizado tipo colirio (1 gota dos veces al día) y 8 conformaron el grupo control los cuales recibieron tratamiento convencional (fomentos fríos, antiinflamatorios no esteroideos, yodoxuridina en colirio o interferón alfa-2b recombinante). Todos los pacientes tratados con el aceite ozonificado tuvieron una rápida evolución hacia la curación. A las 72 h mostraban signos de gran mejoría y a la semana estaban totalmente curados. Ninguno de los pacientes presentó complicaciones. En el grupo control la evolución fue más prolongada, fundamentalmente en los pacientes que presentaron complicaciones (3 con queratitis). El tratamiento de la Conjuntivitis Hemorrágica Epidémica con Aceite de girasol ozonizado en forma de colirio brinda resultados muy positivos en esta patología

Así, también Zamora Rodríguez *et al.* (2015), mencionan que, el aceite de girasol ozonizado (AGO), es un fármaco registrado en Cuba para el tratamiento de la giardiasis

intestinal y tiene efecto germicida de amplio espectro. El objetivo de su estudio fue evaluar la efectividad del AGO como tratamiento de procesos diarreicos en conejos. Los animales se dividieron en dos grupos de 20 cada uno. Al primero se le aplicó AGO (50 mg/kg), mientras que al segundo fue tratado con Polisul (11,3 mg/kg). Ambos productos se administraron cada 24 h durante tres días. Al finalizar el esquema de tratamientos, se realizó análisis a las muestras de heces fecales, para dar criterio de curación. Los resultados demostraron que el AGO tuvo una efectividad equivalente a la del Polisul, concluyendo que este producto, puede ser utilizado como tratamiento de los procesos entéricos causados por *Enteamebas* y *Coccidias* en los conejos y no se observaron reacciones adversas inherentes a los productos evaluados.

Díaz *et al.* (2006), relatan que, se realizó un estudio para determinar la posible irritabilidad dérmica, oftálmica y el efecto sensibilizante del aceite de girasol ozonizado tópico. Los ensayos se llevaron a cabo en conejos y curieles con las técnicas descritas en los procedimientos normalizados de trabajo establecidos en el Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas de la Universidad de La Habana. El Aceite de girasol ozonizado tópico no resulta irritante en la piel de los conejos ensayados ni en las estructuras oculares de los conejos evaluados y no tiene efecto sensibilizante al ponerse en contacto con la piel de los curieles sometidos al estudio; por lo que puede afirmarse que cumple con los requisitos indispensables para ser aceptado como medicamento y ser utilizado en las afecciones de la epidermofitosis e impétigo.

Por otro lado, Menendez *et al.* (2002), relatan que el aceite de girasol ozonizado tiene una notable acción germicida, evidenciándose mediante el presente estudio, la eficacia del oleozon en el tratamiento de *Tinea pedis*. Se demostró en un ensayo aleatorizado controlado de fase III, que comparaba aceite de girasol tópico con crema de ketoconazol al 2% en 200 pacientes divididos 100 en cada grupo. El tratamiento administrado fue dos veces por día durante un período de 6 semanas. La eficacia se evaluó clínicamente mediante la desaparición de todas las lesiones, con o sin resultados micológicos negativos y micológicamente con resultados negativos del cultivo. Se obtuvo una curación clínica y micológica completa en 75 y 81% para el aceite de girasol ozonizado y ketoconazol,

respectivamente, sin diferencias significativas entre ambos grupos. No se observaron efectos secundarios o superinfecciones bacterianas.

Además, Díaz *et al.* (2005), mencionan que en la presente investigación se comparó la actividad antimicrobiana los productos de la ozonización de tres sistemas: aceite de coco ozonizado, aceite de coco ozonizado con agua y aceite de coco ozonizado con etanol. Se determinaron los índices de peróxido, acidez y viscosidad. Los productos de reacción se identificaron por ^1H RMN y se evaluó su actividad antimicrobiana. El aceite de coco ozonizado con etanol mostró los índices más altos de peróxido y acidez. Este resultado sugiere que en presencia de etanol se produce una mayor descomposición del peróxido que conduce a una mayor formación de ácido. Los coeficientes de variación obtenidos en los métodos de análisis fueron inferiores al 10%. Los productos de reacción se identificaron como compuestos de ozónidos y aldehídos. El mayor espectro de acción de la actividad antimicrobiana ante *S. aureus* se obtuvo con el aceite de coco ozonizado con agua y sistemas de etanol.

Igualmente, Díaz *et al.* (2006), redactan que, en su estudio compararon química y biológicamente los aceites de girasol y oliva ozonizados. Estos aceites se introdujeron en un reactor con gas de ozono burbujeante. Se determinaron los valores de peróxido, acidez y yodo junto con la actividad antimicrobiana. Los efectos de ozonización en la composición de ácidos grasos de estos aceites se analizaron usando la técnica cromatográfica Gas-Liquid. Un aumento en los valores de peroxidación y acidez se observaron en ambos aceites, pero fueron más altos en ozonizados del aceite de girasol. El valor de yodo era de cero en el aceite de oliva ozonizado, mientras que en el aceite de girasol ozonizado era 8.8 g de yodo por 100 g. La actividad antimicrobiana fue similar para ambos aceites ozonizados a excepción de las Concentraciones Bactericidas Mínimas en *P. aeruginosa*.

En cuanto, Fernández *et al.* (2006), mencionan que, realizaron un estudio de la actividad antimicrobiana de aceite de theobroma ozonizado contra *C. albicans*. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Fungicida del aceite de theobroma ozonizado para varios índices de peróxidos. Para la Cinética de mortalidad de

C. albicans para el peróxido se llevó a cabo un índice de 1200 mmol-eq/kg. Bajo las condiciones estudiadas, se obtuvieron valores de 5 y 3.75 mg/mL y 11.58 y 5.78 mg/mL para la Concentración Mínima Inhibitoria y de la Concentración Mínima Fungicida y fueron obtenidos para índices de peróxidos de 1002 y 1200 mmol-eq/kg de muestra, respectivamente. Aumentos adicionales de la concentración de aceite de teobroma ozonizado no ejerció ninguna influencia sobre la mortalidad de la *C. albicans*. Debajo los rangos variables estudiados todos los parámetros tienen un significativo efecto sobre la mortalidad de *C. albicans*, el tiempo de contacto es el factor más importante.

En este sentido, Díaz *et al.* (2001), dice que, las reacciones de ozonización son muy importantes en la química de los ácidos grasos ya que sus productos de ozonización están involucrados en procesos biológicos vitales. Cuando un ácido insaturado reacciona con el ozono en presencia de un solvente orgánico, los ozónidos se producen según el mecanismo de Criegee. Estos ozónidos son compuestos relativamente estables, por lo tanto, en el organismo tienen efectos biológicos en sitios distantes del sitio donde se forman. Se ha sugerido que los ozónidos están implicados en el efecto antimicrobiano del Aceite de girasol ozonizado. En su estudio trataron de demostrar esta hipótesis. Los ozonoides se obtuvieron por reacción total de gas ozono con una muestra de oleato de metilo en un disolvente orgánico. Se usó la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de Protón para la identificación de ozónidos en productos de ozonización, mientras que la evaluación biológica se realizó determinando la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC), la Concentración Bactericida Mínima (MBC) y la Concentración Fungicida Mínima (MFC) de productos de ozonización de diferentes microorganismos. La señal de ozónido se identificó en el Aceite de girasol ozonizado y oleato de metilo ozonizado mientras que en aceite de girasol no. Los productos de ozonización de oleato de metilo, se encontraron espectroscópicamente como solo ozónidos. Las CIM para los ozónidos del oleato de metilo ozonizado fueron de 2.3 a 28 mg/mL, mientras que las MBC y MFC fueron 460 mg/mL comparables con las del aceite de girasol ozonizado. Estos resultados demuestran que los ozónidos son una de las especies activas de aceite de girasol ozonizado.

Posteriormente, Díaz *et al.* (2005), mencionan que, las reacciones de ozonización son muy importantes en la química del aceite vegetal ya que sus productos de ozonización están

implicados en el efecto antimicrobiano en usos terapéuticos para varias enfermedades de etiología microbiológica. La información sobre la caracterización espectroscópica de los productos generados por la ozonólisis del aceite de girasol es limitada. Dando que en su estudio, el aceite de girasol se lo ozonizó con 650 mmol equiv/kg de índice de peróxido. La ozonización del aceite de girasol produjo ozónidos, aldehídos e hidroperóxidos que se identificaron por ^1H , ^{13}C y Resonancia Magnética Nuclear ^1H bidimensional (RMN). El aceite de girasol virgen y el aceite de girasol ozonizado muestran de forma muy similar los espectros de ^1H RMN, excepto las resonancias a $\delta = 9.74$ y $\delta = 9.63$ ppm., que corresponden tanto triplete de protones aldehídicos, $\delta = 5.6$ ppm (señal olefínica de hidroperóxidos), y $\delta = 5.15$ ppm (multipletes de protones metílicos de ozónidos). Otras asignaciones de resonancia se basan en las conectividades proporcionadas por las constantes de acoplamiento escalar de protón. Estos son los siguientes: $\delta = 3.15$ ppm (doblete del grupo metileno en posición α respecto al protón olefínico), $\delta = 2.45$ ppm (multiplete de protones metílicos alílicos a ozónidos del grupo metilénico) y $\delta = 1.62$ ppm (protones metilénicos múltiples en posición β respecto a los protones metílicos de los ozónidos). A partir del espectro bidimensional ^{13}C RMN y ^1H - ^{13}C del aceite de girasol ozonizado, la presencia de ozónidos fue confirmada por las señales $\delta = 103.43$ y $\delta = 103.49$ ppm., respectivamente. Las otras señales nuevas encontradas en $\delta = 42.5$ y $\delta = 42.76$ ppm., confirman la presencia de carbonos metilénicos a partir de hidroperóxidos y ozónidos. Estos resultados indican que la espectroscopia de RMN puede proporcionar información valiosa sobre la cantidad de compuestos de reacción de aceite vegetal ozonizado. A partir de la elucidación estructural química de los aceites de girasol ozonizados, se puede lograr información bioquímica y química relevante.

De este modo, Lezcano *et al.* (2000), relatan que, el aceite de girasol ozonizado, ha mostrado efectos antimicrobianos contra varias especies bacterianas. El propósito de su trabajo fue estudiar in vitro actividad del aceite de girasol ozonizado en *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, en cepas resistentes y susceptibles a la meticilina. Concentraciones Inhibitorias Mínimas (MIC) y Concentraciones Mínimas Bactericidas (MBC) se determinaron en base a National Directrices del Comité para estándares de laboratorio clínico (NCCLS). El Aceite de girasol ozonizado fue efectivo contra todas las cepas, MIC fue de 9.5 mg/ml y MBC fue de 356 mg/ml.

Esposito *et al.* (2015), expresan que, la colibacilosis es una de las principales causas de muerte en las unidades de crías porcinas. Con el objetivo de evaluar el efecto del aceite de girasol ozonizado (AGO) como preventivo y terapéutico en la colibacilosis, se utilizaron 300 cerditos, los cuales se dividieron en dos series experimentales de 150 animales cada uno. En la primera serie experimental (fase preventiva), al primer grupo se le aplicó AGO vía oral, mientras que el segundo no recibió tratamiento. En la segunda serie experimental (fase terapéutica), los animales del primer grupo recibieron tratamiento con AGO, mientras que el otro grupo se trató con antibiótico. Los resultados demostraron que el AGO aplicado tanto de forma preventiva como terapéutica, incrementó la ganancia de peso diaria, previno la aparición de la colibacilosis, alcanzando porcentajes de recuperación significativos (90 %) con respecto al control sin tratamiento (59 %). De forma similar el AGO aplicado terapéuticamente mostró un incremento significativo en el porcentaje de animales recuperados (88%) comparado con el grupo control (54%). Por tanto, se demostró la efectividad de este producto aplicado tanto de forma preventiva como terapéutica en la colibacilosis de crías intensivas porcinas.

2.2. MARCO CONCEPTUAL

2.2.1. ACEITE DE GIRASOL OZONIZADO.

Lozano (2004), dice que, el Aceite de Girasol (*Helianthus annuus*) ozonizado es un compuesto desarrollado en el Centro de Investigaciones del Ozono del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, a partir de la ozonización del aceite de girasol en condiciones adecuadas. Este compuesto es un agente germicida de amplio espectro, muy efectivo contra procesos infecciosos producidos tanto por virus como por bacterias, parásitos y hongos. Estas propiedades germicidas, han motivado que haya sido investigada su acción en el tratamiento de diversos procesos sépticos locales, de infecciones dermatológicas, ginecológicas, estomatológicas, oftalmológicas y en la parasitosis por *Giardia lamblia*. Se seleccionaron 15 lotes del producto de forma aleatoria. A dichos lotes y a la muestra representativa, se le verificaron los análisis establecidos para el control de la calidad del medicamento. Por otra parte, el Aceite de girasol ozonificado se separó por cromatografía de partición, en dos fracciones: en la apolar, se recogieron los triglicéridos

que no reaccionaron con el ozono y en la polar, se concentraron aquellos que sí lo hicieron. Los triglicéridos presentes en la fracción apolar se identificaron por CG-FID y los compuestos de menor peso molecular se identificaron por CG-EM. Ambas fracciones y el producto de partida se caracterizaron por distintas técnicas como la espectrofotometría UV-Visible y las espectroscopias de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (EM). El Aceite de girasol ozonizado está formado aproximadamente por un 51% en peso de triglicéridos no modificados, un 32% de compuestos de mayor peso molecular que los triglicéridos (dímeros y oligómeros), un 15% de triglicéridos oxidados con funciones peroxídicas, carbonílicas o ácidas y hasta un 2% de compuestos polares con longitudes de cadena de entre seis y nueve átomos de carbono con funciones aldehídicas y carboxílicas.

El mecanismo de acción de los aceites vegetales ozonizados sobre los microorganismos no está aún establecido, es posible que ocurran daños en los lípidos insaturados y las proteínas que presentan grupos sulfhidrilos de los microorganismos. De acuerdo a Curtiellas *et al.* (2008), el mecanismo de acción se da mediante la modificación en la permeabilidad de la membrana plasmática, al detectarse la pérdida del contenido intracelular de iones K⁺ con posterioridad a la afectación de la viabilidad celular.

2.3. BACTERIAS

2.3.1. *Salmonella*.

Ibar *et al.* (2009), menciona que las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* incluyen un gran número de serovariedades que habitan el tracto intestinal de diversas especies animales, domésticas y silvestres. Es una bacteria Gram Negativa. Algunas de ellas tienen predilección por un hospedador particular y causan enfermedades bien definidas en el hombre y los animales, mientras que otras se encuentran en un gran número de reservorios y de allí se diseminan al medio ambiente. En los porcinos, la salmonelosis con presentación clínica está asociada a *S. choleraesuis*, aunque también pueden presentarse cuadros relacionados con *S. thyphimurium* y de manera muy rara con *S. typhisuis*. En el intestino de esta especie animal, se pueden encontrar serovariedades potencialmente patógenas para el ser humano y, por consiguiente, los cerdos pueden constituir una fuente de infección a través del consumo de sus subproductos y un factor de riesgo para la salud

pública. En sistemas de cría intensiva de cerdos, la utilización de antimicrobianos es una práctica frecuente. De esta manera, se favorece la selección de bacterias que poseen mecanismos de resistencia a los antibióticos administrados y aumenta el número de animales portadores de bacterias resistentes. Muchos de los genes que codifican para mecanismos de resistencia a los antibióticos se localizan en plásmidos, transposones e integrones, estructuras típicamente sujetas a la transferencia horizontal de genes. Varios estudios han demostrado que la presencia del gen de la integrasa de clase 1 está asociada a un perfil de multiresistencia antibiótica en la familia Enterobacteriaceae, independientemente de la especie y del origen de la muestra.

2.3.2. *Escherichia coli*.

La bacteria *E. coli* pertenece al grupo de las enterobacterias siendo un componente normal de la flora bacteriana del intestino grueso de varias especies animales e incluido del hombre. Es un bacilo Gram Negativo, anaerobio facultativo y además puede ser móvil o inmóvil. (Acha & Szyfres, 2003). Las cepas que causan daño a nivel entérico están divididas en 5 categorías siendo las siguientes: enterohemorrágica, enterotoxígena, enteroinvasora, enteropatógena y enteroagregativa o con adherencia difusa (Benenson, 1992). Por lo general el principal daño que producen son a nivel entérico, debido a las diarreas, asociándose a una diarrea de recién nacidos, diarrea en el destete y una septicemia en porcinos, bovinos, ovinos, equinos y caprinos. Además de ser una bacteria oportunista en infecciones de vías urinarias y respiratorias, en mastitis, onfalitis entre otras enfermedades infecciosas. Se distinguen algunos serotipos de acuerdo a la presencia de diversos antígenos como: somáticos, capsulares y flagelares (Velasco & Yamasaki. 2002).

2.3.3. *Staphylococcus*.

Son bacterias con forma esférica con un diámetro de 0,5-1,2 um se los puede observar en racimos a manera de cadenas cortas o a su vez se los puede observar en pares o solos, es un género Gram-Positivo, no esporulado, anaerobios facultativos, no son móviles, no poseen capsula y poseen un metabolismo fermentativo. El hábitat natural de estos microorganismos son la piel y las mucosas del tracto gastrointestinal y respiratorio tanto de animales como del hombre. El *S. aureus* posee distintos factores de virulencia como:

la proteína A, la estafilokinas, leucocidina, hialuronidasa, coagulasa, enterotoxina, hemolisinas y toxina epidermolítica. Se lo puede encontrar ligado a ciertas patologías como: mastitis, endometritis, cistitis, osteomielitis, epidermitis exudativa, abscesos, otitis y conjuntivitis (Velasco & Yamasaki. 2002).

2.3.4. *Streptococcus*.

Son de forma esférica u ovoide de unos 0,8-1 um de diámetro, agrupándose en cadenas especialmente si se cultivan en medios líquidos. Son bacilos Gram-Positivos, anaerobios facultativos, inmóviles y algunas especies poseen capsula y no son esporulados. Entre las especies más importantes tenemos: *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. equi*, *S. zooepidermicus*, *S. dysgalactiae*, *S. equisimilis*, *S. canis* y *S. faecalis*. El hábitat normal son las mucosas del tracto gastrointestinal, respiratorio y genital tanto de hombre como de animales. Se lo relaciona a distintas enfermedades como: artritis séptica, abortos, mastitis, nefritis, metritis, papera de los equinos, cistitis, endocarditis y neumonía (Velasco & Yamasaki. 2002).

2.4. MEDIOS DE CULTIVO

2.4.1. CALDO CEREBRO CORAZON.

Es un medio que proporciona un adecuado desarrollo de bacterias y de hongos. Su composición a base de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno, y vitaminas. La glucosa en cambio es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer. (Koneman & Allen, 2008).

2.4.2. AGAR MUELLER HINTON

Es un medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición ha sido utilizado en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo y la mayoría de bacterias crecen satisfactoriamente (Stanchi, 2007).

CAPÍTULO III

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

El aceite de girasol (*Helianthus annuus*) ozonizado presenta un efecto antimicrobiano sobre las cepas bacterianas Gram Positivas y Gram Negativas.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto antimicrobiano del aceite de girasol (*Helianthus annuus*) ozonizado en cepas bacterianas Gram Positivas y Gram Negativas.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la sensibilidad antimicrobiana, del aceite de girasol expuesto en una máquina generadora de ozono durante 90, 120 y 150 minutos, en la cepa bacteriana de *Salmonella choleraesuis*.
- Determinar la sensibilidad antimicrobiana, del aceite de girasol expuesto en una máquina generadora de ozono por 90, 120 y 150 minutos, en la cepa bacteriana de *Escherichia coli*.
- Determinar la sensibilidad antimicrobiana, del aceite de girasol expuesto en una máquina generadora de ozono por 90, 120 y 150 minutos, en la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*.
- Determinar la sensibilidad antimicrobiana, del aceite de girasol expuesto en una máquina generadora de ozono por 90, 120 y 150 minutos, en la cepa bacteriana de *Streptococcus agalactiae*.

CAPÍTULO IV

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del experimento

El siguiente ensayo se realizó en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, ubicada en el sector Querochaca, en la Parroquia La Matriz del cantón Cevallos, provincia de Tungurahua. Con las coordenadas geográficas 1°25'0" Sur (latitud), 78°36'20" Oeste (longitud), a una altitud de 2865msnm.

4.2. Equipos, Materiales y Reactivos.

4.2.1. Equipos

- Máquina de ozono.
- Balanza Analítica.
- Agitador magnético.
- Incubadora.
- Autoclave.
- Cámara de Flujo Laminar

4.2.2. Materiales

- | | |
|--------------------------------|-----------------------|
| - Aceite de girasol. | - Probetas. |
| - Cajas Petri. | - Espátula. |
| - Asa de Siembra. | - Cepillos de lavar. |
| - Mecheros de vidrio. | - Gradillas. |
| - Mandil. | - Papel aluminio. |
| - Agua destilada. | - Algodón. |
| - Vasos de Precipitación. | - Gasas. |
| - Pipetas plásticas de Pasteur | - Piola de algodón. |
| - Imanes. | - Papel de empaque. |
| - Cocineta. | - Regleta Hiantibotic |
| - Hisopos. | ZoneScale. |
| - Tubos de ensayo. | - Guantes estériles. |

4.2.3. Materiales Biológicos

- Cepa de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922
- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- Cepa de *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386

4.2.4. Reactivos

- Medio de cultivo sólido.

-Agar Mueller-Hinton.

- Caldo Cerebro Corazón.

4.3. Factores en estudio

4.3.1. Tiempo de exposición del aceite de girasol en la máquina generadora de ozono.

- t0: 0 minutos
- t1: 90 minutos
- t2: 120 minutos
- t3: 150 minutos

4.3.2. Cepas bacterianas

- Cepa de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922
- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- Cepa de *Streptococcus agalactiae* ATCC 1238

4.4. Tratamientos.

Tabla 1. Descripción de los tratamientos, bacterias y repeticiones utilizadas en la presente investigación								
Tratamientos	<i>Salmonella choleraesuis.</i>		<i>Escherichia coli.</i>		<i>Staphylococcus aureus.</i>		<i>Streptococcus agalactiae.</i>	
	Agares	Repeticiones. (# de discos).	Agares	Repeticiones. (# de discos).	Agares	Repeticiones. (# de discos).	Agares	Repeticiones. (# de discos).
T0 Aceite de girasol sin exposición en la máquina de ozono.	A1	4	A1	4	A1	4	A1	4
	A2	4	A2	4	A2	4	A2	4
	A3	4	A3	4	A3	4	A3	4
	A4	4	A4	4	A4	4	A4	4
T1 Aceite de girasol expuesto 90 minutos en la máquina de ozono.	A1	4	A1	4	A1	4	A1	4
	A2	4	A2	4	A2	4	A2	4
	A3	4	A3	4	A3	4	A3	4
	A4	4	A4	4	A4	4	A4	4
T2 Aceite de girasol expuesto 120 minutos en la máquina de ozono.	A1	4	A1	4	A1	4	A1	4
	A2	4	A2	4	A2	4	A2	4
	A3	4	A3	4	A3	4	A3	4
	A4	4	A4	4	A4	4	A4	4
T3 Aceite de girasol expuesto 150 minutos en la máquina de ozono.	A1	4	A1	4	A1	4	A1	4
	A2	4	A2	4	A2	4	A2	4
	A3	4	A3	4	A3	4	A3	4
	A4	4	A4	4	A4	4	A4	4

4.5. Manejo de la investigación.

4.5.1. Obtención del material biológico.

Se obtuvieron del proveedor MEDIBAC las siguientes cepas bacterianas:

-Cepa de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708

-Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922

-Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

-Cepa de *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386

4.5.2. Elaboración de los medios de cultivo.

Agar Mueller Hinton.

Se realizó la preparación del medio a partir de la base deshidratada junto con agua destilada, todo esto de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Una vez calculada la cantidad de base deshidratada, se la preparó con agua destilada en un vaso de precipitación, colocándolo luego en un agitador magnético a 335 rpm con una temperatura de 220 °C. Una vez realizado esto se lo tapó con papel aluminio y se lo llevo a autoclavarlo a una temperatura de 120 °C durante 20 minutos. Pasado este tiempo se colocó el medio en las respectivas cajas petri previamente esterilizadas. Una vez solidificado llevamos las cajas a refrigeración hasta el momento que se realizó el antibiograma (Sacsquispe & Velásquez. 2008).

Caldo Cerebro Corazón.

Se preparó el medio a partir de la base deshidratada junto con agua destilada y de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Una vez calculada la cantidad de base deshidratada se la preparó con el agua destilada en un vaso de precipitación, colocando el vaso de precipitación en un agitador magnético a 335 rpm con una temperatura de 220 °C. Una vez realizado el proceso se cubrió el vaso de precipitación con papel aluminio y se lo autoclavó a una temperatura de 120 °C durante 20 minutos. Pasado este tiempo se colocó el caldo cerebro corazón en refrigeración hasta el momento que se utilizó (Sacsquispe & Velásquez. 2008).

4.5.3. Obtención del aceite de girasol expuesto en la máquina generadora de ozono.

Se realizó a partir del aceite de girasol de origen comercial y con la ayuda de una máquina generadora de ozono, conectada a un tanque de oxígeno. El aceite se lo expuso en la máquina y mediante un método de burbujeo durante 90, 120 y 150 minutos, se obtuvo los tratamientos correspondientes. Tomando en cuenta que la máquina de ozono tiene especificaciones de 400mg/Litro/hora.

4.5.4. Obtención y Preparación de los discos.

Los discos Oxoid se mantuvieron en refrigeración hasta su respectivo uso. En una caja petri esterilizada se colocó el número necesario de discos empapándolos 24 horas antes con el respectivo tratamiento. Se colocó una gota del aceite ozonizado respectivo ayudado de una pipeta plástica Pasteur.

4.5.5. Activación de la cepa.

Las activaciones de las cepas se las realizó en caldo cerebro corazón; y se las colocó en un tubo de ensayo con 5ml de caldo y 0,2 ml de inóculo criopreservado de las respectivas bacterias; sumando un total de 4 tubos de ensayo, se los llevó a la incubadora hasta observar turbidez, alrededor de 4 horas a 6 horas dependiendo de las cepas, y posteriormente se realizó la siembra en el agar Mueller-Hinton para el respectivo antibiograma mediante el método Kirby Bauer.

4.5.6. Colocación de los discos.

Se preparó los discos con cada una de las muestras del aceite de girasol expuesto en la máquina generadora de ozono a distintos tiempos (90, 120 y 150 minutos) y con aceite de girasol sin exposición en dicha máquina. Se los colocó en la superficie de la placa de agar inoculada, teniendo en cuenta los siguientes datos: Deben presionarse hacia abajo para asegurar el contacto completo con la superficie del agar; distribuirlos uniformemente para que no se encuentren a menos de 24 mm de centro a centro; no colocar más de 12 discos en una placa de 150 mm o más de 5 discos en una placa de 100 mm; evitar ubicarlos cerca del borde debido

a que podrían presentarse halos no muy redondeados y que si un disco una vez entrado en contacto con la superficie del agar no se lo debe reubicar, en vez de esto se debe colocar uno nuevo en otra ubicación del agar. (Wikler, 2006).

Sabiendo estas indicaciones se colocó 4 discos por caja en el agar Mueller-Hinton con la ayuda de una pinza anatómica previamente esterilizada, evitando la posible superposición de los halos de inhibición; y posteriormente, se ubicó los agares en la incubadora y en un lapso de 24 horas se tomó datos de los halos de inhibición de cada uno de los tratamientos

4.6. Variable Respuesta.

4.6.1. Método de disco difusión.

Se impregnó una gota para cada disco de sensibilidad con las 3 muestras de aceite de girasol expuestos en la máquina generadora de ozono a distintos tiempos (90, 120 y 150 minutos) y de aceite de girasol sin exposición en la máquina generadora de ozono; se refrigeró por 24 h para evitar que el aceite se disemine por el agar.

Se inoculó las cepas bacterianas en tubos de ensayo con caldo Cerebro-Corazón, hasta tener una turbidez comparada con la del tubo #5 de la escala de McFarland. Luego se procedió a realizar la siembra con hisopos estériles, en la superficie de los agares Mueller-Hinton previamente preparados. Posteriormente se colocó los discos en los agares respectivos, las placas se las puso de manera invertida en la incubadora a 37 °C por 24 h.

Por último se evaluó el diámetro del halo de inhibición con una regleta Hiantibotic ZoneScale.

4.7. Diseño experimental y análisis estadísticos.

Se utilizó un diseño completamente al azar para el cálculo de los valores cuantitativos obtenidos de los halos de inhibición de crecimiento de las bacterias estudiadas. Asimismo se realizó el análisis de varianza según el diseño planteado y la prueba de Tukey 5% para comparar los tratamientos.

CAPÍTULO V
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. RESULTADOS.

5.1.1. MÉTODO DE DISCO DIFUSION

Tabla 2. Halos de Inhibición (tomados en mm) de la cepa bacteriana de *Salmonella choleraesuis* a tratamientos de aceite de girasol expuesto en la máquina generadora de ozono a diferentes tiempos.

Bacterias	Tratamiento				ESM	Valor P
	T0	T1	T2	T3		
	t0 = 0 minutos	t1 = 90 minutos	t2 = 120 minutos	t3 = 150 minutos		
<i>Salmonella choleraesuis.</i>	0	27.25 ^b	28.06 ^b	31.19 ^a	0.57	0.0001

^{a, b} Medias con letras diferentes en las filas difieren significativamente (P<0.05). **ESM:** Error estándar de la media. (T) Tratamiento, (t) Tiempo.

En la tabla 2 se observa que el tratamiento de aceite de girasol expuesto 150 minutos en la máquina generadora de ozono, en la cepa de *Salmonella choleraesuis*, muestra significancia (P= <0.0001) con halos de inhibición de 31.19 mm, en relación a los halos de 28.06 mm y 27.25 mm presentados en los tratamientos de aceite de girasol expuesto a 120 y 90 minutos en la máquina generadora de ozono, respectivamente. El Aceite de girasol sin exposición en la máquina generadora de ozono, no presentó formación de halos de inhibición en la bacteria tratada.

Tabla 3. Halos de Inhibición (tomados en mm) de la cepa bacteriana de *Escherichia coli* a tratamientos de aceite de girasol expuesto en la máquina generadora de ozono a diferentes tiempos.

Bacterias	Tratamiento				ESM	Valor P
	T0	T1	T2	T3		
	t0 = 0 minutos	t1 = 90 minutos	t2 = 120 minutos	t3 = 150 minutos		
<i>Escherichia coli.</i>	0	22.19 ^b	26.13 ^a	27.19 ^a	0.28	0.0001

^{a, b} Medias con letras diferentes en las filas difieren significativamente (P<0.05). **ESM:** Error estándar de la media. (T) Tratamiento, (t) Tiempo.

En la tabla 3 se observa que los tratamientos de aceite de girasol expuesto a 150 y 120 minutos en la máquina generadora de ozono, en la cepa de *Escherichia coli*, son similares estadísticamente con halos de 27.19 mm y 26.13 mm, respectivamente. Los dos tratamientos de aceite de girasol ya mencionados muestran significancia (P= <0.0001) en relación al aceite de girasol expuesto 90 minutos en la máquina de ozono, que presentó halos de 22.19 mm. El Aceite de girasol sin exposición en la máquina generadora de ozono, no presentó formación de halos de inhibición en la bacteria tratada.

Tabla 4. Halos de Inhibición (tomados en mm) de la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* a tratamientos de aceite de girasol expuesto en la máquina generadora de ozono a diferentes tiempos.

Bacterias	Tratamiento				ESM	Valor P
	T0	T1	T2	T3		
	t0 = 0 minutos	t1 = 90 minutos	t2 = 120 minutos	t3 = 150 minutos		
<i>Staphylococcus aureus.</i>	0	21.75 ^c	25.38 ^b	27.38 ^a	0.16	0.0001

^{a, b, c} Medias con letras diferentes en las filas difieren significativamente (P<0.05). **ESM:** Error estándar de la media. (T) Tratamiento, (t) Tiempo.

En la tabla 4 se observa que en el tratamiento de aceite de girasol expuesto 150 minutos en la máquina de ozono, en la cepa de *Staphylococcus aureus*, muestra significancia (P=

<0.0001) con halos de inhibición de 27.38 mm sobre los demás tratamientos de aceite de girasol expuesto a la máquina 120 y 90 minutos, que presentaron halos de inhibición de 25.38 mm y 21.75 mm, respectivamente. . El Aceite de girasol sin exposición en la máquina generadora de ozono, no presentó formación de halos de inhibición en la bacteria tratada.

Tabla 5. Halos de Inhibición (tomados en mm) de la cepa bacteriana de *Streptococcus agalactiae* a tratamientos de aceite de girasol expuesto en la máquina generadora de ozono a diferentes tiempos.

Bacterias	Tratamiento				ESM	Valor <i>P</i>
	T0	T1	T2	T3		
	t0 = 0 minutos	t1 = 90 minutos	t2 = 120 minutos	t3 = 150 minutos		
<i>Streptococcus agalactiae.</i>	0	18.63 ^c	23.19 ^b	25 ^a	0.27	0.0001

^{a, b, c} Medias con letras diferentes en las filas difieren significativamente ($P < 0.05$). **ESM:** Error estándar de la media. (T) Tratamiento, (t) Tiempo.

En la tabla 5 se observa que en el tratamiento de aceite de girasol expuesto 150 minutos en la máquina generadora de ozono, en la cepa de *Streptococcus agalactiae*, muestra significancia ($P = < 0.0001$) sobre los demás tratamientos, presentó halos de inhibición de 25 mm. Mientras que en los demás tratamientos de aceite de girasol expuesto a 120 y 90 minutos en la máquina de ozono, se dio halos inhibición de 23.19 mm y 18.63 mm, respectivamente. . El Aceite de girasol sin exposición en la máquina generadora de ozono, no presentó formación de halos de inhibición en la bacteria tratada.

5.2. DISCUSIÓN

La utilización de aceites ozonizados permiten tener alternativas al uso de antibióticos, los cuales pueden desarrollar resistencias y causar efectos perjudiciales para la salud, como lo confirma Esquivel *et al.* (2010); al evaluar el efecto antimicrobiano de aceites ozonizados (Díaz *et al.*, 2005). En estudios realizados en aceite de girasol ozonizado, según reportan Lezcano *et al.* (1998), se han presentado buenos resultados en diferentes géneros bacterianos; estos resultados han permitido su aplicación en estudios a nivel de

veterinaria, obteniéndose excelentes resultados relacionados al efecto antimicrobiano (Rodríguez et al., 2006).

El efecto antimicrobiano del aceite de girasol ozonizado se lo atribuye a la producción de productos de oxidación, como los peróxidos. Díaz *et al.* (2001), menciona que, mientras más tiempo se ozonize un aceite existe mayor formación de peróxidos. En tanto Díaz *et al.* (2006), relata que, si existe más cantidad de peróxidos habrá un mayor efecto antimicrobiano especialmente en el aceite de girasol; dicho efecto se comprobó en los resultados de la presente investigación.

La máquina generadora de ozono que se utilizó en la presente investigación, tiene especificaciones de 400mg/Litro/hora, y por esto se asume que los tiempos de exposición de 90, 120 y 150 minutos del aceite de girasol, en dicha máquina, nos da un estimado de 600mg/L, 800 mg/L y 1000 mg/L de concentración de ozono en condiciones ideales. Sin embargo, considerando que no contamos con un método de cuantificación de ozono disuelto, y de los productos de oxidación generados durante el proceso de ozonizado del aceite utilizado (índice de peróxido, índice de yodo, etc), consideramos como parámetro indicador el tiempo de aplicación del ozono.

En los resultados obtenidos de sensibilidad antimicrobiana los tratamientos de aceite de girasol expuesto 120 y 150 minutos en la máquina generadora de ozono, demostraron tener los mejores resultados tanto en bacterias Gram negativas (Lezcano *et al.*, 1998) como en Gram positivas (Curtiellas *et al.*, 2008) (Díaz *et al.*, 2005), mejorándose los estudios presentados por Skalska et al. (2009), quien tuvo resistencia en bacterias Gram negativas utilizando aceite de girasol ozonizado hasta 33,33 horas; y también presentando una gran variación a lo presentado por Díaz *et al.* (2001), quienes afirman que la Concentración Mínima Inhibitoria de productos ozonizados, se presenta desde los 44 minutos de exposición en una máquina generadora de ozono. Recalcando que cada ozonización se la realiza en condiciones distintas.

En relación al tiempo de exposición del aceite de girasol en una máquina de ozono, Díaz *et al.* (2006), menciona que, obtuvo excelentes resultados antimicrobianos del aceite de girasol expuesto a ozono durante 8 horas, a lo cual, dichos resultados fueron mejores en

nuestra investigación, debido a que solamente se expuso el aceite de girasol en la máquina de ozono hasta un máximo de 2,5 horas.

Los halos de inhibición obtenidos en la investigación fueron de: 31.19 mm; 27.19 mm; 27.38 mm y 25 mm en *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, respectivamente, en el aceite de girasol expuesto 150 minutos en la máquina generadora de ozono, mejorándose así los resultados presentados por Solarte (2015), quien obtuvo halos de inhibición de hasta 21.6 mm utilizando aceites esenciales; dicho aspecto se lo justifica por la exposición del aceite de girasol en una máquina generadora de ozono en el presente estudio.

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1. Conclusiones.

Se comprobó que existe efecto antimicrobiano del aceite de girasol expuesto en una máquina de ozono a 120 y 150 minutos, sobre bacterias Gram negativas y Gram Positivas.

En la determinación de la sensibilidad antimicrobiana, los halos de inhibición que se registraron fueron mejores en el aceite de girasol expuesto en la máquina de ozono durante 150 minutos en todas las cepas bacterianas investigadas.

La cepa bacteriana de *Salmonella choleraesuis* ATCC 10708 presentó mayor sensibilidad al aceite de girasol ozonizado en relación a las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Streptococcus agalactiae* ATCC 12386.

Con el análisis de los resultados se concluyó que el aceite de girasol a mayor tiempo de exposición en una máquina generadora de ozono presentó mayor efecto antimicrobiano.

6.2. Bibliografía.

Acha, P. N., & Szyfres, B. (2003). *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Volumen I*. Organización Panamericana de la Salud. 3ª ed.

Álvarez, R. G., Rodríguez, Z. Z., Luque, Y., Hernández, F., & Menéndez, S. (2007). Efecto del OLEOZON® frente a lesiones gástricas inducidas por indometacina en ratas. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 8(3), 1-6.

Andrea, M. P. M., & Cynthia, G. V. (2014) BACTERIAS GRAM NEGATIVAS. Volumen 49. Facultad de Odontología UMSA. Revista de Actualización Clínica.

Benenson, A.S. (1992). *El control de las enfermedades transmisibles en el hombre*. 15ª ed. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35, 34-34.

- CLSI. (2015). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Clinical and Laboratory Standards Institute. (Décima, 39 xVol. 35). USA. Retrieved from http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/M07A10_sample.pdf
- Curtiellas, V., Ledea, O., Rodríguez, S., Ancheta, O., Echevarría, M., Sánchez, E., & Fernández, I. (2008). El OLEOZON® sobre la viabilidad, la permeabilidad celular y la ultraestructura de *Staphylococcus aureus*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 39(2), 128-131.
- Delgado, M. Á. H. (2015). Eficacia terapéutica del aceite de girasol ozonizado frente a la infección por *Malassezia pachydermatis* en perros y gatos. *Revista Española de Ozonoterapia*, 5(1), 55-74.
- Díaz, M. F., Gastón, G., García, K., Sánchez, Y., & Tillan, J. (2006). Evaluación de la irritabilidad dérmica, oftálmica y el efecto sensibilizante del OLEOZON® tópico. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 7(11), 1-6.
- Díaz, M. F., Gavín Sazatornil, J. A., Ledea, O., Hernández, F., Alaiz, M., & Garcés, R. (2005). Spectroscopic characterization of ozonated sunflower oil. *Ozone: science & engineering*, 27(3), 247-253.
- Díaz, M. F., Hernández, R., Martínez, G., Vidal, G., Gómez, M., Fernández, H., & Garcés, R. (2006). Comparative study of ozonized olive oil and ozonized sunflower oil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(2), 403-407.
- Díaz, M., Lezcano, I., Molerio, J., & Hernández, F. (2001). Spectroscopic characterization of ozonides with biological activity. *Ozone Science and Engineering*, 23(1), 35-40.
- Esposito, E., Alonso, R., & Zamora, Z. Vet. Arg. Efecto preventivo y terapéutico del aceite de girasol ozonizado (AGO) de uso oral en la colibacilosis de crías. Vol. XXXII. N° 322. Febrero 2015.

- Esquivel, P., Pedroza, G., Sandoval, N., Mata, R., Mendoza, L., & Balderas, I. (2010). ENSAYO QUÍMICO DIRIGIDO Y ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DE ALGUNOS CONDIMENTOS EMPLEADOS EN LA COCINA MEXICANA. *Revista Salud Pública Y Nutrición*, 10, 7.
- Fernández Torres, I., Curtiellas Piñol, V., Sánchez Urrutia, E., & Gómez Regueiferos, M. (2006). In vitro antimicrobial activity of ozonized theobroma oil against *Candida albicans*. *Ozone: Science and Engineering*, 28(3), 187-190.
- Fraser, C. M., & Fraser, C. M. (1993). *El manual Merck de veterinaria: un manual de diagnóstico, tratamiento, prevención y control de las enfermedades para el veterinario* (No. V670 MAN 4a. ed).
- García, F. (2001). Resistencia bacteriana a antibióticos. *Acta Médica Costarricense*, 43(3), 101-102.
- Gil, A., & Samartino, L. (2001). Zoonosis en los sistemas de producción animal de las áreas urbanas y periurbanas de América Latina. *Food and Agriculture Organization livestock Information and Policita Breanh, AGAL*, (2).
- Ibar, M. P., Vigo, G. B., Piñeyro, P., Caffer, M. I., Quiroga, P., Perfumo, C. J.,... & Giacoboni, G. (2009). Serovariedades de *Salmonella* entérica subespecie entérica en porcinos de faena y su resistencia a los antimicrobianos.
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnóstico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana.
- Lezcano, I., Molerio, J., Gómez, M., Contreras, R., Roura, G., & Díaz, W. (1998). Actividad in vitro del OLEOZON frente a agentes etiológicos de infecciones en la piel [In vitro activity of oleozon against bacterial agents of skin infection]. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 29(3), 209-212.

- Lezcano, I., Nuñez, N., Espino, M., & Gómez, M. (2000). Antibacterial Activity of Ozonized Sunflower Oil, Oleozón, Against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Ozone: science & engineering*, 22(2), 207-214.
- Lozano, M. L. O. E. L. (2004). Estudio de la composición química del aceite de girasol ozonizado OLEOZON®. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 35(1).
- Menendez, S., Falcon, L., Simon, D. R., & Landa, N. (2002). Efficacy of ozonized sunflower oil in the treatment of tinea pedis. *Mycoses*, 45(7-8), 329-332.
- Noblet, M. C., Cepero, S. M., & Tapia, A. S. (2012). Efectos del aceite ozonizado en la Conjuntivitis Hemorrágica Epidémica. *Revista Española de Ozonoterapia*, 2(1), 107-120.
- Ramírez, A. M. C., Fernández, B. E. C., Denis, R., & Labrada, A. (2006). El Oleozón, una nueva perspectiva de tratamiento en la Medicina veterinaria. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 7(10), 1-5.
- Rodríguez, Z. Z., Carvajal, Y. G., & Ledon, N. (2006). Efecto del Aceite de Girasol Ozonizado sobre la Actividad de la Mieloperoxidasa en el Modelo de Edema en la Oreja del Ratón. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 7(12), 1-6.
- Sacsquispe Contreras, R., & Velásquez Pomar, J. (2008). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Ministerio de Salud de Lima, Perú.
- Skalska, K., Ledakowicz, S., Perkowski, J., & Sencio, B. (2009). Germicidal properties of ozonated sunflower oil. *Ozone: Science & Engineering*, 31(3), 232-237.
- Solarte AL. 2015. Aplicación de aceites esenciales para el control de *Salmonella typhimurium* aislada de casos clínicos en diferentes especies animales. Trabajo fin de Master. Universidad de Córdoba, España. 28 p.
- Stanchi, N.O. 2007. Microbiología Veterinaria. Intermedica. Buenos Aires, Argentina.

- Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2011). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infection*, 12(3).
- Tavares, W. (2000). Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 33(3), 281-301.
- Velasco Zebadúa, M. E., & Yamasaki Maza, A. (2002). Bacterias de interés veterinario. *Medicina Veterinaria*, (E 19 (1)).
- Wikler, M. A. (Ed.). (2006). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard*. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Zamora Rodríguez, Z., Pérez, I., & Sosa, I. (2015). Aceite de girasol ozonizado de uso oral como tratamiento en los procesos diarreicos del conejo. *Veterinaria (Montevideo)*, 51(199), 1-1.

6.3. Anexos.

Anexo 1. Datos de halos de inhibición tomados en milímetros.

Tratamiento	Repeticiones	<i>Salmonella choleraesuis.</i>	<i>Escherichia coli.</i>	<i>Staphylococcus aureus.</i>	<i>Streptococcus agalactiae.</i>
T0	1	0	0	0	0
T0	2	0	0	0	0
T0	3	0	0	0	0
T0	4	0	0	0	0
T0	5	0	0	0	0
T0	6	0	0	0	0
T0	7	0	0	0	0
T0	8	0	0	0	0
T0	9	0	0	0	0
T0	10	0	0	0	0
T0	11	0	0	0	0
T0	12	0	0	0	0
T0	13	0	0	0	0
T0	14	0	0	0	0
T0	15	0	0	0	0
T0	16	0	0	0	0

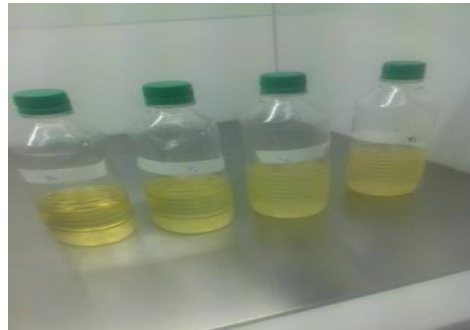
T1	1	25	16	22	19
T1	2	27	23	23	18
T1	3	27	24	21	17
T1	4	29	23	23	19
T1	5	29	19	20	18
T1	6	27	25	22	18
T1	7	27	22	22	19
T1	8	29	23	23	20
T1	9	28	23	22	19
T1	10	30	23	22	19
T1	11	29	22	20	19
T1	12	29	22	21	20
T1	13	24	22	20	18
T1	14	27	23	21	18
T1	15	25	23	23	17
T1	16	24	22	23	20
T2	1	26	25	23	23
T2	2	27	25	29	24
T2	3	25	26	26	22
T2	4	27	27	25	23
T2	5	28	26	26	23
T2	6	29	27	25	23
T2	7	30	27	26	24
T2	8	29	26	24	24
T2	9	28	27	26	24
T2	10	27	26	25	23
T2	11	28	25	25	23
T2	12	30	27	25	24
T2	13	29	26	24	24
T2	14	28	28	26	23
T2	15	29	25	26	22
T2	16	29	25	25	22
T3	1	30	27	28	25
T3	2	31	27	27	25
T3	3	30	28	28	24
T3	4	29	27	28	26
T3	5	29	28	28	25
T3	6	32	28	26	25
T3	7	33	28	27	24
T3	8	31	30	26	24
T3	9	32	27	27	24

T3	10	31	27	27	24
T3	11	32	26	28	25
T3	12	31	27	28	24
T3	13	32	26	28	28
T3	14	33	28	27	26
T3	15	31	25	27	26
T3	16	32	26	28	25

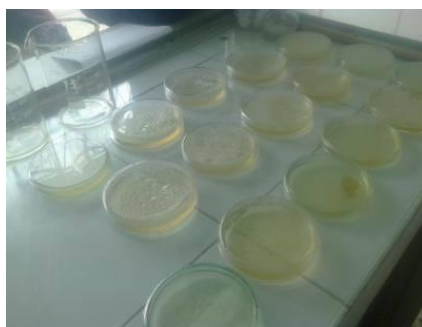
Anexo 2. Materiales.



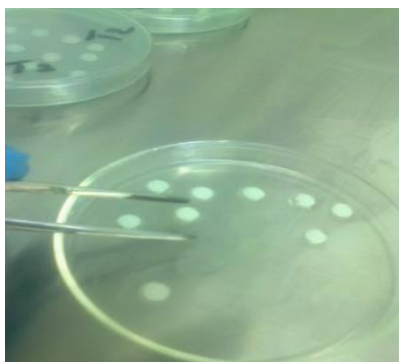
Model	GL-3189
Voltage/Frequency	AC110V 60Hz
Rated Power	12W
Ozone Output	400mg/H
Working Time	5, 10, 15, 20, 25, 30 mins
Dimensions	270×190×75mm
Net Weight	0.88kg
CE RoHS	

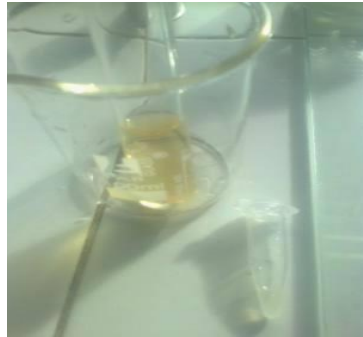


Anexo 3. Preparación de medios de cultivo.

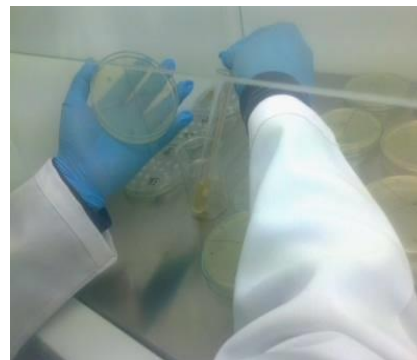
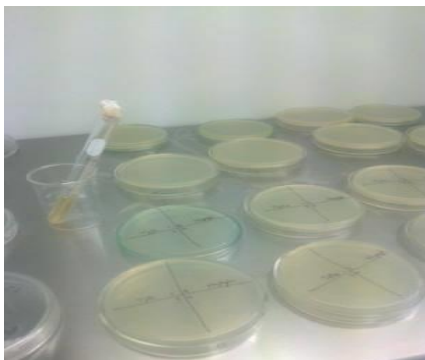


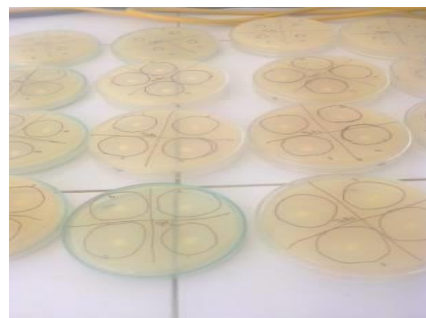
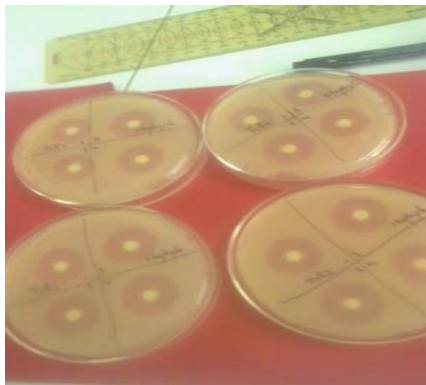
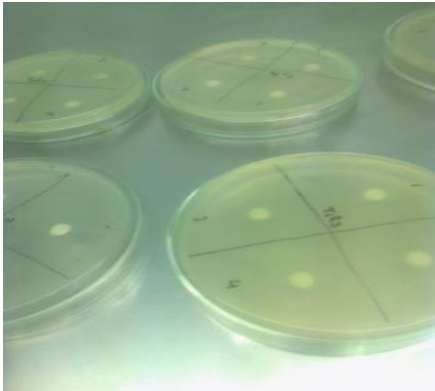
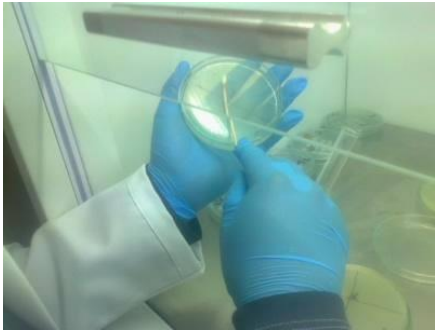
Anexo 4. Impregnación de discos y activación de bacterias.

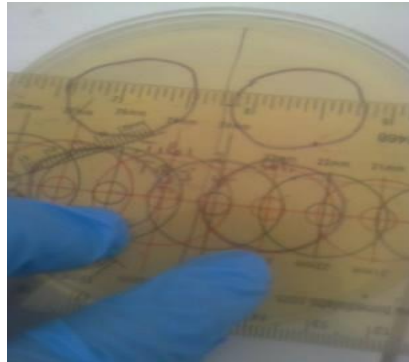




Anexo 5. Determinación de los halos de inhibición.







CAPITULO VII

7. PROPUESTA

7.1. DATOS INFORMATIVOS

Tema: “Incorporación de aceite de girasol expuesto en una máquina generadora de ozono durante 150 minutos, como tratamiento de infecciones producidas por enterobacterias en perros”

7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

Es común que se utilice diferentes métodos para tratar las enfermedades en los animales domésticos, con el objetivo de mejorar el estado de salud de nuestros pacientes, para lo cual es una buena alternativa la administración del Aceite de Girasol Ozonizado por vía oral como tratamiento en infecciones entéricas, teniendo así una alternativa eficiente.

La información disponible sobre el uso de aceites ozonizados como agentes antimicrobianos es amplia, pero la disponibilidad de estos aceites comerciales son difíciles de obtenerlos y mediante esta investigación se demostró que es factible poder realizar un aceite ozonizado de manera artesanal con las mismas propiedades antimicrobianas.

7.3. JUSTIFICACIÓN

La utilización de aceites ozonizados podrían mejorar los aspectos endógenos, llegando a obtener mejores resultados del tratamiento en menor tiempo.

Este proyecto tiene por objeto suministrar una vez al día, por vía oral, aceite de girasol expuesto a una máquina de ozono por 150 minutos, a perros con infecciones entéricas, las cuales permiten incrementar alternativas de tratamientos a diversas infecciones.

Se justifica el uso de aceites ozonizados como un método curativo debido a su alta eficacia antimicrobiana que se comprobó en nuestra investigación.

La misión de la Universidad Técnica de Ambato es satisfacer la demanda científica de la sociedad ecuatoriana, en interacción dinámica con sus actores.

7.4. OBJETIVOS

7.4.1. Objetivo general

Incorporar aceite de girasol expuesto en una máquina generadora de ozono durante 150 minutos, como tratamiento de infecciones producidas por enterobacterias en perros.

7.4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto antimicrobiano, del aceite de girasol expuesto en una máquina de ozono durante 150 minutos, en perros con infecciones producidas por enterobacterias.
- Determinar el número de aplicaciones del aceite de girasol expuesto en una máquina de ozono durante 150 minutos, en perros con infecciones producidas por enterobacterias.

7.5. ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD

Este proyecto es de fácil aplicación, debido a que el aceite de girasol es el que comúnmente lo encontramos de forma comercial en supermercados y para ozonizarlo lo podemos realizar en clínicas u otros lugares que posean la máquina de ozono, el tiempo está basado en las especificaciones de la máquina utilizada en este proyecto, siendo de 400mg/litro/hora, siendo necesario estar conectada a un tanque de oxígeno al momento de realizar la ozonización, algo que actualmente es normal conseguirlo en la mayoría de clínicas o en sitios que purifiquen agua. Mientras que la administración también resulta factible debido a que podemos suministrarlo una vez al día directamente en el hocico del animal mediante el uso de una jeringa

7.6. FUNDAMENTACIÓN

La demanda de tratamientos que resulten efectivos a nivel práctico han venido incrementándose desde hace varios años , debido a que las bacterias se han vuelto resistentes a los tratamientos tradicionales y ciertos fármacos han perdido eficacia ante las mismas, por lo cual es necesario desarrollar opciones que ayuden a contrarrestar estos efectos de resistencia mejorando el estado de salud de nuestros pacientes, consolidando un tratamiento efectivo en la lista de opciones para combatir diversas infecciones.

7.7. METODOLOGÍA.

- Cálculo de la dosis diaria, en ml, a suministrarse el aceite de girasol ozonizado.
- Administración del aceite de girasol ozonizado directamente en el hocico del animal, mediante el uso de una jeringa.
- El número de aplicaciones se determinará de acuerdo al número de días necesarios que se necesite suministrar el tratamiento.

7.8. ADMINISTRACIÓN

La administración de esta investigación estará a cargo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

Se recomienda realizar la evaluación del proyecto para que los resultados sean confiables, y los mismos publicados en beneficio de nuestro pacientes.