

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

TEMA:

“EFICACIA ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE TOMILLO (*T. vulgaris*), CANELA (*C. verum*), ROMERO (*R. officinalis*), LAUREL (*L. nobilis*)
SOBRE CEPAS DE *Pasteurella multocida* Y *Bordetella bronchiseptica*”

“Documento Final del Proyecto de Investigación como requisito para obtener el
grado de Médico Veterinario Zootecnista”

AUTOR:

ALEX JAVIER ROBALINO CHARIGUAMAN

TUTOR:

DR. WILLIAM CALERO CÁCERES, PhD

Cevallos – Ecuador

2019

APROBACIÓN

“EFICACIA ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE TOMILLO (*T. vulgaris*), CANELA (*C. verum*), ROMERO (*R. officinalis*), LAUREL (*L. nobilis*)
SOBRE CEPAS DE *Pasteurella multocida* Y *Bordetella bronchiseptica*”

REVISADO POR:

.....
Dr. William Calero PhD.

TUTOR

DERECHOS DE AUTOR

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “EFICACIA ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES de Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*) SOBRE CEPAS de *P. multocida* Y *B. bronchiseptica*” como uno de los requisitos previos para la obtención del Título de grado de Medica Veterinaria 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 ponga 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”.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

“EFICACIA ANTIMICROBIANA DE ACEITES ESENCIALES DE TOMILLO (*T. vulgaris*), CANELA (*C. verum*), ROMERO (*R. officinalis*), LAUREL (*L. nobilis*) SOBRE CEPAS DE *Pasteurella multocida* Y *Bordetella bronchiseptica*”

APROBADO POR:

FECHA:

.....

Ing. Mg. Giovanni Velastegui Espín

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

Dra. Sandra Cruz PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

Dra. Diana Avilés PhD

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DEDICATORIA

A mi Dios quien siempre ha sabido guiarme y llevarme de su mano llenándome de fuerzas para seguir adelante y no permitirme desmayar ante las adversidades.

A mi padre por su gran apoyo moral, por ser un ejemplo de perseverancia, por cada palabra de aliento que me da para no rendirme ante los percances que se presentan en el camino.

A mis hermanos, gracias por el apoyo que siempre me han brindado, en especial a Gabriel por ser también mi gran amigo, confidente y compañero de lucha.

Dedico principalmente mi tesis a mi Madrecita que hoy tristemente no se encuentra en este plano terrenal, a ella que a pesar de su ausencia me sigue acompañando en mis sueños, en mi día a día con cada palabra que recuerdo de aliento y fuerzas, con su dedicación y buen legado que nos dejó de responsabilidad, respeto y amor incondicional con todo aquello que decidamos hacer.

Te amare por siempre Madrecita...

AGRADECIMIENTO

Agradezco A Dios principalmente por darme el privilegio de la vida, de gozar de excelente salud y guiarme a lo largo de mi existencia, por ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

Agradecido con mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por confiar y creer en mí, por sus sabios consejos que los he sabido aplicar a lo largo de mi vida.

A mis Tíos Aurelio, Teresa y Rafael que han estado ahí presentes siempre y mucho más cuando les he necesitado. Quiero agradecerles en esta ocasión tan especial por todas sus ayudas y compromisos para conmigo. Que Dios me los bendiga.

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato por haberme brindado tantas oportunidades y enriquecerme de conocimientos.

Finalmente quiero expresar mi más grande y sincero agradecimiento al Dr. William Calero Cáceres principal colaborador durante todo este proceso, quien con su conocimiento, enseñanza y colaboración me permitió el desarrollo de este trabajo.

Índice General de Contenidos

APROBACIÓN	i
DERECHOS DE AUTOR.....	ii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN EJECUTIVO	x
ABSTRACT (SUMMARY).....	xi
CAPITULO I.....	1
MARCO TEORICO.....	1
1.1 Antecedentes Investigativos	1
1.2 OBJETIVOS.....	6
OBJETIVO GENERAL	6
OBJETIVO ESPECÍFICO.....	6
CAPITULO II.....	7
METODOLOGÍA.....	7
Ubicación del Experimento	7
Localización del Área de Estudio	7
Características del Lugar	7
2.1 MATERIALES	8
Material Vegetal	8
Material biológico	8
Reactivos de Laboratorio	8
Equipos de Laboratorio	8

Instrumentos de Laboratorio	8
Insumos	9
Materiales de Escritorio	10
2.2.2 Factores de Estudio	10
2.2.3 Tratamientos	10
2.2.4 Diseño Experimental	11
2.2.5 Hipotesis	12
METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	12
Aislamiento y criopreservación de las muestras bacterianas <i>P. multocida</i> y <i>B. bronchiseptica</i>	12
Activación de la bacteria	13
Preparación de Diluciones	13
Preparación de diluciones de los aceites esenciales	13
Preparación de la microplaca de 96 pocillos	13
Medios de Aislamiento	14
Agar Mueller – Hinton	14
Siembra del Inoculo en Agar Mueller – Hinton	14
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)	15
Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	15
Colocación de discos y Medición de los halos de Inhibición	15
CAPITULO III	16
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
3.1 Análisis y discusión de los resultados	16
3.2 Verificación de la Hipótesis	25
CAPITULO IV	26
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	26
4.1 Conclusiones	26

MATERIALES DE REFERENCIA	27
BIBLIOGRAFIA	27
ANEXOS	31
Anexo 1 Siembra en placa de la Cepa bacteriana <i>B. bronchiseptica</i>	31
Anexo 2 Siembra en placa de la Cepa bacteriana <i>B. bronchiseptica</i>	31
Anexo 3 Siembra en placa de la Cepa bacteriana <i>B. bronchiseptica</i>	32
Anexo 4 Siembra en placa de la Cepa bacteriana <i>B. bronchiseptica</i>	32
Anexo 5 Siembra en placa de la Cepa bacteriana <i>P. multocida</i>	33
Anexo 6 Siembra en placa de la Cepa bacteriana <i>P. multocida</i>	33
Anexo 7 Siembra en placa de la Cepa bacteriana <i>P. multocida</i>	34
Anexo 8 Halos de Inhibición de los aceites esenciales Tomillo (<i>T. vulgaris</i>), Canela (<i>C. verum</i>), Romero (<i>R. officinalis</i>), Laurel (<i>L. nobilis</i>) sobre cepas bacteriana de <i>P. multocida</i>	34
Anexo 9 Halos de Inhibición de los aceites esenciales Tomillo (<i>T. vulgaris</i>), Canela (<i>C. verum</i>), Romero (<i>R. officinalis</i>), Laurel (<i>L. nobilis</i>) sobre cepas bacteriana de <i>B. bronchiseptica</i>	35
Anexo 10 Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos de los aceites esenciales de Tomillo, Canela, Romero y Laurel sobre la cepa bacteriana de <i>B. bronchiseptica</i>	36
Anexo 11 Prueba de TUKEY HSD/KRAMER de los aceites esenciales Laurel, Canela, Tomillo y Romero	37
Anexo 12 Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos de los aceites esenciales de Tomillo, Canela, Romero y Laurel sobre la cepa bacteriana de <i>P. multocida</i>	38
Anexo 13 Prueba de TUKEY HSD/KRAMER de los aceites esenciales Laurel, Canela, Tomillo y Romero	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Descripción de los aceites esenciales a ser utilizados con cada una de las cepas bacterianas	11
Tabla 2 Microplaca para la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (Rangos ampliados) de Laurel (<i>L. nobilis</i>), Canela (<i>C. verum</i>), Tomillo (<i>T. vulgaris</i>) y Romero (<i>R. officinalis</i>) sobre la cepa bacteriana <i>P. multocida</i> y <i>B. bronchiseptica</i> ..	16
Tabla 4 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Romero (<i>R. officinalis</i>)	18
Tabla 5 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Canela (<i>C. verum</i>).....	18
Tabla 6 Actividad antimicrobiana del Aceite esencial de Tomillo (<i>T. vulgaris</i>)	19
Tabla 7 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Laurel (<i>L. nobilis</i>) sobre la cepa bacteriana de <i>P. multocida</i>	19
Tabla 8 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Canela (<i>C. verum</i>) sobre la cepa bacteriana <i>P. multocida</i>	20
Tabla 9 Actividad Antimicrobiana del Aceite esencial de Romero (<i>R. officinalis</i>) sobre la cepa bacteriana <i>P. multocida</i>	20
Tabla 10 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Tomillo (<i>T. vulgaris</i>).....	21
Tabla 12 Halos de sensibilidad antimicrobiana (mm) de los aceites esenciales Laurel (<i>L. nobilis</i>), Canela (<i>C. verum</i>), Tomillo (<i>T. vulgaris</i>) y Romero (<i>R. officinalis</i>) sobre la cepa bacteriana <i>P. multocida</i> ATCC® 12945 TM*.....	23
Tabla 13 Para la cepa bacteriana <i>B. bronchiseptica</i> ATCC® 4617 TM* los halos de inhibición (mm) de los aceites esenciales Laurel (<i>L. nobilis</i>), Canela (<i>C. verum</i>), Tomillo (<i>T. vulgaris</i>) y Romero (<i>R. officinalis</i>) fueron los siguientes:	24

RESUMEN EJECUTIVO

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana que tiene los aceites esenciales de Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*) sobre cepas certificadas de *P. multocida* ATCC® 12945 TM* y *B. bronchiseptica* ATCC® 4617 TM*. Para la estimación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CIMs) se utilizó el método de microdilución en placa, mientras que para la estimación de las concentraciones mínimas bactericidas (CMBs) se utilizó la técnica de siembra en placa. La CMI de los aceites esenciales evaluados fueron las siguientes Laurel (*L. nobilis*) 0.8%, Canela (*C. verum*) 3.8%, Tomillo (*T. vulgaris*) 2.4% y Romero (*R. officinalis*) 10.5% sobre la cepa bacteriana *P. multocida* ATCC® 12945 TM* y de Laurel (*L. nobilis*) 1.8%, Canela (*C. verum*) 6.7%, Tomillo (*T. vulgaris*) 10.1% y Romero (*R. officinalis*) 3.5% sobre *B. bronchiseptica* ATCC® 4617 TM*. Las CMBs de los aceites esenciales evaluados fueron: Laurel (*L. nobilis*) 2.1%, Canela (*C. verum*) 7%, Tomillo (*T. vulgaris*) 10.3% y Romero (*R. officinalis*) 7% para la cepa bacteriana *B. bronchiseptica* ATCC® 4617 TM* y de Laurel (*L. nobilis*) 1%, Canela (*C. verum*) 4.3%, Tomillo (*T. vulgaris*) 2.7% y Romero (*R. officinalis*) 11.1% sobre la cepa bacteriana *P. multocida* ATCC® 12945 TM* respectivamente. El porcentaje de inhibición de los aceites esenciales evaluados en comparación a gentamicina (160 mg/mL) se encontró entre el 33.78% al 40.84% en el caso de *P. multocida* y del 5.98% al 22.35% en el caso de *B. bronchiseptica*.

Palabras claves:

P. multocida, *B. bronchiseptica*, Concentración Mínima Inhibitoria Concentración Mínima Bactericida, Sensibilidad Antimicrobiana. Microplaca de 96 pocillos.

ABSTRACT (SUMMARY)

The aim of this study was the evaluation of the antimicrobial activity of Thyme (*T. vulgaris*), Cinnamon (*C. verum*), Rosemary (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*) essential oils on certified strains of *Pasteurella multocida* ATCC® 12945 TM * and *Bordetella bronchiseptica* ATCC® 4617 TM *. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were estimated by microdilution method; and the plate plating (Mueller Hinton agar) was applied for the estimation of the minimum bactericidal concentrations (MBCs). The MICs of the evaluated essential oils, at the experimental conditions were: *P. multocida* ATCC® 12945 TM * (*L. nobilis* 0.8%, *C. verum* 3.8%, *T. vulgaris* 2.4% and *R. officinalis* 10.5%); for *B. bronchiseptica* ATCC® 4617 TM *. (*L. nobilis* 1.8%, *C. verum* 6.7%, *T. vulgaris* 10.1% and *R. officinalis* 3.5%). The MBCs of the evaluated essential oils were: *L. nobilis* 2.1%, *C. verum* 7%, *T. vulgaris* 10.3% and *R. officinalis* 7% for *B. bronchiseptica* ATCC® 4617 TM *; for *P. multocida* ATCC® 12945 TM * were *L. nobilis* 1%, *C. verum* 4.3%, *T. vulgaris* 2.7% and *R. officinalis* 11.1%. The inhibition percentages of the evaluated essential oils (compared to gentamicin 160 mg / mL) was found between 33.78% - 40.84% in the case of *P. multocida* and between 5.98% - 22.35% for *B. bronchiseptica*.

Key words:

P. multocida, *B. bronchiseptica*, Minimum Inhibitory Concentration Minimum Bactericidal Concentration, Antimicrobial Sensitivity, 96-well microplate.

CAPITULO I

MARCO TEORICO

1.1 Antecedentes Investigativos

El trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la eficacia antimicrobiana in vitro del aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) sobre *Staphylococcus aureus*. Se evaluaron concentraciones al 1, 5, 10, 30, 50, 70 y 90% en dilución en etanol al 96.8%. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria mediante el método de microdilución en caldo. El inóculo bacteriano se estandarizó al 0.5 de la escala de MacFarland en espectrofotómetro, teniendo como resultado que el tubo al 1% de aceite de tomillo no presentó turbidez. Este, al ser sembrado en agar Mueller-Hinton determinó la Concentración Bactericida Mínima donde no se observó crecimiento de colonias. Los resultados indican que los tratamientos al 5 y 10% no son significativamente diferentes ($p < 0.05$) con valores de halos de inhibición de 15.35 mm y 15.9 mm, respectivamente, en comparación al 1% que presentó 12.2 mm de halo de inhibición (Montero, Mira, Avilés, Pazmiño, Erazo, 2018).

El efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre cepas de *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhimurium* fue investigado. El aceite de canela se obtuvo a través del método de destilación por arrastre de vapor y sometido a decantación, almacenándolo en refrigeración a 4 °C. Se aplicó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos (10, 30, 50, 70 90% de aceite de canela) y cinco repeticiones. La Concentración Mínima Inhibitoria determinada del extracto se verificó al 50, 70 y 90% del aceite. En agar Mueller-Hinton se observó cero crecimientos de colonias con respecto a la Concentración Bactericida Mínima. La cepa *Salmonella typhimurium* presentó mayor sensibilidad al aceite de canela que la cepa *Salmonella choleraesuis*, en referencia al diámetro de los halos de sensibilidad (Montero, Revelo, Avilés, Valle, Guevara, 2017).

El objetivo del trabajo de investigación fue evaluar in vitro la eficacia antimicrobiana del extracto de aceite crudo de romero (*Rosmarinus officinalis*) en *Escherichia coli*. Las concentraciones se evaluaron al 20%, 40%, 60 y 80% en dilución en etanol al 96,8%. La MIC se determinó mediante el método de microdilución en caldo, el inóculo bacteriano de la cepa ATCC 25922 se activó en el agar diferencial para Enterobacterias

MacConkey y se estandarizó a 0,5 de la escala MacFarland en espectrofotómetro, teniendo como resultado que el tubo al 60% y El extracto de aceite de romero al 80% no presentó turbidez, que cuando se plantó en agar Mueller-Hinton determinó el MBC en el que no se observó crecimiento de colonias. La medición de los anillos de inhibición formados a partir de los discos OXOID impregnados con las concentraciones del extracto de aceite de romero más el 70% de disolvente de etanol se realizó y se concluyó que el 60% y el 80% de extracto de aceite tenían el mayor efecto antibacteriano al formar halos. de 9,10 mm y 10,90 mm respectivamente (Montero, Martínez, Avilés, Valle, Pazmiño, 2017).

Pasteurella multocida y *Bordetella bronchiseptica* son dos bacterias de considerable importancia en el campo de Medicina Veterinaria. Se acepta ampliamente que los serotipos y patotipos específicos de las cepas de *P. multocida* son responsables de la mayoría de los síndromes de enfermedades respiratorias en cerdos que están asociados con neumonía, rinitis atrófica y / o infección por *Mycoplasma* (Davies et al. 2019). *B. bronchiseptica* es el agente causal de diversos problemas respiratorios en diferentes especies animales; como agente primario de enfermedad, ocasiona rinitis atrófica del cerdo, tos de las perreras o traqueobronquitis del perro, bronconeumonía en perros, neumonía en conejos, descarga nasal con tos y estornudos en gatos. La infección en humanos puede ocurrir después del contacto con animales enfermos o infectados (Basurto et al. 2005). Ambas bacterias representan importantes agentes zoonóticos, responsables de ciertas infecciones en humanos relacionadas con animales portadores (Register and Brockmeier 2019, Kadlec and Schwarz 2018).

En la actualidad existen diferentes tipos de terapias antimicrobianas en el campo de la veterinaria con el objetivo de buscar un tratamiento más efectivo sobre la enfermedad de la pasteurelosis; sin embargo, existe un incremento notable sobre la resistencia antimicrobiana sin el control adecuado sobre el uso de mencionados fármacos, especialmente Tetraciclina y sulfonamidas que se utilizan comúnmente en la industria porcina. Debido al uso generalizado de tetraciclina, en gran parte de las especies bacterianas que causan enfermedades en animales, estos han desarrollado resistencia a la tetraciclina. (Michael et al. 2018). Para comprobar la resistencia antimicrobiana al uso de dichos antibióticos se probó utilizando tiras reactivas de concentración inhibitoria mínima (MIC) (Liofilchem, Roseto, Italia). Susceptibilidad a 18 agentes

antimicrobianos (penicilina, ampicilina, cefalotina, estreptomina, gentamicina, espectinomicina, tetraciclina, doxiciclina, eritromicina, clindamicina, florfenicol, cloranfenicol, sulfametoxazol, trimetoprim-sulfametoxazol, enrofloxacina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico y colistina) (Ujvári et al. 2018).

En humanos y animales, la terapia antimicrobiana representa la herramienta más efectiva para el tratamiento de la pasteurelosis y bordetelosis; sin embargo, el uso y sobreuso de antibióticos, especialmente en el sector agropecuario, ha provocado una escalada en los patrones de resistencia a antibióticos alrededor del mundo, representando en la actualidad un problema grave de salud pública (Reardon 2014, WHO 2016). A nivel general, el primer tratamiento elegido para el tratamiento clínico de infecciones relacionadas con *B. bronchiseptica* es el uso de tetraciclinas; sin embargo, se observa un considerable incremento en las tasas de resistencia en diferentes países (Kadlec and Schwarz 2018). Considerando el presente escenario mundial sobre resistencia antimicrobiana, es imperativo encontrar alternativas que reduzcan el uso de antibióticos en el sector agropecuario que permitan detener la evolución descontrolada en los fenotipos y genotipos de resistencia en bacterias.

Ciertos extractos de plantas y aceites esenciales han sido utilizados ancestralmente para el tratamiento de diferentes enfermedades. En los últimos años, se ha demostrado por medio de estudios *in vitro* la actividad biológica de los mismos frente a una gran diversidad de microorganismos (Hammer et al. 1999). De manera particular, el aprovechamiento de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales es fundamental para las aplicaciones industriales que se le ha dado, como por ejemplo para la preservación de alimentos, productos farmacéuticos, terapias alternativas y medicinales (Bakkali et al. 2008). Aceites esenciales como el de tomillo, canela, romero y laurel han demostrado poseer una considerable actividad antimicrobiana frente a diversos patógenos en estudios *in vitro* (Sakkas and Papadopoulou 2016, Bagamboula et al. 2004, Schelz et al. 2006, Lopez et al. 1992, Ríos and Recio 2005, Hammer et al. 1999, Montero et al. 2017).

El aceite esencial de tomillo, que en su composición incluye a carvacol, borneol, geraniol y timol, este aceite esencial ha sido reconocido por su gran actividad antimicrobiana, atribuida fundamentalmente al timol y al carvacol. Adicionalmente, este aceite esencial ha demostrado actividad antifúngica en estudios *in vitro*. (Soto et

al. 2006). El aceite esencial de tomillo también tiene en su composición una variedad de flavonoides, que incluyen apigenina, naringenina, luteolina y timonina. Estos flavonoides tienen la capacidad antioxidante del tomillo (Kassem et al. 2011). También se sabe que los componentes de aceite volátil del tomillo tienen actividad antimicrobiana contra diferentes tipos de bacterias y hongos (Dorman and Deans 2000). Otros aceites esenciales obtenidos de condimentos y plantas de condimento, como la albahaca, la canela, el orégano, el romero, la salvia y el tomillo han sido objeto de estudio, porque además de sus propiedades organolépticas, estos compuestos poseen propiedades biológicas (Hammer et al. 1999, Sakkas and Papadopoulou 2016). Dado que los principales constituyentes de estos aceites esenciales son hidrocarburos terpénicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, fenoles, ésteres y ácidos orgánicos, en diferentes concentraciones y con un componente farmacológicamente activo importante, poseen gran actividad que inhiben la acción de patógenos transmitidos por los alimentos (Bagamboula et al. 2004). Entre estas sustancias, los compuestos fenólicos son los principales responsables de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales.

La actividad antibacteriana y antifúngica se determinó mediante el método de difusión en agar. Los discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro (Blank estéril, Difco) se impregnaron con 10 μ L de los aceites esenciales en diversas diluciones que fueron utilizados en esta parte experimental. Las diferentes cepas bacterianas que fueron utilizadas se mantuvieron en tubos de Trypticase Soy Agar (Difco) y los hongos en tubos de Sabouraud - Chloramphenicol Gel (Pasteur). Después de un período de incubación de 24 ha 35 °C (bacterias) y 28 - 30 °C (hongos), se inocularon 4 o 5 colonias en 4 ml de Caldo de soja (bacterias) Bacto Trypticase o Caldo de Dextrosa Bacto Sabouraud (hongos), los mismos que se incubaron durante 2 horas a 35 °C y 30 °C respectivamente. Estos inóculos se ajustaron al estándar de 0,5 de la escala de MacFarland. Estas diluciones se prepararon con agua destilada estéril a partir de las primeras mezclas de aceites esenciales / Tween 20. Las diluciones analizadas fueron 1/2, 1/4, 1/8, 1/16. Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y el control empleado consistió en discos de cloranfenicol (30 μ g) en el antibacteriano y nistatina (100 unidades) en los ensayos antifúngicos. Las placas de Petri se refrigeraron (4 °C) durante 30 minutos para facilitar la difusión del aceite esencial en el medio antes de la incubación. Posteriormente, se incubaron a 37 °C durante 24 h en el caso de las

bacterias, mientras que los hongos se cultivaron a 30 °C a 24 y 48 h. Después de la incubación, los anillos de inhibición del crecimiento se cuantificaron midiendo el diámetro de la zona de inhibición en mm (incluido el diámetro del disco), desde la superficie inferior de la placa de Petri. Con respecto al aceite esencial de *C. canariensis* var. *cunariensis*, en los ensayos antibacterianos, destaca la potente inhibición presentada contra *Klebsiella pneumoniae* y *Bordetella bronchiseptica*, con valores superiores a los del cloranfenicol. *Bordetella bronchiseptica* incluso tenía que medirse a las 48 h, ya que a las 24 h había una falta total de crecimiento (Lopez et al. 1992).

El aceite esencial de *T. vulgaris* y su principal compuesto timol mostraron actividades bacteriostáticas y bactericidas contra cepas de *E. coli* in vitro. No obstante, la actividad del aceite esencial fue superior al compuesto solo (Santurio et al. 2014). En realidad, el interés comercial y académico en el aceite de romero (*R. officinalis* L.) radica en su capacidad antioxidante y liposoluble, uso cosmético y farmacéutico y potencial de la industria alimentaria (Peng et al. 2005).

La técnica de destilación por arrastre de vapor se emplea con mucha frecuencia para la separación de los aceites esenciales de los tejidos vegetales. Para esta técnica de obtención de los aceites esenciales se utiliza vapor saturado, ya sea en una caldera o un matraz. Se coloca el agua destilada en el matraz no. 1: se genera vapor. En el matraz no. 2 se coloca el té limón cortado en trozos pequeños. Al tapar este matraz, sé cuida que la conexión de vidrio no se obstruya. Se calienta con el mechero el matraz no. 1 hasta ebullición y se genera vapor que pasara al matraz no. 2, extrayéndose de esta manera el aceite esencial; inmediatamente arrastrado por el vapor. Se suspende el calentamiento cuando el volumen del destilado es de 100 o 150 mL aproximadamente. De este destilado se extrae totalmente el aceite esencial, colocando en el embudo de separación el destilado y separando la mayor parte de la fracción acuosa. Al aceite sobrenadante. La fase acuosa se desecha y el extracto orgánico se colecta en un matraz Erlenmeyer o un vaso de precipitados (Domínguez and Domínguez 1990).

En la presente investigación, evaluaremos *in vitro* la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de canela, romero, tomillo y laurel comercializados en el país, frente a cepas certificadas de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*.

3.1 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la eficacia antimicrobiana de los aceites esenciales como Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*) sobre cepas certificadas de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*.

OBJETIVO ESPECÍFICO

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales como Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*) sobre cepas certificadas de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*.
- Determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los aceites esenciales como Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*) sobre cepas certificadas de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*.
- Determinar la eficacia antimicrobiana de los aceites esenciales como Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*) sobre cepas certificadas *P. multocida* y *B. bronchiseptica*.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

Ubicación del Experimento

Localización del Área de Estudio

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato ubicada en el sector de Querochaca, perteneciente al Cantón Cevallos, provincia de Tungurahua a una distancia de 19 km al del Cantón Ambato, con una altitud de 2 865 msnm, cuyas coordenadas geográficas son: 01°22'0,2'' de latitud Sur y 78° 36' 22'' de longitud Oeste (sistema de posicionamiento global, GPS).

Características del Lugar

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Técnica de Ambato ubicada en el sector de Querochaca, provincia de Tungurahua. Los laboratorios utilizados cuentan con condiciones de un ambiente controlado, conservándose a una temperatura promedio de 20°C y una humedad del 48%.

2.1 MATERIALES

	Cantidad
Material Vegetal	
• Aceite esencial de Tomillo (<i>T. vulgaris</i>)	1
• Aceite esencial de Canela (<i>C. verum</i>)	1
• Aceite esencial de Romero (<i>R. officinalis</i>)	1
• Aceite esencial de Laurel (<i>L. nobilis</i>)	1
Material biológico	
• <i>P. multocida</i> ATCC® 12945 ^{TM*}	1
• <i>B. bronchiseptica</i> ATCC® 4617 ^{TM*}	1
Reactivos de Laboratorio	
Cantidad	
• Infusión Cerebro - Corazón	1
• Agar Sal Manitol	1
• Agar MacConkey	1
• Agar Müller Hinton	1
• Tween 80	1
• Escala de McFarland tubo numero 5	1
• Agua destilada	1
• Glicerina	1
• Agua peptonada	1
Equipos de Laboratorio	
• Autoclave M11 Ultra Clave (MIDMARK)	1
• Balanza analítica Cap. 150 g (1g)	1
• Incubador Bacteriológico (redLINE)	1
• Mechero Bunsen	1
• Nevera (4° C) (Electrolux)	1
• Cabina de Flujo Laminar Bioseguridad 2 (Thermo Scientific)	1
Instrumentos de Laboratorio	
• Micropipeta de 0 – 10 uL (BOECO Germany)	1
• Micropipeta de 20 – 200 uL (BOECO Germany)	1

• Micropipeta de 100 – 1000 μ L (BOECO Germany)	1
• Puntas con filtro 10 – 100 μ L (AXYGEN)	1000
• Puntas con filtro 20 – 200 μ L (AXYGEN)	1000
• Puntas con filtro 100 – 1000 μ L (AXYGEN)	1000
• Microplacas de 96 pozos (COSTAR)	100
• Agitador magnético	1
• Pipetas de 10 ml y 25 ml	1
• Matraz Erlenmeyer	1
• Tubos eppendorf	100
• Vasos de precipitación	1
• Soporte universal	1
• Pinzas	1
• Tubos de ensayo	1
• Espátula	1
• Asa de siembra	1
• Vortex	1
• Gradilla	1
• Cajas Petri	150

Insumos

• Mandil	1
• Cofia	caja x 100 unidades
• Guantes	caja x 100 unidades
• Cepillo de lavar equipos de vidrio	1
• Gasas	1 paquete
• Algodón	1 bolsa x 500 g
• Papel aluminio	1
• Papel de empaque	10 pliegos
• Fósforos	10 cajas
• Aplicadores de algodón estériles	10 bolsas
• Lápiz graso	1
• Marcadores	1

Materiales de Escritorio

- Computadora 1
- Cámara Fotográfica 1
- Hojas de papel Bond A4 1 paquete
- Impresora 1
- Esferos 3

2.2.2 Factores de Estudio

- Se emplearon las concentraciones de diferentes tipos de aceites esenciales como son el Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*).
- Cepas bacterianas certificadas: *P. multocida* ATCC® 12945 ^{TM*} y *B. bronchiseptica* ATCC® 4617 ^{TM*}.

2.2.3 Tratamientos

En la presente investigación, existen 2 tratamientos por cada una de las concentraciones de cada aceite esencial de Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*) sobre cepas de *P. multocida* ATCC® 12945 ^{TM*} y *B. bronchiseptica* ATCC® 4617 ^{TM*} con 3 repeticiones por cada concentración a ser utilizada.

Tabla1 Descripción de los aceites esenciales a ser utilizados con cada una de las cepas bacterianas

Descripción	Bacterias	Tratamientos
Aceites Esenciales	Cepas Bacterias	
Tomillo (<i>T. vulgaris</i>)	<i>P. multocida</i> <i>B. bronchiseptica</i>	2
Canela (<i>C. verum</i>)	<i>P. multocida</i> <i>B. bronchiseptica</i>	2
Romero (<i>R. officinalis</i>)	<i>P. multocida</i> <i>B. bronchiseptica</i>	2
Laurel (<i>L. nobilis</i>)	<i>P. multocida</i> <i>B. bronchiseptica</i>	2
Total		8

2.2.4 Diseño Experimental

La investigación se llevará a cabo en dos fases: En la primera se determinará la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) mediante el conteo de crecimiento de colonias bacterianas presentes en placa.

La segunda fase se compone de un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial 4 x 2 y un testigo (Tween 80) con una concentración del 5% (Cho et al. 2008) para determinar la eficacia antimicrobiana de los Aceites Esenciales como: Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*) sobre cepas de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*.

2.2.5 Hipotesis

Los aceites esenciales de plantas como el Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*) y Laurel (*L. nobilis*) poseen actividad antimicrobiana sobre cepas de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*.

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

Aislamiento y criopreservación de las muestras bacterianas *P. multocida* y *B. bronchiseptica*.

Las cepas certificadas *P. multocida* ATCC® 12945 ^{TM*} y *B. bronchiseptica* ATCC® 4617 ^{TM*} se las adquirió por medio del laboratorio MEDIBAC. Para su aislamiento y posterior criopreservación se realizó la técnica de las dos cepas bacterianas por separadas (Millezi et al. 2012). Primero tomamos la cepa bacteriana de *P. multocida* y abrimos el vial de acuerdo con las instrucciones adjuntas que tenemos en el paquete, tomamos el vial por la parte superior y observamos que en su interior está un hisopo en donde se encuentra un pellet con fluido de hidratación, transferimos asépticamente esta alícuota presionando con los dedos para que así el contenido se libere y llegue a la parte inferior del hisopo y posteriormente este se active, mezclamos bien y utilizamos esta suspensión para inocular respectivamente en Infusión Cerebro – Corazón a través de la técnica de estriación por el método escocés. Como ultimo procedimiento, se incubaron las cepas a 37°C por 24 horas colocando el agar de una forma invertida, con su respectiva rotulación.

Para el procedimiento de aislamiento y criopreservación de la cepa bacteriana *B. bronchiseptica* ATCC® 4617 ^{TM*} realizamos el mismo procedimiento que se utilizó en la cepa bacteriana de *P. multocida* ATCC® 12945 ^{TM*} mencionada anteriormente. Para su inoculación, se utilizó agar nutritivo con una técnica de estriación por el método escocés y de igual manera incubamos a 37 °C por 24 horas colocando el agar de forma invertida con su respectiva rotulación.

Las colonias presentes en el Agar Infusión Cerebro – Corazón para *P. multocida* y Agar nutritivo para *B. bronchiseptica* respectivamente son tomadas con un asa de siembra y llevadas a un tubo de ensayo que debe estar con 5 ml de Agua peptonada previamente preparado. La cantidad de tubos de agua peptonada son preparados de

acuerdo a la cantidad que se requiera criopreservar la bacteria. Una vez realizado este procedimiento, se incubó a 37°C durante 24 horas con un tubo de agua peptonada utilizado como control negativo sin inóculo. Como último paso los tubos con agua peptonada inoculados la colonia deben presentar turbidez y para su posterior criopreservación colocamos 700 µL del inóculo y 300 µL de glicerina en tubos eppendorf estériles, llevamos al vortex hasta que quede homogenizada la solución, rotulamos todos los tubos y posterior ser llevados a congelación (-20 °C). (Yumi et al. 2016)

Activación de la bacteria

1. Se esterilizó tubos de ensayo en los cuales se colocó las soluciones a ser utilizadas.
2. Se añadió la cantidad de 5 ml de agua peptonada y 1 ml de la bacteria criopreservada con un tubo de agua peptonada sin inocular como control.
3. Se dejó en la incubadora a 37 °C por un tiempo apropiado hasta que se presente turbidez estandarizada al 0,5 de la escala de McFarland, establecido de $1,5 \times 10^8$ de unidades formadoras de colonias. En este caso para la bacteria *P. multocida* fue de 2 horas y para la bacteria *B. bronchiseptica* fue de 1 hora.

Preparación de Diluciones

Preparación de diluciones de los aceites esenciales

1. Las diluciones se las hicieron en tubos eppendorf previamente esterilizados. Se realizó los cálculos del aceite esencial a ser utilizado, la cantidad de agua peptonada como solución madre y el Tween 80.
2. Se mezcló estas tres soluciones utilizando un vortex a una velocidad de 30 rpm por 5 minutos para una buena homogenización.

Preparación de la microplaca de 96 pocillos

1. Una vez que transcurrió el tiempo adecuado se observó que había turbidez en las soluciones a ser utilizadas, se procedió a llevar en conjunto con la dilución del aceite esencial a dispensar en la microplaca, a una concentración bacteriana de turbidez equivalente a la escala 0.5 de McFarland.

2. Se dispensaron las diluciones que estaban preparadas, se las llevó a la Cámara de Flujo Laminar y con la ayuda de una micropipeta y con puntas previamente estériles las colocó en la microplaca de 96 pocillos.
3. Se dispuso en cada micropocillo la cantidad de 100 μ L de la dilución del aceite esencial y 100 μ L de la bacteria activada. Teniendo en cuenta que no se debe colocar en las columnas laterales para evitar su evaporación como también en la última fila para su respectivo control.
4. Una vez que se terminó este procedimiento y se colocó la película adhesiva de poliéster transparente sobre la microplaca, se rotuló y se la llevó a la incubadora en la cual permaneció una temperatura de 37 °C por 24 horas (Santurio et al. 2014).

Medios de Aislamiento

Agar Mueller – Hinton

1. Se suspendió la cantidad de 38 g del agar en 1 litro de agua destilada
2. Se colocó un agitador magnético para ayudar que el agar se disuelva con una mayor rapidez en el agua destilada.
3. Se lo llevó a la autoclave para su esterilización a 121°C durante 15 minutos; y se enfrió a temperatura ambiente por 45 minutos.
4. En la cabina de flujo laminar, se procedió a dispensar el agar una vez enfriado. Las cajas Petri se debieron encontrar en este lugar y previamente autoclavadas.
5. Se dispensaron 35 ml por cada caja Petri y se los dejó secar por un lapso de tiempo de 10 minutos antes de taparlas colocándolas con la tapa hacia abajo (Panreac Química 2003).

Siembra del Inóculo en Agar Mueller – Hinton

1. El área de trabajo se limpió con alcohol antiséptico y encendimos el mechero Bunsen para tener el área previamente esterilizada.
2. Se rotuló las cajas Petri en 4 cuadrantes y se escribió la concentración de cada aceite esencial para su posterior siembra.
3. Se sacó la microplaca de la incubadora y con un asa de siembra se empapó en cada pocillo y se realizó la siembra por el método de estriación.
4. Se llevó las cajas Petri a la incubadora a 37 °C por 24 horas.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

1. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria de una forma cualitativa en la cual se llevó a cabo con concentraciones desde el 0% y con posteriores diluciones hasta que se determine la MIC (intervalos desde 0% hasta 21%).
2. Se observó la presencia o ausencia de turbidez después del procedimiento de incubación. Adicionalmente, se sembró de los pocillos por medio de estrías en cajas de agar Mueller Hinton divididas en cuadrantes. Se valoró el cuadrante en el cual se observa la ausencia de colonias bacterianas (Requena et al. 2009).

Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

1. Se determinó como la Concentración Mínima Bactericida (CMB) a la cantidad de una solución para eliminar el 99.9% de las colonias bacterianas. Para lo cual de igual manera se utilizó el método cualitativo.
2. Se observó en cada uno de los cuadrantes sembrado en Agar Mueller – Hinton la ausencia total de colonias bacterianas (Caballero and Villacorta 2016).

Colocación de discos y Medición de los halos de Inhibición

1. Impregnamos los discos en blanco (Oxoid) con las diferentes concentraciones de los aceites esenciales
2. Se colocó los discos impregnados en la superficie del Agar Mueller – Hinton inoculados con biomasa a concentración 0.5 McFarland, utilizando pinzas anatómicas estériles.
3. Se aplicó una ligera presión de los discos sobre la superficie del agar, como regla general la distancia que debe tener es de 30 mm entre discos y una distancia de 15 mm con los bordes de la placa con el fin de no tapar los diámetros de los halos de inhibición (Doern et al. 1995).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

Tabla 2 Microplaca para la evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria (Rangos ampliados) de Laurel (*L. nobilis*), Canela (*C. verum*), Tomillo (*T. vulgaris*) y Romero (*R. officinalis*) sobre la cepa bacteriana *P. multocida* y *B. bronchiseptica*

Bacteria	Aceite esencial	Repeticion	Concentracion Minima Inhibitoria												
			0%	0.1%	0.3%	0.5%	1%	3%	5%	7%	9%	12%	15%	18%	21%
<i>P. multocida</i>	Laurel	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Canela	1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
		2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
		3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	Tomillo	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Romero	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
		2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
		3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>B. bronchiseptica</i>	Laurel	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
		2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
		3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	
	Canela	1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
		2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
		3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
	Tomillo	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
		2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
		3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	
	Romero	1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
		2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
		3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	

Los resultados presentes en la tabla indican la actividad antimicrobiana de los Aceites esenciales sobre cada una de las cepas bacterianas, porcentajes de la Concentración Mínima Inhibitoria (+) presencia y la Concentración Mínima Bactericida (-) ausencia.

Fuente: (Autor, 2019)

La Tabla 2 resume los resultados observados en las macrodiluciones realizadas en un rango entre 0% al 21% para cada aceite esencial. Los resultados para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria en un rango elevado fueron los siguientes: Laurel (*L. nobilis*) $\geq 0.5\%$, Canela (*C. verum*) $\geq 3\%$, Tomillo (*T. vulgaris*) $\geq 1\%$ y Romero (*R. officinalis*) $\geq 12\%$ sobre la cepa bacteriana *P. multocida* ATCC® 12945 ^{TM*} respectivamente. En cambio, para *B. bronchiseptica* ATCC® 4617 ^{TM*} se obtuvieron los siguientes resultados: Laurel (*L. nobilis*) $\geq 1\%$, Canela (*C. verum*) $\geq 5\%$, Tomillo (*T. vulgaris*) $\geq 9\%$ y Romero (*R. officinalis*) $\geq 3\%$. Los mismos resultados son similares con los obtenidos por Bagamboula et al. (2004) que al probar el potencial efecto que tiene el aceite esencial de tomillo y sus compuestos como es el timol y el carvacrol al 0.5 % y al 1% observó resultados efectivos contra la descontaminación de alimentos.

A continuación, con la finalidad de estimar de manera exacta las CMI y las CMB, se repitieron los ensayos en los rangos de las macrodiluciones observadas en la Tabla 2, en donde se observó la inhibición preliminar. Los ensayos se ejecutaron en microplacas por triplicado.

Tabla 3 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Laurel (*L. nobilis*)

Bacteria	Aceite esencial Laurel (<i>L. nobilis</i>) + Agua peptonada + Tween 80									
	1%	1.1%	1.3%	1.5%	1.8%	2.1%	2.4%	2.7%	3%	
<i>B. bronchiseptica</i>	CMI	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		+	+	+	+/-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+/-	-	-	-	-	-
	CMB	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		+	+	+	+	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	-	-	-	-

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CMB: Concentración mínima bactericida; (+) crecimiento bacteriano, para CMI presencia de turbidez, para CMB presencia de colonias en agar MH; (-) ausencia de crecimiento; para CMI ausencia de turbidez, para CMB ausencia de colonias en agar MH.

Fuente: (Autor, 2019)

Tabla 3 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Romero (*R. officinalis*)

Bacteria	Concentración Mínima Inhibitoria									
	Aceite esencial Romero (<i>R. officinalis</i>) + Agua peptonada + Tween 80									
	3%	3.1%	3.3%	3.5%	3.8%	4.1%	4.3%	4.7%	5%	
<i>B. bronchiseptica</i>	CMI	+	+	+	-	-	-	-	-	-
		+	+	+	-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	-	-	-	-	-
	CMB	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	-	-	-	-	-

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CMB: Concentración mínima bactericida; (+) crecimiento bacteriano, para CMI presencia de turbidez, para CMB presencia de colonias en agar MH; (-) ausencia de crecimiento; para CMI ausencia de turbidez, para CMB ausencia de colonias en agar MH.

Fuente: (Autor, 2019)

Tabla 4 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Canela (*C. verum*)

Bacteria	Aceite esencial Canela (<i>C. verum</i>) + Agua peptonada + Tween 80									
	5%	5.1%	5.3%	5.5%	5.8%	6.1%	6.3%	6.7%	7%	
<i>B. bronchiseptica</i>	CMI	+	+	+	+	+	+	+	-	-
		+	+	+	+	+	+	+	-	-
		+	+	+	+	+	+	+	-	-
	CMB	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	+	+	+	-	-

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CMB: Concentración mínima bactericida; (+) crecimiento bacteriano, para CMI presencia de turbidez, para CMB presencia de colonias en agar MH; (-) ausencia de crecimiento; para CMI ausencia de turbidez, para CMB ausencia de colonias en agar MH.

Fuente: (Autor, 2019)

Tabla 5 Actividad antimicrobiana del Aceite esencial de Tomillo (*T. vulgaris*)

		Aceite esencial Tomillo (<i>T. vulgaris</i>) + Agua peptonada + Tween 80									
		9%	9.1%	9.3%	9.5%	9.8%	10.1%	10.3%	10.5%	10.8%	11.0%
<i>B. bronchiseptica</i>	CMI	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	CMB	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+/-	-	-	-	-

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CMB: Concentración mínima bactericida; (+) crecimiento bacteriano, para CMI presencia de turbidez, para CMB presencia de colonias en agar MH; (-) ausencia de crecimiento; para CMI ausencia de turbidez, para CMB ausencia de colonias en agar MH.

Fuente: (Autor, 2019)

Tabla 6 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Laurel (*L. nobilis*) sobre la cepa bacteriana de *P. multocida*

		Aceite esencial Laurel (<i>L. nobilis</i>) + Agua peptonada + Tween 80					
		0.5%	0.6%	0.7%	0.8%	0.9%	1%
<i>P. multocida</i>	CMI	+	+	+	+/-	-	-
		+	+	+	+	-	-
		+	+	+	+	-	-
	CMB	+	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	+/-	-
		+	+	+	+	+/-	-

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CMB: Concentración mínima bactericida; (+) crecimiento bacteriano, para CMI presencia de turbidez, para CMB presencia de colonias en agar MH; (-) ausencia de crecimiento; para CMI ausencia de turbidez, para CMB ausencia de colonias en agar MH.

Fuente: (Autor, 2019)

Tabla 7 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Canela (*C. verum*) sobre la cepa bacteriana *P. multocida*.

Cepa Bacteriana	Aceite esencial Canela (<i>C. verum</i>) + Agua peptonada + Tween 80									
		3%	3.1%	3.3%	3.5%	3.8%	4.1%	4.3%	4.7%	5%
<i>P. multocida</i>	CMI	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	-	-	-	-	-
		+	+	+	+/-	-	-	-	-	-
	CMB	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		+	+	+	+	+	+/-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+/-	-	-	-

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CMB: Concentración mínima bactericida; (+) crecimiento bacteriano, para CMI presencia de turbidez, para CMB presencia de colonias en agar MH; (-) ausencia de crecimiento; para CMI ausencia de turbidez, para CMB ausencia de colonias en agar MH.

Fuente: (Autor, 2019)

Tabla 8 Actividad Antimicrobiana del Aceite esencial de Romero (*R. officinalis*) sobre la cepa bacteriana *P. multocida*.

Cepa Bacteriana	Aceite esencial Romero (<i>R. officinalis</i>) + Agua peptonada + Tween 80												
		9%	9.1%	9.3%	9.5%	9.8%	10.1%	10.3%	10.5%	10.8%	11.1%	11.4%	12%
<i>P. multocida</i>	CMI	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	+/-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	CMB	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-	-	-

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CMB: Concentración mínima bactericida; (+) crecimiento bacteriano, para CMI presencia de turbidez, para CMB presencia de colonias en agar MH; (-) ausencia de crecimiento; para CMI ausencia de turbidez, para CMB ausencia de colonias en agar MH.

Fuente: (Autor, 2019)

Tabla 9 Actividad antimicrobiana del aceite esencial de Tomillo (*T. vulgaris*) sobre la cepa bacteriana *P. multocida*.

Cepa Bacteriana	Aceite esencial Tomillo (<i>T. vulgaris</i>) + Agua peptonada + Tween 80									
	1%	1.1%	1.3%	1.5%	1.8%	2.1%	2.4%	2.7%	3%	
<i>P. multocida</i>		+	+	+	+	+	+	-	-	-
	CMI	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	+/-	-	-
	CMB	+	+	+	+	+	+	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	-	-	-

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CMB: Concentración mínima bactericida; (+) crecimiento bacteriano, para CMI presencia de turbidez, para CMB presencia de colonias en agar MH; (-) ausencia de crecimiento; para CMI ausencia de turbidez, para CMB ausencia de colonias en agar MH.

Fuente: (Autor, 2019)

La Tabla 11 resume las concentraciones mínimas bactericidas e inhibitorias obtenidas en este ensayo.

Tabla 11. Concentración Mínima inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los aceites esenciales de Laurel, Romero, Canela y Tomillo frente a *B. bronchiseptica* y *P. multocida*.

Bacteria	Aceite esencial	CMI (%)	CMB (%)
<i>B. bronchiseptica</i>	Laurel	≥1.8	≥2.1
	Romero	≥3.5	≥3.8
	Canela	≥6.7	≥7
	Tomillo	≥10.1	≥10.3
<i>P. multocida</i>	Laurel	≥0.9	≥1
	Romero	≥10.5	≥11.1
	Canela	≥3.8	≥4.3
	Tomillo	≥2.4	≥2.7

Por medio del análisis de varianza de un solo factor, combinado con la prueba de Tukey HSD/Kramer, se determina que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las CIMs y CMBs de los 4 aceites esenciales frente a las 2 bacterias estudiadas (Anexo 2); mostrando una mayor actividad a menor concentración del aceite esencial de Laurel, del cual a una concentración inferior al 2% inhibe el crecimiento de *B. bronchiseptica*, y a una concentración inferior al 1% inhibe el crecimiento de *P. multocida*. El aceite esencial de Laurel posee una considerable actividad antimicrobiana frente a otros organismos de interés, como por ejemplo *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* (Thormar, 2010). En contraste, el aceite esencial de Tomillo fue el que presentó la menor actividad frente a *B. bronchiseptica*, y el aceite esencial de romero frente a *P. multocida*. El aceite esencial de tomillo presenta unas CIM inferiores al 0.5% para *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. jejuni* y *P. putida* (Sakkas and Papadopoulou 2016, Thormar, 2010). Un efecto similar se observa en el aceite esencial de romero, que presenta CMI entre el 0.1% al 1% para organismos como *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* (Prabuseenivasan et al. 2006, Thormar, 2010).

Eficacia antimicrobiana

Para la evaluación de la eficacia antimicrobiana, se contrastó la respuesta de los aceites esenciales (CMI) frente al antibiótico gentamicina (160 mg/mL). La tabla 10 muestra los porcentajes de inhibición de cada uno de los aceites frente a las bacterias analizadas.

Tabla 10 Halos de sensibilidad antimicrobiana (mm) de los aceites esenciales Laurel (*L. nobilis*), Canela (*C. verum*), Tomillo (*T. vulgaris*) y Romero (*R. officinalis*) sobre la cepa bacteriana *P. multocida* ATCC® 12945 TM*

Cepa bacteriana	Aceite esencial	Concentracion	Repetición	Inhibicion zone (mm)	Inhibicion (%)	Promedio inhibición	Desv.Est. Inh (%)	Gentamicina 160mg/ml (mm)
<i>P. multocida</i>	Laurel	0.80%	1	14	42.67	40.89	20.89	26
		0.80%	2	15	48.00			
		0.80%	3	12	32.00			
	Canela	3.50%	1	13	37.33	37.33	18.60	24
		3.50%	2	15	48.00			
		3.50%	3	11	26.67			
	Tomillo	2.10%	1	13	37.33	39.11	19.08	24
		2.10%	2	13	37.33			
		2.10%	3	14	42.67			
	Romero	10.30%	1	14	42.67	33.78	19.25	25
		10.30%	2	12	32.00			
		10.30%	3	11	26.67			

Los resultados reflejados en la siguiente tabla, demuestran la sensibilidad que tiene la cepa bacteriana *P. multocida* con cada uno de los aceites esenciales, observando una mayor y menor sensibilidad.

Fuente: (Autor, 2019)

Tomamos en cuenta que los halos de inhibición de Laurel (*L. nobilis*) 15 mm, Canela (*C. verum*) 15 mm, Tomillo (*T. vulgaris*) 14 mm y Romero (*R. officinalis*) 14 mm sobre la cepa bacteriana *P. multocida*, respectivamente a diferentes concentraciones fueron efectivas contra la mencionada bacteria, siendo la concentración del aceite esencial de Laurel (*L. nobilis*) y Tomillo (*T. vulgaris*) de 0.8% y 3.5% respectivamente las más efectivas en las pruebas realizadas, con un porcentaje de inhibición del 40.89% y del 39% respectivamente.

Tabla 11 Para la cepa bacteriana *B. bronchiseptica* ATCC® 4617 TM* los halos de inhibición (mm) de los aceites esenciales Laurel (*L. nobilis*), Canela (*C. verum*), Tomillo (*T. vulgaris*) y Romero (*R. officinalis*) fueron los siguientes:

Cepa bacteriana	Aceite esencial	Concentracion	Repetición	Inhibicion zone (mm)	Inhibicion (%)	Promedio inhibición	Desv.Est. Inh (%)	Gentamicina 160mg/ml (mm)
<i>B. bronchiseptica</i>	Laurel	1.80%	1	11	12.82	11.11	6.64	45
		1.80%	2	10	10.26			
		1.80%	3	10	10.26			
	Canela	6.30%	1	8	5.13	5.98	3.69	45
		6.30%	2	9	7.69			
		6.30%	3	8	5.13			
	Tomillo	9.80%	1	10	10.26	15.38	5.54	45
		9.80%	2	11	12.82			
		9.80%	3	15	23.08			
	Romero	3.30%	1	12	17.49	22.35	8.53	40.3
		3.30%	2	14	23.32			
		3.30%	3	15	26.24			

A continuación, se observan los resultados de los diámetros de los halos de inhibición. Determinando que existe una mayor sensibilidad de la cepa bacteriana *B. bronchiseptica* ante el aceite esencial de Tomillo (*T. vulgaris*) y Romero (*R. officinalis*)

Fuente:(Autor, 2019)

Para la cepa bacteriana *B. bronchiseptica* se mostró la siguiente actividad antimicrobiana de los halos de inhibición: Laurel (*L. nobilis*) 11 mm, Canela (*C. verum*) 9 mm, Tomillo (*T. vulgaris*) 15 mm y Romero (*R. officinalis*) 15 mm.

De tal modo que el aceite esencial de Tomillo (*T. vulgaris*) y Romero (*R. officinalis*) con unas concentraciones del 9.8% y 3.3% respectivamente presentaron una mayor sensibilidad ante la cepa bacteriana de *B. bronchiseptica*. A concentraciones elevadas encontramos intoxicaciones severas por vía oral como también daños a nivel de tejido por vía subcutánea (Arteche et al. 1998).

De tal manera se obtuvieron los resultados del aceite esencial de tomillo como principal agente antimicrobiano como también un antioxidante natural (Kassem et al. 2011).

Todas las cepas evaluadas presentan actividad antimicrobiana. Sin embargo, únicamente el aceite esencial de laurel presenta una notable actividad a una concentración inferior al 2% para ambas bacterias. De acuerdo a diferentes autores, se considera como inefectivo aquellos aceites esenciales que presentan actividad biológica a una concentración superior al 4% (Bakkali et al. 2008, Hammer et al. 1999, Thormar 2010). Motivo por el cual, se recomienda continuar con investigaciones complementarias para el potencial uso del aceite esencial de laurel como antimicrobiana frente a bacterias como *P. multocida* y *B. bronchiseptica*.

Los resultados obtenidos del aceite esencial de tomillo a concentraciones del 5% y 10% sobre la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* una eficacia antimicrobiana (Montero et al. 2018). Resultados obtenidos con los del aceite esencial de tomillo a concentraciones del 10.1% y 10.3% sobre la cepa bacteriana de *Bordetella bronchiseptica*, los mismos resultados que tiene similitud en concentraciones y efectivos con las bacterias antes mencionadas.

El efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela posee un amplio espectro tanto contra bacterias Gram negativas como también contra bacterias gram positivas. El efecto del aceite esencial de la canela ha concentraciones del 50%, 70 y 90% poseen actividad bactericida contra las bacterias del género *Salmonella typhimurium* (Montero et al. 2017) y a concentraciones del 7% contra *B. bronchiseptica* y de 4.3% contra la bacteria *P. multocida*.

Resultados obtenidos del aceite esencial de romero sobre la cepa bacteriana de *Escherichia coli* fueron del 60% y 80% en la cual a una mayor concentración presento un efecto Bactericida sobre dicha bacteria mencionada (Montero et al. 2017). Dicho aceite esencial a concentraciones inferiores como se menciona de 3.8% sobre la cepa bacteriana *B. bronchiseptica* y de 11.1% sobre *P. multocida* de igual manera poseen efecto bactericida.

3.2 Verificación de la Hipótesis

Los aceites esenciales de Laurel (*L. nobilis*), Canela (*C. verum*), Tomillo (*T. vulgaris*) y Romero (*R. officinalis*) poseen actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones sobre las cepas bacterianas de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Evaluamos la eficacia antimicrobiana de los aceites esenciales de Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*) y Laurel (*L. nobilis*) sobre cepas bacterianas certificadas de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*, los cuales los resultados obtenidos fueron a diferentes concentraciones para cada una de las cepas bacterianas; los cuatro tipos de aceites esenciales poseen actividad antimicrobiana determinada por medio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y una Concentración Mínima Bactericida (CMB).
- Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los aceites esenciales Tomillo (*T. vulgaris*) 2.4%, Canela (*C. verum*) 3.8%, Romero (*R. officinalis*) 10.5% y Laurel (*L. nobilis*) 0.8% sobre la cepa bacteriana *P. multocida* y de Tomillo (*T. vulgaris*) 10.1%, Canela (*C. verum*) 6.7%, Romero (*R. officinalis*) 3.5% y Laurel (*L. nobilis*) 1.8% para la cepa bacteriana *B. bronchiseptica* con la cual concluimos que los 4 tipos de aceites esenciales tiene la eficacia de inhibir el crecimiento bacteriano probado en este estudio.
- Para la Concentración Mínima Bactericida (CMB) los aceites esenciales de Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*) y Laurel (*L. nobilis*) presentaron la concentración de 2.7%, 4.3%, 11.1% y 1% respectivamente para la cepa bacteriana *P. multocida* y de 10.3%, 7%, 3.8% y 2.1% para la cepa bacteriana *B. bronchiseptica*. Estudio con el cual determinamos que el aceite esencial de Romero necesita una mayor concentración para inhibir el crecimiento de la cepa bacteriana *P. multocida* y el aceite esencial de Tomillo para inhibir el crecimiento de la cepa bacteriana *B. bronchiseptica* respectivamente.
- Determinamos la eficacia antimicrobiana de los aceites esenciales por medio del uso de la microplaca de 96 pocillos y siembra en agar Mueller – Hinton para una mayor facilidad de lectura e interpretación de resultados obtenidos del mismo estudio realizado.

MATERIALES DE REFERENCIA

BIBLIOGRAFIA

- Arteche, A; Vanaclocha, B; Güenechea, J. 1998. Fitoterapia. Plantas medicinales 3.
- Bagamboula, CF; Uyttendaele, M; Debevere, J. 2004. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. Food Microbiology . DOI: [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7).
- Bakkali, F; Averbeck, S; Averbeck, D; Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils - A review. s.l., s.e. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>.
- Basurto, F; Hernández, R; Verdugo, A; Rosales, M; Montaraz, J. 2005. Clonación, secuenciación y expresión del gen prn de pertactina de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino. Veterinaria México 36:2–9.
- Caballero, C; Villacorta, L. 2016. Efecto del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y su combinación sobre la acción antifúngica en *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz (*Zea mays L.*), variedad morado. :123–132.
- Cho, Y; Kim, S; Bae, E; Mok, C. 2008. Formulation of a cosurfactant-339 free O/W microemulsion using nonionic surfactant mixtures. Journal of Food Science 3:E115-121.
- Davies, R; Maccorquodale, R; Baillie, S; Caffrey, B. 2019. Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis. Veterinary Microbiology :3–6.
- Doern, G; Murray, P; Baron, E. 1995. Susceptibility tests of fastidious bacteria. American Society of Microbiology :5–11.
- Domínguez, X; Domínguez, S. 1990. Química Orgánica Experimental. .
- Dorman, H; Deans, S. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Appl. Microbiol .

- Hammer, KA; Carson, CF; Riley, T V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86(6):985–990. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x>.
- Hammer, KA; Carson, CF; Riley, T V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of applied microbiology* .
- Kadlec, K; Schwarz, S. 2018. Antimicrobial Resistance in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiology Spectrum* 6(4). DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0024-2017>.
- Kassem, G; Atta, O; Ali, F. 2011. Improving The Quality Of Beef Burger By Adding Thyme Essential Oil And Jojoba Oil. 60:3–8.
- Lopez, R; Hernández, M; Rabanal, R; Darias, V; Arias, A. 1992. Essential oils and antimicrobial activity of two varieties of *Cedronella canariensis* (L.). *Journal of Ethnopharmacology* 36:207–211.
- Michael, G; Bossé, J; Schwarz, S. 2018. Antimicrobial resistance in Pasteurellaceae of veterinary origin. *Microbiol Spectr.* 6.
- Millezi, A; Caixeta, D; Rossoni, D; Cardoso, M; Picolli, R. 2012. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *thymus vulgaris*, *cymbopogon citratus* and *laurus nobilis* against five important foodborne pathogens (online). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 1:167–172. Available at <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=395940112025>.
- Montero, M; Martinez, J; Avilés, D; Valle, E; Pazmiño, P. 2017. Effect antimicrobial of extract of *Rosmarinus officinalis* on strain of *Escherichia coli*. Efecto antimicrobiano del extracto crudo oleoso de *Rosmarinus Officinalis* sobre cepa de *Escherichia coli*. *Journal of The Selva Andina Biosphere* .
- Montero, M; Mira, J; Avilés, D; Pazmiño, P; Erazo, R. 2018. Antimicrobial Efficacy Of Thyme Essential Oil (*Thymus vulgaris*) On A *Staphylococcus aureus* Strain. *Rev Inv Vet Perú* .
- Montero, M; Revelo, J; Aviles, D; Valle, E; Guevara, D. 2017. Antimicrobial Effect Of Cinnamon Essential Oil (*Cinnamomum zeylanicum*) On *Salmonella* Strains

- (online). *Rev Inv Vet Perú* . Available at <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n4/a24v28n4.pdf>.
- Panreac Química, S. 2003. *Manual Básico de Microbiología* (online). Cultimed . Available at <https://ricarducatse.files.wordpress.com/2012/01/manual-de-medios-de-cultivos.pdf>.
- Peng, Y; Yuan, J; Liu, F. 2005. Determination of active components in Rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Biomed* :431–437.
- Prabuseenivasan, S; Jayakumar, M; Ignacimuthu, S. 2006. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine* . DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-39>.
- Reardon, S. 2014. WHO warns against “post-antibiotic” era. *Nature* . DOI: <https://doi.org/10.1038/nature.2014.15135>.
- Register, KB; Brockmeier, SL. 2019. *Pasteurellosis*. Hoboken, NJ, USA, John Wiley & Sons, Inc. p. 884–897 DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch57>.
- Requena, R; Vargas, M; Chiralt, A. 2009. Study of the potential synergistic antibacterial activity of essential oil components using the 1 thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay. :29.
- Ríos, JL; Recio, MC. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 100(1–2):80–84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>.
- Sakkas, H; Papadopoulou, C. 2016. Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. *J. Microbiol. Biotechnol* 26(0):429–438. DOI: <https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024>.
- Santurio, D; Kunz de Jesus, F; Zanette, R; Schlemmer, K; Fraton, A. 2014. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Thyme and of Thymol against *Escherichia coli* Strains (online). *Acta Scientiae Veterinariae* . Available at <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289029240052>.
- Santurio, D; Pantella Kunz de Jesus, F; Zanette, R; Schlemmer, K; Fraton, A. 2014. Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Thyme and of Thymol against

Escherichia coli Strains. Acta Scientiae Veterinariae :1–5.

Schelz, Z; Molnar, J; Hohmann, J. 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. Fitoterapia . DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.03.013>.

Soto, E; Moreno, J; Estarrón, M; García, J; Obledo, E. 2006. Chemical Composition And Fungicidal Activity Of The Essential Oil Of *Thymus vulgaris* Against *Alternaria citri*. 4:2–7.

Thormar, H. 2010. Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents. Thormar, H (ed.). s.l., John Wiley & Sons. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470976623>.

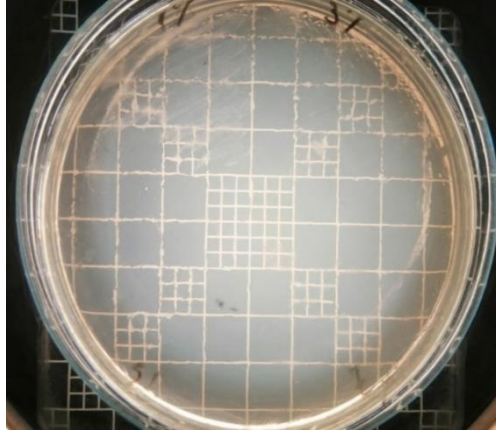
Ujvári, B; Mackai, L; Magyar, T. 2018. Characterisation Of a Multiresistant *Pasteurella multocida* Strain Isolated From Cattle. Acta Veterinaria Hungarica 12:1–8.

WHO. 2016. WHO | Antibiotic resistance.

Yumi, C; Rodrigues, S; De Souza, A; Hildebrand, J; Heinemann, M; Ferreira, J; Amaku, M. 2016. Cryopreservation of *Mycobacterium bovis* isolates. Semina: Ciências Agrárias 37.

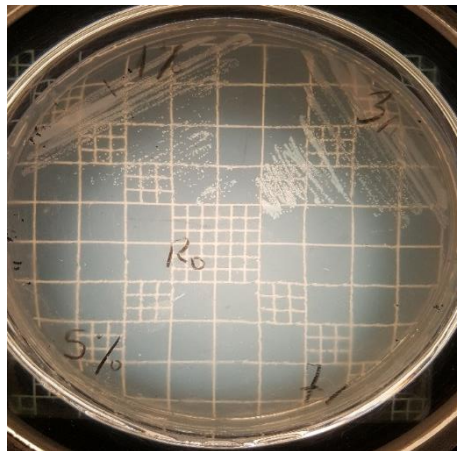
ANEXOS

Anexo 1 Siembra en placa de la Cepa bacteriana *B. bronchiseptica*



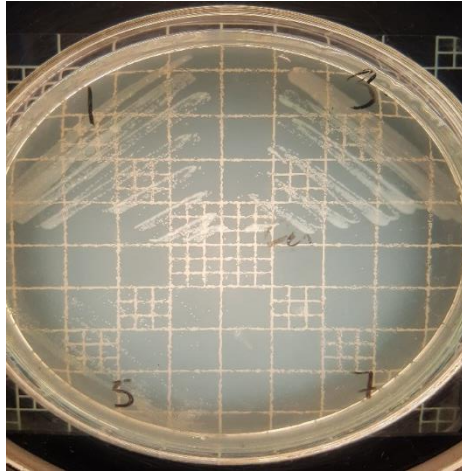
En esta figura muestra la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de Laurel (*L. nobilis*). Su concentración va de 1% para la CMI y 3% para la CMB respectivamente. (macrodiluciones)

Anexo 2 Siembra en placa de la Cepa bacteriana *B. bronchiseptica*.



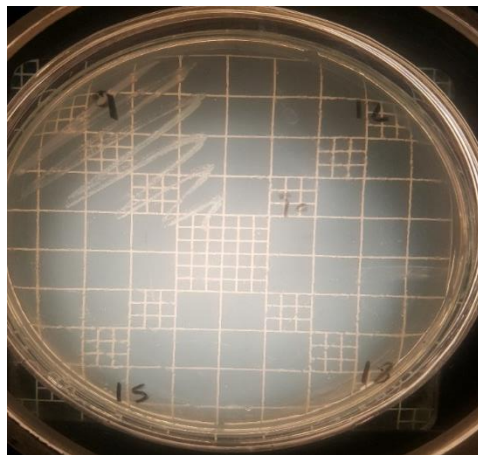
Determinación de las concentraciones del aceite esencial de Romero (*R. officinalis*) sembradas en placa. Sus concentraciones fueron de 3 % para la CMI y de 5% para la CMB sobre la cepa bacteriana *B. bronchiseptica*. (macrodiluciones)

Anexo 3 Siembra en placa de la Cepa bacteriana *B. bronchiseptica*.



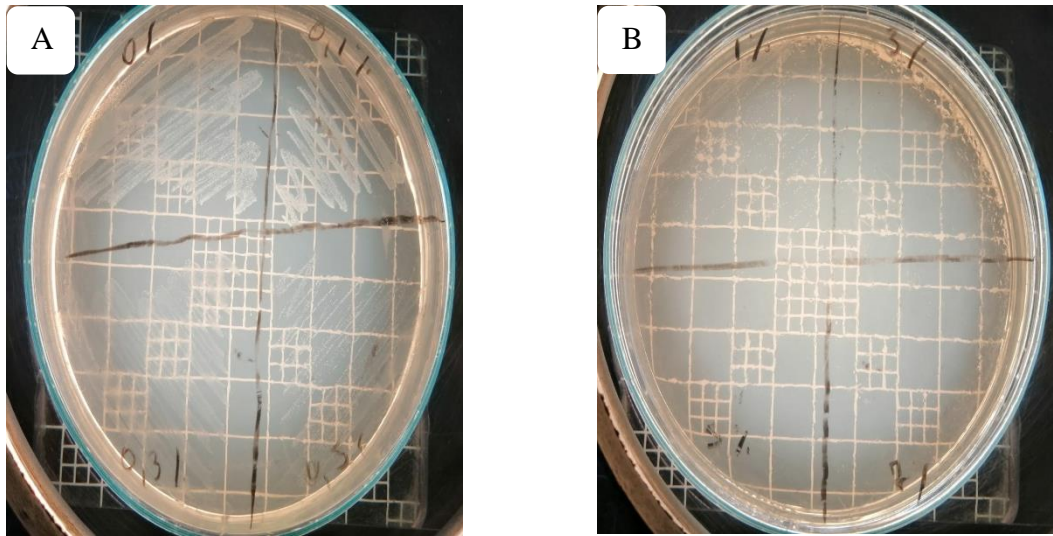
En esta figura se muestra la presencia de colonias bacterianas en la concentración del del aceite esencial de Canela (C. verum) al 3% pero una ausencia total a la concentración de 5% determinando así la CMB sobre B. bronchiseptica. (macrodiluciones)

Anexo 4 Siembra en placa de la Cepa bacteriana *B. bronchiseptica*.



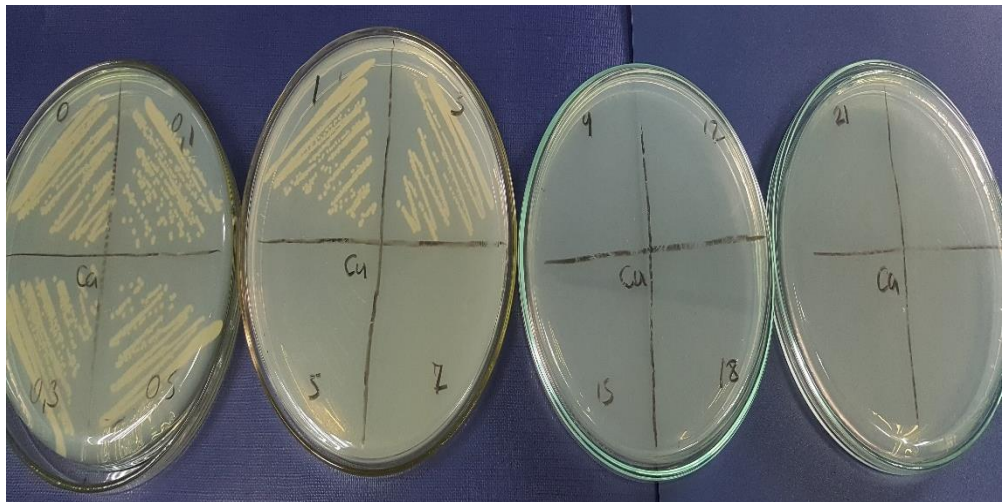
Esta figura indica la Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite esencial de Tomillo (T. vulgaris) que fue de 9% y una Concentración Mínima Bactericida de 12% (macrodiluciones)

Anexo 5 Siembra en placa de la Cepa bacteriana *P. multocida*.



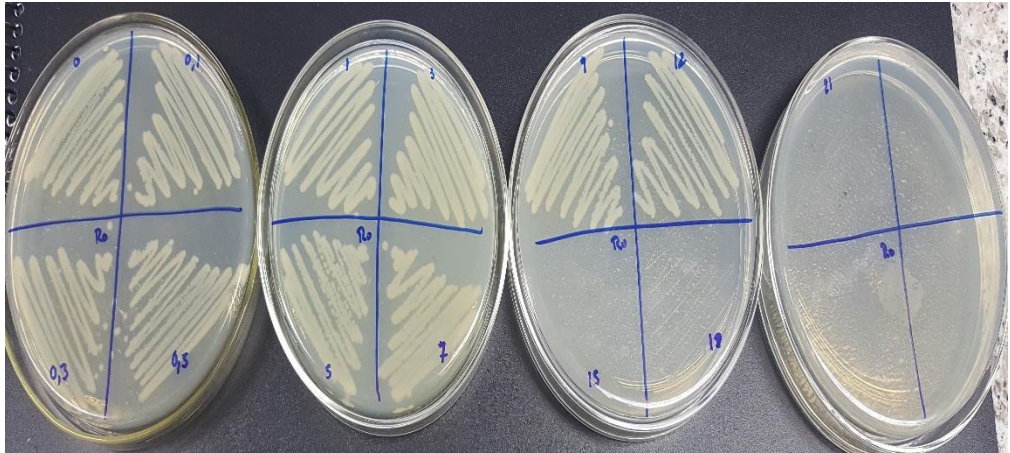
En la figura A se muestra la presencia de colonias bacterias en todas sus concentraciones. En la figura B existe ausencia de colonias bacterianas al 1% sobre la cepa bacteriana *P. multocida*. (macrodiluciones)

Anexo 6 Siembra en placa de la Cepa bacteriana *P. multocida*.



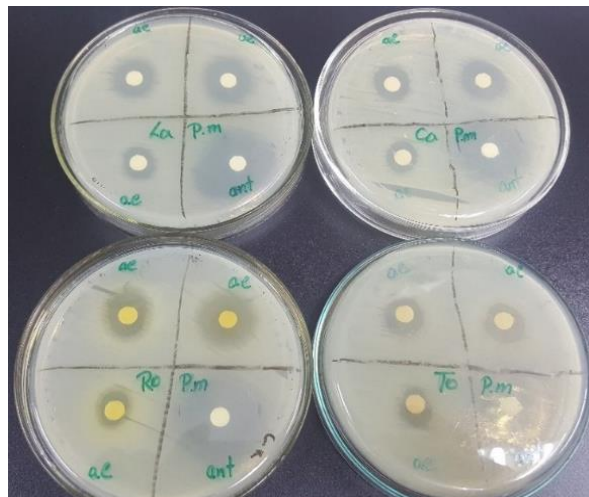
En esta figura se muestra la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial del Canela (*C. verum*) 3% y una Concentración Mínima Bactericida al 5% sobre la cepa bacteriana *P. multocida*. (macrodiluciones)

Anexo 7 Siembra en placa de la Cepa bacteriana *P. multocida*.



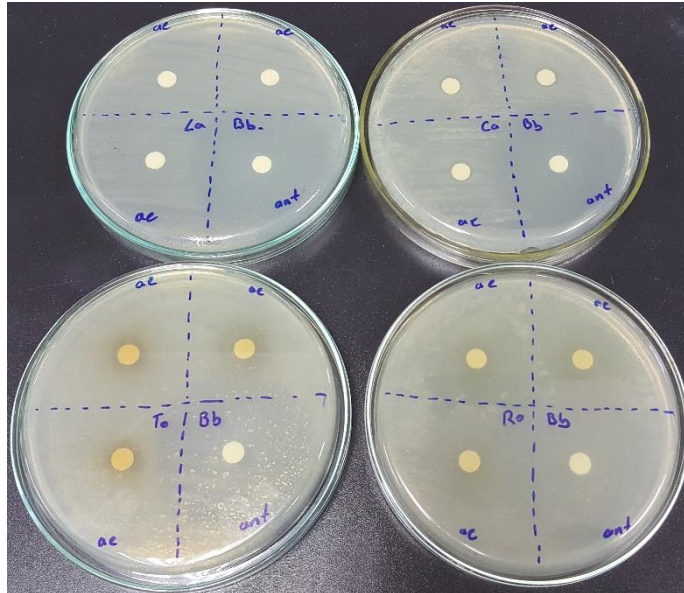
En esta figura indica la presencia bacteriana en la concentración del 12% para determinar así la CMI y una ausencia total de colonias bacterianas al 15% para así determinar la CMB del aceite esencial de Canela (*C. verum*) sobre la cepa bacteriana *P. multocida*. (macrodiluciones)

Anexo 8 Halos de Inhibición de los aceites esenciales Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*) sobre cepas bacteriana de *P. multocida*



En esta figura nos indica los halos de Inhibición de los 4 aceites esenciales más el control positivo Gentamicina 160 mg/ml. Siendo de los aceites esenciales de Canela (*C. verum*), Laurel (*L. nobilis*) 15 mm respectivamente para los dos la mayor sensibilidad ante la cepa bacteriana *P. multocida*. (macrodiluciones)

Anexo 9 Halos de Inhibición de los aceites esenciales Tomillo (*T. vulgaris*), Canela (*C. verum*), Romero (*R. officinalis*), Laurel (*L. nobilis*) sobre cepas bacteriana de *B. bronchiseptica*.



En esta figura muestra la sensibilidad antimicrobiana. Los aceites esenciales de Tomillo (*T. vulgaris*), Romero (*R. officinalis*), 15 mm respectivamente para cada aceite, nos demuestra una mayor sensibilidad sobre la cepa bacteriana *B. bronchiseptica*. (macrodiluciones)

Anexo 10 Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos de los aceites esenciales de Tomillo, Canela, Romero y Laurel sobre la cepa bacteriana de *B. bronchiseptica*.

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION	Alpha 0.05								
<i>Group</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Mean</i>	<i>Variance</i>	<i>SS</i>	<i>Std Err</i>	<i>Lower</i>	<i>Upper</i>	
Laurel	2	3.9	1.95	0.045	0.045	0.13919411	1.5635352	2.3364648	
Romero	2	7.3	3.65	0.045	0.045	0.13919411	3.2635352	4.0364648	
Canela	2	13.7	6.85	0.045	0.045	0.13919411	6.4635352	7.2364648	
Tomillo	2	20.4	10.2	0.02	0.02	0.13919411	9.8135352	10.5864648	

ANOVA									
<i>Sources</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>	<i>F crit</i>	<i>RMSSE</i>	<i>Omega Sq</i>	
Between Groups	79.66375	3	26.5545833	685.27957	7.066E-06	6.59138212	18.5105317	0.99611809	
Within Groups	0.155	4	0.03875						
Total	79.81875	7	11.4026786						

El resultado del Análisis de Varianza (ANOVA) indica que ($p < 0.05$) tiene un rango mayor al del *P value* en la cual se llega a la conclusión de que hay diferencias significativas entre los aceites esenciales sobre *B. bronchiseptica*.

Anexo 11 Prueba de TUKEY HSD/KRAMER de los aceites esenciales Laurel, Canela, Tomillo y Romero

TUKEY HSD/KRAMER				alpha	0.05					
<i>group</i>	<i>mean</i>	<i>n</i>	<i>ss</i>	<i>df</i>	<i>q-crit</i>					
Laurel	1.95	2	0.045							
Romero	3.65	2	0.045							
Canela	6.85	2	0.045							
Tomillo	10.2	2	0.02							
		8	0.155	4	5.757					

Q TEST									
<i>group 1</i>	<i>group 2</i>	<i>mean</i>	<i>std err</i>	<i>q-stat</i>	<i>lower</i>	<i>upper</i>	<i>p-value</i>	<i>mean-crit</i>	<i>Cohen d</i>
Laurel	Romero	1.7	0.13919411	12.2131605	0.89865951	2.50134049	0.00343917	0.80134049	8.63600864
Laurel	Canela	4.9	0.13919411	35.2026392	4.09865951	5.70134049	6.214E-05	0.80134049	24.8920249
Laurel	Tomillo	8.25	0.13919411	59.2697497	7.44865951	9.05134049	8.0437E-06	0.80134049	41.9100419
Romero	Canela	3.2	0.13919411	22.9894787	2.39865951	4.00134049	0.00029315	0.80134049	16.2560163
Romero	Tomillo	6.55	0.13919411	47.0565891	5.74865951	7.35134049	2.4966E-05	0.80134049	33.2740333
Canela	Tomillo	3.35	0.13919411	24.0671105	2.54865951	4.15134049	0.00024424	0.80134049	17.018017

Los resultados obtenidos de la prueba de TUKEY HSD/KRAMER indican que hay diferencias significativas al comparar los aceites esenciales utilizados en este estudio sobre la cepa bacteriana *B. bronchiseptica*.

Anexo 12 Análisis de Varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos de los aceites esenciales de Tomillo, Canela, Romero y Laurel sobre la cepa bacteriana de *P. multocida*.

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION					Alpha	0.05				
<i>Group</i>	<i>Count</i>	<i>Sum</i>	<i>Mean</i>	<i>Variance</i>	<i>SS</i>	<i>Std Err</i>	<i>Lower</i>	<i>Upper</i>		
Laurel	2	1.9	0.95	0.005	0.005	0.21065374	0.36513144	1.53486856		
Romero	2	21.6	10.8	0.18	0.18	0.21065374	10.2151314	11.3848686		
Canela	2	8.1	4.05	0.125	0.125	0.21065374	3.46513144	4.63486856		
Tomillo	2	5.1	2.55	0.045	0.045	0.21065374	1.96513144	3.13486856		

ANOVA									
<i>Sources</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>	<i>F crit</i>	<i>RMSSE</i>	<i>Omega Sq</i>	
Between Groups	112.53375	3	37.51125	422.661972	1.8523E-05	6.59138212	14.5372276	0.99371556	
Within Groups	0.355	4	0.08875						
Total	112.88875	7	16.1269643						

El resultado del Análisis de Varianza (ANOVA) indica que ($p < 0.05$) tiene un rango mayor al del *P valor* en la cual se llega a la conclusión de que hay diferencias significativas entre los aceites esenciales sobre *P. multocida*.

Anexo 13 Prueba de TUKEY HSD/KRAMER de los aceites esenciales Laurel, Canela, Tomillo y Romero

TUKEY HSD/KRAMER			alpha			0.05
<i>group</i>	<i>mean</i>	<i>n</i>	<i>ss</i>	<i>df</i>	<i>q-crit</i>	
Laurel	0.95	2	0.005			
Romero	10.8	2	0.18			
Canela	4.05	2	0.125			
Tomillo	2.55	2	0.045			
		8	0.355	4	5.757	

Q TEST

<i>group 1</i>	<i>group 2</i>	<i>mean</i>	<i>std err</i>	<i>q-stat</i>	<i>lower</i>	<i>upper</i>	<i>p-value</i>	<i>mean-crit</i>	<i>Cohen d</i>
Laurel	Romero	9.85	0.21065374	46.7591973	8.63726639	11.0627336	2.5574E-05	1.21273361	33.0637455
Laurel	Canela	3.1	0.21065374	14.7160926	1.88726639	4.31273361	0.00168456	1.21273361	10.4058488
Laurel	Tomillo	1.6	0.21065374	7.59540261	0.38726639	2.81273361	0.01966052	1.21273361	5.37076069
Romero	Canela	6.75	0.21065374	32.0431048	5.53726639	7.96273361	8.3363E-05	1.21273361	22.6578967
Romero	Tomillo	8.25	0.21065374	39.1637947	7.03726639	9.46273361	4.5557E-05	1.21273361	27.6929848
Canela	Tomillo	1.5	0.21065374	7.12068995	0.28726639	2.71273361	0.02460887	1.21273361	5.03508815

Los resultados obtenidos de la prueba de TUKEY HSD/KRAMER indican que hay diferencias significativas al comparar los aceites esenciales utilizados en este estudio sobre la cepa bacteriana *P. multocida*.