

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DEL EXTRACTO DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*) IN VITRO EN CEPA CERTIFICADA DE *Escherichia coli*”

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

JORGE ANÍBAL MARTÍNEZ JIMÉNEZ

(jamj_99@yahoo.es)

DRA. MAYRA ANDREA MONTERO RECALDE

TUTOR

Cevallos-Ecuador

2017

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DEL EXTRACTO DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*) IN VITRO EN CEPA CERTIFICADA DE *Escherichia coli*”

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

JORGE ANÍBAL MARTÍNEZ JIMÉNEZ

(jamj_99@yahoo.es)

DRA. MAYRA ANDREA MONTERO RECALDE

TUTOR

Cevallos-Ecuador

2017

“El suscrito, JORGE ANIBAL MARTINEZ JIMENEZ, portador de la cédula de identidad número 1804636049, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: “EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DEL EXTRACTO DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*) IN VITRO EN CEPA CERTIFICADA DE *Escherichia coli*” 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”.

.....
Jorge Aníbal Martínez Jiménez

180463604-9

DERECHO DEL AUTOR

“Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado “EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DEL EXTRACTO DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis*) IN VITRO EN CEPA CERTIFICADA DE *Escherichia coli*” como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario 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”.

.....
Jorge Aníbal Martínez Jiménez

180463604-9

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO BACTERICIDA DEL EXTRACTO DE
ROMERO (*Rosmarinus officinalis*) IN VITRO EN CEPA CERTIFICADA DE
Escherichia coli”**

REVISADO POR:

.....

Dra. Mg. Mayra Montero Recalde.

TUTOR

.....

Dr. Mg. Pedro Díaz.

ASESOR DE BIOMETRIA

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN:

FECHA

.....

.....

Ing. Mg. Hernán Zurita.

PRESIDENTE TRIBUNAL

.....

.....

Dr. Mg. Pedro Díaz.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

.....

.....

Dr. Mg. Roberto Almeida

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

AGRADECIMIENTO

Agradezco principalmente a Dios por haberme dado la vida, y haberme dado una hermosa familia ya que este logro se los debo a ellos por haberme apoyado y bendecido en toda la carrera y así haberla culminado con éxito.

Debo agradecer a la Universidad Técnica de Ambato, honorable institución que me abrió las puertas y me permitió formarme académicamente para ser profesional, a las autoridades de la Facultad y a mis maestros quienes me han instruido en las distintas cátedras y han sabido guiarme y darme un consejo cuando lo he necesitado.

Agradezco de corazón a la Doctora Mayra Montero, quien me ayudo como Tutor de Tesis brindándome su apoyo y conocimiento en la investigación.

GRACIAS TOTALES

DEDICATORIA

Con inmenso amor y gratitud, dedico esta tesis a mi familia especialmente a mi abuelito Jorge Martínez Soria quien está ahora en el cielo, pero fue quien siempre me motivó, ayudó e impulsó a seguir esta carrera.

A mis padres, Jorge Martínez y Olga Jiménez, por su confianza depositada en mí, por invertir todos sus esfuerzos y su tiempo en mi formación humana y espiritual, por haberme enseñado que se requieren de perseverancia y disciplina para la realización de mis sueños, como este, y además por haberme inculcado que la verdad, honestidad, y sencillez deben primar en todo propósito de vida.

A mi querida hermana Adriana, por su cariño y apoyo constante en el trayecto de mi carrera universitaria, quien ha sido un ejemplo a seguir.

A mi novia Daniela López quien ha sido un apoyo importante día a día antes, durante y después del trabajo realizado, además quien siempre ha tenido las palabras correctas y ha estado a mi lado cuando lo he necesitado.

A mis compañeros y amigos con quienes compartimos en el aula día a día y cultivamos una amistad sincera e incondicional.

Jorge Aníbal Martínez Jiménez

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN..... - 1 -

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO - 2

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS - 2 -

2.2 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL - 10 -

2.2.1 Romero (*Rosmarinus officinalis*)..... - 10 -

2.2.2 Extractos de plantas medicinales - 11 -

2.2.3 E. coli (*Escherichia coli*)..... - 13 -

2.2.4 Medios de Cultivo..... - 14 -

CAPÍTULO III

3.1 HIPÓTESIS..... - 18 -

3.2 OBJETIVOS - 18 -

.2.1. OBJETIVO GENERAL - 18 -

.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS - 18 -

CAPÍTULO IV

4.1 Ubicación del experimento - 19 -

4.2 Características del lugar - 20 -

4.3 Equipos y Materiales..... - 21 -

4.4 Factores en estudio - 22 -

4.5 Tratamientos..... - 22 -

4.6 Diseño experimental..... - 23 -

4.7 Metodología de la Investigación..... - 23 -

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN -

28 -

5.1. RESULTADOS..... - 28 -

5.1.1. Concentración mínima inhibitoria y Concentración bactericida mínima - 28 -

5.1.2. Medición de halos de inhibición - 28 -

5.2. DISCUSIÓN..... - 30 -

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS -

31 -

6.1.	CONCLUSIONES	- 31 -
6.2.	BIBLIOGRAFÍA	- 32 -
6.3.	ANEXOS	- 35 -
CAPÍTULO VII		
	PROPUESTA	-
	41 -	
7.1.	DATOS INFORMATIVOS	- 41 -
7.2.	ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA	- 41 -
7.3.	JUSTIFICACIÓN	- 41 -
7.4.	OBJETIVOS	- 42 -
7.5.	ANÁLISIS DE FACTIBILIDAD	- 42 -
7.6.	FUNDAMENTACIÓN	- 42 -
7.7.	METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO	- 42 -
7.8.	ADMINISTRACIÓN	- 42 -
7.9.	PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN	- 43 -

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Ubicación geográfica del lugar de ensayo.....	20
TABLA 2.	Prueba de Tukey al 5% de significancia para los halos de inhibición.....	28
TABLA 3.	Concentraciones y diluciones del extracto de romero.....	39
TABLA 4.	Determinación de la Concentración mínima inhibitoria a diferentes diluciones de extracto de romero.....	40
TABLA 5.	Análisis de la varianza.....	40

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Obtención del extracto de romero por el método de destilación por arrastre de vapor.....	35
Anexo 2.	Siembra de la bacteria en Agar MacConkey mediante estriación.....	35
Anexo 3.	Concentraciones de extracto de romero 20%, 40% 60% y 80%.....	36
Anexo 4.	Cepa certificada de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	36
Anexo 5.	Distribución de los discos de sensibilidad con concentraciones de Extracto de romero sobre el agar Mueller Hinton.....	37
Anexo 6.	Incubación de las placas durante 24 horas.....	37
Anexo 7.	Diámetro de los halos de inhibición de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922....	38
Anexo 8.	Análisis de varianza de los halos de inhibición.....	39

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto bactericida del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) in vitro en una cepa certificada de *Escherichia coli*, la misma que se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, esta investigación permitió profundizar el efecto del extracto oleoso, mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria, Concentración Bactericida Mínima y la Sensibilidad Bacteriana. El extracto se lo obtuvo mediante la técnica de arrastre de vapor, y almacenada en refrigeración a 4°C; la concentración mínima inhibitoria se analizó a partir de las concentraciones al 20%, 40%, 60%, y 80% del inóculo de la cepa estandarizada del tubo número 5 de la escala de MacFarland; realizándose su lectura a las 24 horas previa incubación a 37°C, determinando que el tubo #4 con el 80% de concentración no presentó turbidez y al sembrar en placa posterior a 24 horas de incubación dio como resultado 0 crecimiento de colonias de la cepa certificada de *E.coli*; la investigación manejó 5 tratamientos: Testigo a base de etanol al 98%, y los tratamientos al 20%, 40%, 60%, y 80%; en cada tratamiento se realizaron 5 repeticiones utilizando cajas Petri de 90mm de diámetro, las cuales en su interior contenían 4 discos impregnados con las diferentes concentraciones del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*), los mismos que facilitaron la medición del crecimiento de los halos de inhibición, con la regla milimétrica Hiantibiotic ZoneScale. El resultado obtenido determinó que al 20% y 40% presentan halos de inhibición a la cepa de *E.coli* ATCC 25922 de 5,55mm y 6,80mm respectivamente; mientras que al 60% y 80% fueron de 9,10mm y 10,90mm de diámetro de halos de inhibición; al realizar la prueba de Tukey al 5% comparando las medias se concluye que el tratamiento al 60% y 80% de concentración respectivamente son estadísticamente iguales con el mayor efecto antibacteriano.

Palabras Clave

Arrastre de vapor, Discos oxoid, Halos de inhibición, Mac Farland.

SUMMARY

The objective of the present investigation was to evaluate the bactericidal effect of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*) in vitro on a certified strain of *Escherichia coli*, which was carried out at the Faculty of Agricultural Sciences of the Technical University of Ambato. Allowed to deepen the effect of the oily extract, by means of determination of Minimum Inhibitory Concentration, Minimum Bactericidal Concentration and Bacterial Sensitivity. The extract was obtained by the steam entrainment technique and stored in refrigeration at 4 ° C; The minimum inhibitory concentration was analyzed from the concentrations at 20%, 40%, 60%, and 80% of the inoculum of the standard strain of tube number 5 of the MacFarland scale; With its reading being carried out at 24 hours after incubation at 37 ° C, determining that tube # 4 with 80% concentration did not show turbidity and when seeding on plaque after 24 hours of incubation resulted in growth of colonies of the strain Certified *E. coli*; The research conducted 5 treatments: T0 Witness based on 98% ethanol, 20%, 40%, 60%, 80%; In each treatment, 5 replicates were performed using 90 mm diameter Petri dishes, which contained 4 disks impregnated with the different concentrations of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis*), which facilitated the measurement of the growth of inhibition halos , With the millimeter rule Hiantibiotic ZoneScale. The obtained result determined that 20% and 40% present halos of inhibition to the strain of *E.coli* ATCC 25922 of 5,55mm and 6,80mm respectively; While 60% and 80% were 9.10mm and 10.90mm diameter inhibition halos; When doing the test of Tukey to 5% comparing the means one concludes that the treatment to 60% and 80% of concentration respectively are statistically equal with the greater antibacterial effect.

Keywords

Steam Trap, Oxoid Disks, Inhibition Halos, Mac Farland.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El Estado prevendrá y controlará la introducción y ocurrencia de enfermedades de animales y vegetales; asimismo promoverá prácticas y tecnologías de producción, industrialización, conservación y comercialización que permitan alcanzar y afianzar la inocuidad de los productos. Para lo cual, el Estado mantendrá campañas de erradicación de plagas y enfermedades en animales y cultivos, fomentando el uso de productos veterinarios y fitosanitarios amigables con el medio ambiente. Los animales que se destinen a la alimentación humana serán reproducidos, alimentados, criados, transportados y faenados en condiciones que preserven su bienestar y la sanidad del alimento (Asamblea Nacional, 2010).

Por esta razón, el uso de fitobióticos, ha despertado el interés para evaluar las propiedades de los extractos de plantas y remplazar el uso de antibióticos ya que estos crean resistencia bacteriana. Dados los innumerables usos en el ámbito fitoterapéutico, el romero (*Rosmarinus officinalis*) perteneciente a la familia Lamiaceae, es una especie originaria de la región mediterránea, rica fuente de metabolitos activos, esta planta es muy usada en la medicina tradicional por sus efectos digestivos, antiespasmódicos y carminativos (Castaño, Ciro, Zapata, & Jimenez, 2010).

Su actividad biocida se define como “La capacidad que posee un compuesto natural para inhibir el crecimiento de microorganismos”, así se encuentran plantas como el romero (*Rosmarinus officinalis*) con diferentes bondades y varios efectos como antiinflamatorios, astringentes, antiespasmódicos además del efecto bactericida. El romero contiene más de 40 principios antibacterianos y más de 20 antivíricos, en su composición se encuentran, terpenoides, flavonoides, ácidos fenólicos, pequeñas cantidades de alcaloide rosmaricina y un 2% de aceite esencial (Estrada, 2010).

Con estos antecedentes, este trabajo pretende determinar la efectividad inhibitoria de crecimiento bacteriano de *Escherichia coli*, mediante el uso del extracto oleoso de romero ecuatoriano, aplicando la técnica microbiológica de difusión en disco, para su posible aplicación en animales, ya sea para uso como fármaco o para formulación de dietas balanceadas según los resultados de este estudio.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA O MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

El uso de las plantas con fines terapéuticos en la medicina tradicional es muy importante y estudios reportan sobre las diferentes actividades biológicas que presentan los aceites esenciales, tales como insecticidas, antioxidante y efecto antibacteriano. Se pueden mencionar trabajos sobre el aceite esencial de Menta (*Mentha piperita*), Orégano (*Origanum sp.*), Salvia (*Salvia fruticosa*), donde los autores enumeran propiedades tales como carminativo, antiinflamatorio, antiespasmódico, antiemético, analgésico, emenagogo, estimulante, anticatarral, etc. Pero cabe destacar que estos trabajos fueron llevados a cabo utilizando los aceites esenciales y diversos extractos de ellos, es decir, que la actividad biológica no se puede atribuir a un compuesto en particular (Garro & Okulik, 2006).

La incidencia que los productos de origen vegetal tienen en la Terapéutica han variado a lo largo del tiempo, en buena parte en relación con los avances del conocimiento científico. Desde un punto de vista etimológico, podemos considerar que el término Fitoterapia se refiere a la "Terapéutica con las plantas", es decir, a la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico. Muchos de estos principios activos aislados ejercen una acción farmacológica potente y producen efectos inmediatos (Yarnell et al., 2006).

Los antibióticos como promotores de crecimiento (APC), a niveles subterapéuticos, favorecen la selección de factores de resistencia, y los animales que reciben dichas dosis actúan como reservorios de patógenos resistentes los cuales se han detectado en carne o sus subproductos. La creciente demanda de alimentos cárnicos inocuos ha originado la búsqueda de nuevas alternativas de APC, para incrementar la eficiencia alimenticia animal. Los extractos vegetales y aceites esenciales, contenidos en plantas aromáticas, tienen

potencial como APC por sus propiedades bactericidas, bacteriostáticas, fungicidas y virales. La actividad antimicrobiana de esos extractos y aceites ha sido demostrada in vitro El orégano (*Origanum vulgare*) está constituido principalmente por carvacrol y timol; hierba santa (*Piper auritum*, sinónimo de *Piper sanctum*) contiene fenilpropanoides, lignanos, sequiterpenos y monoterpenos como borneol, alcanfor, cíñelo, eugenol, safrol y una amplia variedad de componentes bencénicos. La albahaca (*Ocimum basilicum*) contiene aceite esencial (menos de 1%) de composición compleja, y los componentes del aroma más importantes son el 1,8-cineol, linalol, citral, metilchavicol (estragol), eugenol y metilcinamato (Lara & Itza, 2011).

La contaminación microbiológica es un riesgo para la salud debido a la resistencia de algunos microorganismos a los antibióticos convencionales y a los conservantes sintéticos utilizados en la industria. La búsqueda de mayor conocimiento sobre la actividad antimicrobiana de las plantas en el sector farmacéutico y alimentario, ha despertado el interés para evaluar las propiedades del romero (*Rosmarinus officinalis* L.) en el ámbito fitoterapéutico. Se han realizado estudios in vitro con extractos de *R. officinalis* en los que se ha evaluado su actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas. Se ha usado contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. También se ha evaluado su actividad contra bacterias Gram negativas *Campylobacter jejuni* y *Salmonella* spp. (Castaño et al., 2010).

La actividad biológica del extracto de plantas puede variar desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano hasta la acción bactericida o fungicida. Sin embargo, se ha encontrado que la actividad antimicrobiana presentada por los aceites esenciales es debida, en gran medida a la presencia de un tipo de compuestos denominados “terpenoides”. Los terpenoides son los principales contribuyentes de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, siguiendo en orden de actividad los terpenoides que contienen grupos alcoholes, luego los que poseen aldehídos y por último los que tienen grupos cetónicos. Por ejemplo, podemos mencionar que el aceite esencial de Lemon grass posee cantidades considerables de α -citral, β -citral, citronelol, citronelal, linalool y geraniol los cuales han mostrado poseer actividad antimicrobiana ante *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Garro & Okulik, 2006).

Los productos de origen vegetal han pasado de tener un papel hegemónico en el arsenal terapéutico a un discreto segundo plano, en Alemania, por ejemplo, el porcentaje de la población que utiliza medicamentos fitoterápicos ha experimentado un aumento, entre 1970 y 1997, de entre un 4% y un 92%, en Francia, la Fitoterapia es la que ha reunido un mayor crecimiento absoluto, pasando del 2.5% (1990) al 12.1% (1997). Las alergias, el insomnio, los problemas respiratorios y los digestivos constituyen las situaciones en las que más se recurre a la Fitoterapia. En Norteamérica más de un tercio de la población consume plantas medicinales. Específicamente en EE.UU. de Norteamérica las 4 plantas más usadas en los últimos dos años fueron ginkgo, equinácea, ajo y ginseng (Trujillo, 2011).

La determinación de la CMI es fundamental para evaluar la acción de cualquier sustancia como conservante de alimentos, y valorar su efecto sobre la inhibición de los microorganismos sin afectar las características sensoriales del producto que se desea conservar. Estudios de la actividad antimicrobiana del extracto y del aceite esencial de romeros realizados, han utilizado modelos donde se compara su actividad contra la de los antibióticos convencionales. Este modelo no es extrapolable a aplicaciones de conservación de alimentos. Por esa razón es de especial importancia adelantar investigaciones que permitan valorar la actividad antimicrobiana específica del romero, comparándola con la de los conservantes aceptados por la legislación vigente en alimentos, y así, participar en la búsqueda de nuevos conservantes de alimentos de origen natural. (Castaño et al., 2010).

Se determinó el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* y del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*, para lo cual se trabajó con dos concentraciones distintas de ambos compuestos (25 mg/ml y 50 mg/ml del extracto de *R. officinalis* y 0,41 mg/ml y 0,82 mg/ml de agua ozonizada), además del control positivo con clorhexidina al 0,12% y el control del solvente que fue etanol absoluto. Para evaluar el efecto antibacteriano tanto del extracto alcohólico como del agua ozonizada se procedió a sembrar con hisopo estéril el inóculo estandarizado de *S. mutans* y de *E. faecalis* independientemente en placas con agar Mueller-Hinton a las cuales se les colocó un disco de papel de filtro estéril en el centro de las mismas y se incorporó 25 µL de cada concentración del extracto alcohólico como del agua ozonizada. Las placas

sembradas e inoculadas fueron incubadas a 36°C por 24 horas. La concentración de 25 mg/ml del extracto alcohólico de *R. officinalis* produjo un halo promedio 25 mm para *E. faecalis* y de 19 mm para *S. mutans*. Mientras que la concentración de 50 mg/ml se obtuvo un halo de inhibición promedio de 36 mm para *E. faecalis* y de 24 mm para *S. mutans*. El halo formado en el control de clorhexidina al 0,12 % fue de 16 mm y es semejante al obtenido con el solvente etanol absoluto. Se concluye que a las concentraciones de 25mg/ml y 50mg/ml del extracto alcohólico de *R. officinalis* existe efecto bactericida sobre *S. mutans* y *E. faecalis* en condiciones de laboratorio y este efecto se incrementa cuando se le agrega agua ozonizada (Sosa, 2015).

Se determinó la inhibición de crecimiento bacteriano in vitro de *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extractos: acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* (romero), aplicando la técnica microbiológica de difusión de disco en medio sólido. Se utilizó dos grupos de 15 muestras cada una en cajas Petri; siendo G1: Extracto acuoso de 1.5% y 3%, G2: Extracto oleoso 50%. Cada grupo tuvo un control positivo de Clorhexidina 0.12% y un control negativo de agua destilada. Se aplicó el test estadístico de U Mann Whitney con un nivel de significancia de 5%. Resultados: Los extractos acuosos y el agua destilada produjeron un halo de inhibición de 0 mm. El extracto oleoso elaborado produjo una media de 11,93 mm de halo de inhibición ($p < 0.001$), versus la Clorhexidina que presentó una media de 16.13 mm ($p < 0.001$). No se encontraron diferencias entre el extracto oleoso y la clorhexidina ($p > 0.05$). Conclusiones: El extracto acuoso de romero no mostró efecto antibacteriano sobre el *S. mutans*. El extracto oleoso de romero mostró acción antibacteriana sobre *S. mutans*, siendo similar a la clorhexidina (Solano, 2016).

Se determinó el efecto inhibitorio in vitro del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* y *Argemone mexicana* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* productora de betalactamasa de espectro extendido, se evaluaron diez concentraciones distintas (10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100 mg/mL) de extracto etanólico de *R. officinalis* y *A. mexicana*. Los resultados fueron expresados como diámetro (mm) de halo de inhibición de crecimiento de *E. coli*. En el método de microdilución se colocaron en 10 pocillos de las 10 concentraciones de los extractos a doble concentración y la microplaca fue incubada a 37° C por 24. Para el primer método se consideró controles positivos (discos

de antibióticos amoxicilina/Ácido clavulánico y Cefotaxima/Ácido clavulánico) y negativo (etanol absoluto) y para el segundo método solo control negativo (agua destilada y etanol absoluto). Se encontró que el crecimiento *E. coli* productora de BLEE es dependiente de la concentración de extracto etanólico de hojas de *R. officinalis* y de *A. mexicana*. El análisis estadístico indica que no existe diferencia significativa entre los promedios de los halos de inhibición de los tratamientos evaluados para ambos extractos. Se determinó que la concentración mínima inhibitoria fue $< 10\text{mg/mL}$. Se concluye que existe inhibición bacteriana de *Escherichia coli* productora de BLEE a las diferentes concentraciones de los extractos alcohólicos de *R. officinalis* y *A. mexicana*. Estadísticamente no existe diferencia significativa entre los diámetros de halos de inhibición de los tratamientos evaluados, con el 95% de confiabilidad (Ruiz, 2016).

Se evaluó la actividad bactericida y se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre microorganismos de interés alimentario: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Lactobacillus plantarum*. El aceite esencial exhibió un amplio espectro de acción antimicrobiana tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas con CIM entre 512 – 4096 ppm. El extracto etanólico mostró actividad antimicrobiana contra las bacterias *S. sonnei*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* con CIM de 1024 ppm. La nisina, utilizada como control positivo, ocasionó una inhibición del crecimiento de todas las bacterias evaluadas con CIMs entre 2 y 1024 ppm, mientras que los conservantes usados comúnmente en la industria de alimentos presentaron una actividad antimicrobiana menor que la encontrada con el aceite esencial de *R. officinalis* (Ciro, Zapata, & Jiménez, 2010).

Se realizó un estudio con el objetivo de comprobar la eficacia de los extractos acuosos al 100% de *Salvia Officinalis*, de Romero, y de *Salvia-Romero* en la inhibición del crecimiento del *Streptococcus mutans*. Es un estudio transversal, comparativo, experimental, in vitro, se lo realizó con una muestra de 15 cajas Petri con agar sangre de cordero 5%, 5 cajas Petri por extracto. Lo que dio como resultado 60 muestras, Los resultados indicaron que el Efecto bactericida del extracto acuoso de Romero al 100%

sobre el *Streptococcus mutans*, no mostró un halo de inhibición mayor de 6.15 mm a las 24 h y de 6.15mm a las 48 h. Los extractos acuosos de Salvia con Romero al 100% sobre el *Streptococcus mutans*, mostraron un halo de inhibición de 12.60 a las 24 horas y de 15.40 a las 48 horas, mientras que la acción bactericida del extracto acuoso de Salvia (*Salvia Officinalis*) al 100%, sobre el *Streptococcus mutans*, mostró un halo de inhibición de 12.45mm a las 24 horas y de 15.35mm a las 48 horas. (Marín, 2016).

Los aceites esenciales tienen propiedades bactericidas, insecticidas y acaricidas y se usan con el fin de controlar algunas plagas de manera natural. Éstos se pueden extraer de muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencia de cítricos; destilación con vapor de agua, la muestra vegetal es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada; y extracción con solventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. (Martinez, 2009).

Se evaluó la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de 5 plantas empleadas en medicina tradicional en el Perú, Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*), Anís serrano (*Senecio tephrosioides*), Huamanripa (*Tagetes pusilla*), Salvia (*Lepechinia meyenii*). Los aceites esenciales obtenidos por destilación por arrastre de vapor, se enfrentaron a *Salmonella tiphy* ATCC 6539, *S. thypimurium* ATCC 14028, *S. enteritidis* INS, *Vibrio cholerae* ATCC E-7946 OGAWA, *Pseudomonas aeruginosa* GT 28, *Shigella flexneri* INS, *Staphylococcus aureus* INS, *S. aureus* ATCC 6538P y *Candida albicans* ATCC 1023. Se empleó discos de antibióticos como controles. Los aceites esenciales mostraron efecto variado sobre Gram positivos y Gram negativos; ninguno inhibió a *Pseudomonas aeruginosa*. (Alzamora, Morales, Armas, & Fernández, 2001).

Se evaluó la actividad antibacteriana frente a *Clostridium perfringens* (cepa ATCC: 13124) por el método de Kirby Bauer en agar SPS de los aceites esenciales o extractos obtenidos con solventes orgánicos de diferente polaridad a partir de *Allium sativum* (ajo), *Coriandrum sativum* (cilantro), *Eugenia Caryophyllata* (clavo de olor), *Origanum vulgare* (orégano), *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Thymus vulgaris* (tomillo), utilizando la vancomicina como control. Los extractos obtenidos por el método de lixiviación de *O. vulgare* y *T. vulgaris* no presentaron inhibición para este microorganismo; los demás extractos vegetales sí la presentaron, obteniéndose concentraciones bacteriostáticas mínimas que oscilaron entre 16 y 63 µl/ml. El extracto etanólico y el aceite esencial de *E. caryophyllata* fueron los que presentaron una menor concentración inhibitoria mínima (250 µl/ml). Se observan variaciones importantes en la capacidad de inhibición de dichos extractos con respecto a estudios realizados por otros grupos de investigación en el mundo, pocos de ellos utilizaron a *Clostridium perfringens*. (Ardilla & Vargas, 2009).

En el Perú se han realizado diversos estudios en diferentes plantas medicinales, comprobándose las propiedades de sus componentes como: antibacterianas, antihemorrágicas, analgésicas, antiinflamatoria; estos estudios se han venido intensificando en los últimos años, lo que ha permitido identificar y aislar los principios activos responsables de su actividad farmacológica. El *Rosmarinus officinalis* (romero), es una planta que al tener un alto contenido en aceites esenciales, cuyos ingredientes activos son flavonoides, ácidos fenólicos y principios amargos, genera una acción tónica y estimulante sobre el sistema nervioso, circulatorio y corazón, además de ser colerético, colagogo, antiespasmódico, diurético. Por lo que en los últimos años se han desarrollado una gran cantidad de aportaciones científicas que brindan amplia información de las aplicaciones del romero (Purca, 2013).

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (90 %) e hidroalcohólico (70 %) de *Rosmarinus officinalis*, sobre dos cepas de *Staphylococcus aureus*, una cepa resistente a la meticilina y otra cepa sensible a la meticilina. Los resultados muestran que el extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* presenta una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 1 mg/mL sobre la cepa *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, mientras que del extracto etanólico, la concentración requerida fue de 2

mg/mL. La cepa *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina, el extracto hidroalcohólico mostró una concentración inhibitoria mínima de 2 mg/mL independientemente del medio de cultivo utilizado. La diferencia entre medios de cultivo se observa solo en el extracto etanólico sobre esta cepa ya que para el medio Mueller Hinton se obtuvo una concentración inhibitoria mínima de 2 mg/mL y para el medio Mueller Hinton Salino, una concentración inhibitoria mínima de 4 mg/mL. Las CIM de vancomicina necesarias para inhibir la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, fueron de 0.49 µg/mL para medio Mueller Hinton y de 0.98 µg/mL para medio Mueller Hinton Salino. Para la cepa *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina, la concentración obtenida fue de 0.98 µg/mL independientemente del medio de cultivo utilizado (Lemus, 2015).

Para la extracción del aceite esencial de romero, se empleó hojas y se lo obtuvo por arrastre a vapor. Las cepas utilizadas para este ensayo fueron: *Escherichia coli* ATCC 11225 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La actividad antimicrobiana “in vitro” del aceite esencial de esta planta se puso de manifiesto utilizando el método de difusión del disco (Kirby Bauer), con cuatro repeticiones a diferentes concentraciones, obteniéndose de esta manera la CMI y la CMB. Los resultados para la difusión en disco fue para el caso de *Escherichia coli* ATCC 11225 en el tratamiento T3 con una sensibilidad promedio de 11,5 mm. Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue en el tratamiento T2 con una sensibilidad promedio de 11,0 mm. Los resultados del MIC fue en el caso de *Escherichia coli* ATCC 11225 de 6,83 mg/ml, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 9,50 mg/ml. Además la CMB fue para *Escherichia coli* ATCC 11225 de 7,12 mg/ml, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 10,09 mg/ml. Se concluye que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* presentó compuestos bioactivos, principalmente monoterpenos, con efecto antimicrobiana in vitro frente a *E. coli* ATCC11225 y *S. aureus* ATCC 25923 (Rondón, 2013).

Este trabajo se realizó con romero (*Rosmarinus officinalis*), una planta ampliamente distribuida en las tierras del mediterráneo, Turquía y en el continente Americano. Los aceites esenciales de esta planta han sido investigados, tanto su actividad antimicrobiana como antioxidante, sin embargo existe un subproducto derivado de la obtención del aceite

esencial por hidrodestilación, sobre el cual hay gran interés, el hidrosol. El diente de león es una planta que al igual que el romero, tiene amplia distribución, y posee diversos usos a nivel de medicina tradicional, con diversas aplicaciones tanto gastronómicas como medicinales. El objetivo de este trabajo fue la evaluación antimicrobiana de los hidrosoles y aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* y de *Taraxacum officinale* contra 4 bacterias patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus*. (Ramos, 2014).

2.2 CATEGORÍAS FUNDAMENTALES O MARCO CONCEPTUAL

2.2.1 Romero (*Rosmarinus officinalis*)

Rosmarinus officinalis L. (romero), es un arbusto leñoso que llega a alcanzar un metro o más de altura, siempre verde que desprende un perfume aromático alcanforado. Presenta hojas sentadas y lineales, flores en cimas racimosas axilares, bracteadas, de color azulado. La especie es originaria de las tierras del mediterráneo, donde es cultivada desde tiempos remotos, fundamentalmente en Grecia, Italia, España y Portugal. En Cuba fue introducida desde la conquista española y se le cultiva con frecuencia en patios y jardines de poblaciones rurales y urbanas. (Sosa & Navarro, 2011).

Al romero se le atribuyen múltiples propiedades medicinales: antirreumático, rubefaciente, sedante, diurético, colagogo, digestivo, vulnerario, tónico, antiespasmódico, estimulante de la circulación periférica, antibacteriano, colerético y protector del tejido hepático, las 2 últimas están científicamente comprobadas. Su principio activo es un aceite esencial compuesto por cineol, canfeno, borneol, alcanfor y otros; además se le han identificado alcaloides, saponinas, taninos, flavonoides, ácidos orgánicos y un principio amargo. (Lemes & Rodríguez, 2001).

Las plantas romero (*Rosmarinus officinalis*, Fam. Labiatae), salvia (*Salvia officinalis*, Fam. Labiatae) y guayaba (*Psidium guajava*, Fam. Myrtaceae) se presentan como una fuente alternativa de compuestos que pueden ser sucedáneos de los antioxidantes de

origen sintético. El romero y la salvia, poseen metabolitos secundarios con efectos medicinales reportados, la actividad antioxidante que se les atribuye, se debe principalmente a la presencia de los ácidos carnósico y rosmarínico (Ibañez et al., 2003; Bisio et al., 1997). Sin embargo, esta actividad biológica depende también de la presencia de compuestos activos, que incluyen terpenoides, flavonoides y ácidos fenólicos. El Romero, ha sido objeto de varias investigaciones sobre actividad biológica, que han mostrado que tanto el tallo como las hojas son fuentes de flavonoides, polifenoles y otras sustancias bioactivas (Pérez et al., 2008).

Adicionalmente, en las hojas se han encontrado ácidos fenólicos tales como el rosmarínico, a los cuales se les atribuye su mayor capacidad bactericida.

Existen diferentes formas de extraer los compuestos bioactivos de las plantas. Para seleccionar alguna técnica es necesario tener en cuenta que los compuestos pueden degradarse con la temperatura u oxidarse en presencia de oxígeno y luz. La extracción con fluidos supercríticos es una técnica importante que aprovecha las características de densidad y viscosidad de las sustancias en estados más allá de su punto crítico. El CO₂ es uno de los solventes más usados debido a que el extracto resultante se colecta libre de residuos de solvente, no tiene restricciones medioambientales, ni problemas de regulación en la salud pública (Meireles et al., 2005).

2.2.2 Extractos de plantas medicinales

El interés por cambiar los conservantes tradicionales como los nitritos en los productos cárnicos, ha despertado la inquietud en los procesos para la obtención de aceites esenciales y extractos vegetales de diversas plantas que posibiliten nuevas alternativas en la conservación de estos productos; en el proceso de los cárnicos el nitrito juega un papel importante como agente de curado y conservante, ya que aporta características de color y textura y como agente inhibidor de microorganismos como *Clostridium perfringens*, por lo cual se quiere generar diversos componentes que permitan reemplazarlo en todos sus aspectos ya que en muchos países, incluso de alto nivel sanitario, más de la mitad de todos los brotes epidémicos de enfermedades transmitidas por los alimentos son causados por carne y productos cárnicos que son los que más se asocian con la tóxica infección

producida por *C. perfringens*, pues ofrecen condiciones ideales para su desarrollo. (Ardilla & Vargas, 2009).

En las décadas precedentes las plantas medicinales han ganado importancia; la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales o extractos naturales de estas, y los productos naturales han mostrado el potencial de las plantas como fuente de agentes antimicrobianos. El ajo (*Allium sativum*), del cual se realiza la extracción del disulfuro de alilo ($C_6H_{10}S_2$), trisulfuro de alilo y tetrasulfuro de alilo, tiene un efecto bactericida, acción que se ha atribuido a los componentes sulfurados y fenólicos. Un patrón con el que se compara el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales o cualquier otro agente bactericida es el fenol. (Ardilla & Vargas, 2009).

Destilación por arrastre de vapor

La destilación por arrastre con vapor es una técnica usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, como resinas o sales inorgánicas, u otros compuestos orgánicos no arrastrables. La destilación por arrastre con vapor también se emplea con frecuencia para separar aceites esenciales de tejidos vegetales. Los aceites esenciales son mezclas complejas de hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos y fenoles y se encuentran en hojas, cáscaras o semillas de algunas plantas. En el vegetal, los aceites esenciales están almacenados en glándulas, conductos, sacos, o simplemente reservorios dentro del vegetal, por lo que es conveniente desmenuzar el material para exponer esos reservorios a la acción del vapor de agua. Los aceites esenciales son productos naturales aplicados en diferentes industrias, como son la farmacéutica, alimenticia, en perfumería, entre otros usos. Actualmente, se constituyen en productos alternativos para la elaboración de biopesticidas o bioherbicidas. La obtención de los aceites esenciales es realizada comúnmente por la tecnología llamada de destilación por arrastre con vapor, en sus diferentes modalidades. La pureza y el rendimiento del aceite esencial dependerán de la técnica que se utilice para el aislamiento. (Dominguez X, 2009).

Extracto de romero

En el romero (*Rosmarinus officinalis*) la mayor parte de la evidencia de los usos medicinales provienen de la experiencia clínica más que de estudios científicos. Sin

embargo, recientes estudios de laboratorio han mostrado que el romero disminuye el crecimiento de algunas bacterias tales como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* que están relacionadas con el proceso de infecciones y causantes de patologías en animales y humanos. Los principales agentes activos contenidos en el aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* son: pineno, canfeno, cineol, limoneno, alcanfor, linalol, D-linalol, borneol y su acetato, terpeno y cariofileno. El aceite es extraído de flores, tallos, y hojas. (Lax, 2014).

2.2.3 E. coli (*Escherichia coli*)

Investigadores del Reino Unido y Estados Unidos descubrieron que ciertos serotipos somatoflagelares (O:H) de *E. coli* estaban asociados con casos esporádicos de diarreas y gastroenteritis, por lo que se denominó a este grupo como *E. coli* enteropatógena (EPEC), coloniza la mucosa del intestino delgado y grueso provocando diarreas. Los síntomas de la enfermedad inducidos por EPEC suelen ser graves, la característica principal de la enfermedad es la diarrea, además puede presentarse fiebre en el cuadro clínico. El período de incubación de la infección varía entre las 3 a 24 horas después que el individuo ingiere un inóculo grande de bacterias (10^9 a 10^{10}) en condiciones experimentales. (Vidal-Graniel, 2003).

La infección por EPEC se caracteriza histopatológicamente por una alteración que la bacteria produce a nivel intestinal conocida como la lesión A/E (adherencia y esfacelamiento). La lesión es un proceso multiestado que degenera las microvellosidades del enterocito mediante la reorganización de algunas proteínas importantes que se encuentran en el citoesqueleto celular. Para que se induzca la lesión (A/E) la bacteria necesita adherirse al enterocito y traslocar hacia las células del huésped algunas proteínas importantes en la virulencia. El mecanismo patogénico versátil que contiene EPEC promueve cambios importantes a nivel de citoesqueleto que repercuten en la función celular normal. La estructura de tipo pedestal que se forma en el enterocito se produce principalmente debido a la polimerización y nucleación de los filamentos de actina y otras proteínas relacionadas a actina como a actinina, fimbrina, miosina, talina, ezrina, entre otras, justo por debajo de donde se encuentra la bacteria adherida a la célula, con lo que se forma una estructura de tipo pedestal en la membrana epitelial que se extiende hasta

10 mm de la región apical de la célula. Debido a que la bacteria produce este fenómeno a nivel intestinal, la EPEC se define como un virotipo diarreogénico de *E. coli* que causa la lesión A/E en células epiteliales in vitro e in vivo. (Vidal, 2003).

***E. coli* en animales**

Colibacilosis entérica

La sintomatología clínica puede ser muy variada. Afecta principalmente a terneros, corderos y lechones recién nacidos. Los tipos de enteropatógenos de *E. coli* en ciertas condiciones proliferan intensamente en el intestino. El número de gérmenes presentes en las porciones inicial y media del intestino delgado, en las que suele haber cantidades pequeñas, puede multiplicarse por decenas de millares. Los colis permanecen en el tracto intestinal sin provocar septicemia (Acha, 2011).

2.2.4 Medios de Cultivo

No son muy exigentes y crecen en los medios comunes que contienen peptonas y extractos de carne, pero crecen mejor si el medio contiene sangre, ácido nicotínico, tiamina y biotina. Son adecuados. (Heymann, 2011).

- 1. Preenriquecimiento en medio no selectivo:** se utiliza cuando la muestra en estudio ha sufrido un proceso de desecación o irradiación, cuando he estado congelada por mucho tiempo o si el pH del medio es muy bajo, este tratamiento puede determinar que las bacterias presentes en la muestra se encuentren en un estado semilátente y tiene como finalidad la revitalización de los microorganismos afectados por las diferentes condiciones. (Luna., 1991).

- 1.1.Caldo cerebro-corazón:** La infusión de cerebro y corazón ha resultado ser efectiva en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos muchos tipos de patógenos. Se ha utilizado como medio base para las nuevas fórmulas de medios de cultivo cuando se suplementa con sangre o agentes selectivos.(Flores, 2013).

2. Medios de cultivo selectivos: son aquellos que permiten seleccionar ciertos microorganismos deteniendo el desarrollo de otros; esto se logra con el agregado de sustancias inhibitorias como antibióticos, ciertos colorantes, sales biliares, etc.

2.1 Agar MacConkey (McK): las sales biliares y el cristal violeta ejercen una inhibición significativa sobre las bacterias Gram Positivas. La lactosa y el indicador rojo neutro permiten comprobar la degradación de ese disacárido; las colonias lactosa positivas (*Escherichia coli*) aparecen roja con halo turbio; las lactosas negativas (*Salmonella spp.*) son incoloras. (Pachón, 2009).

2.2 Agar Mueller Hinton: medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), para ser utilizado en forma rutinaria 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, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos adicionales que han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo. (Pachón, 2009).

MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA

El estudio de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Pero la determinación de la sensibilidad a antimicrobianos no implica solo realizar un conjunto de técnicas y medir los resultados. Es necesario saber interpretar los mismos y darles el significado que realmente tienen. (Taroco, Seija, & Vignoli, 2006).

Existen métodos cuantitativos y cualitativos para el estudio de la sensibilidad bacteriana.

Métodos cuantitativos son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB).

Concentración Mínima Inhibitoria CMI. Se define como la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado (concentración conocida de gérmenes). (Taroco et al., 2006).

Concentración Mínima Bactericida CMB. Se define como la mínima concentración de un antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizada. La determinación de la CIM puede realizarse por micro o macro dilución en caldo o dilución en agar. (Taroco et al., 2006).

Métodos Cualitativos

Disco Difusión

La descripción de la metodología según Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda como lo es el Método de disco difusión: Se embebió completamente con un hisopo estéril el inóculo preparado y estandarizado con el tubo Mc Farland, y se escurrió el hisopo sobre las paredes del tubo retirando el exceso de líquido.

Se sembró el inóculo en placa Petri de agar Mueller Hinton, previamente preparado como recomienda los estándares internacionales del National Committee for Clinical Laboratory Standards, para lo cual se estrió con un hisopo estéril en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie del agar, y se repitió el proceso rotando la placa 60° en dos oportunidades más dejando secar 5 minutos antes de colocar los discos.

Se colocó los discos con una pinza anatómica estéril sobre el agar Mueller y se los presionó suavemente para permitir su adherencia al agar de manera adecuada, ubicando en la placa a 15 mm del borde de la misma, se utilizaron cajas Petri de 90 mm de diámetro y se ubicaron 4 discos impregnados en cada

placa con 5 repeticiones por placa por cada una de las concentraciones al 30%, 60% y 90% del aceite esencial del romero.

Luego de colocados los discos las placas se incubaron a 35°C a 37°C en grupos no mayores a cinco placas durante 24 horas completas y las placas se colocaron en forma invertida.

Posteriormente se procedió a realizar la lectura de los antibiogramas a través de la medición de los halos de inhibición por una regleta de medición que lo hace en milímetros. (Cockeril et al., 2011); (Cockeril et al., 2012).(Coyle et al., 2009).

CAPÍTULO III

3.1 HIPÓTESIS

El extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) tiene acción bactericida sobre cepa certificada de *E. coli*, in vitro.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) como bactericida in vitro sobre la cepa certificada de *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la CMI del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) al 20%, 40%, 60%, 80% sobre la cepa certificada de *E. coli* ATCC 25922
- Determinar el efecto bactericida del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre la cepa certificada de *E. coli* ATCC 25922 mediante la medición de los halos de inhibición en placa.

CAPÍTULO IV

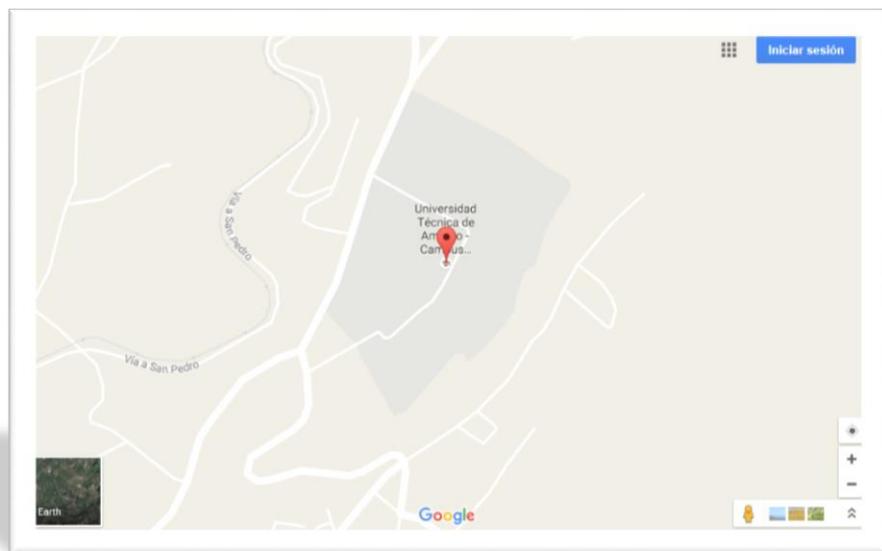
MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación del experimento

El proyecto se realizó en el laboratorio de Bacteriología de la Universidad Técnica de Ambato campus Querochaca.

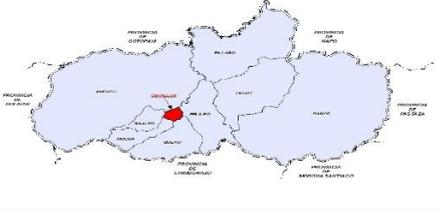
Querochaca, (Cantón Cevallos), está ubicado en el sector centro-sur de la provincia de Tungurahua (Ecuador) y al sur-oriente de la ciudad de Ambato. El nombre del cantón es en homenaje al historiador ambateño Don Pedro Fermín Cevallos.

La superficie del cantón Cevallos es de 19km² en la cual viven 8.163 habitantes. Cevallos es el cantón más pequeño del Ecuador, se encuentra a 2820m sobre el nivel del mar.



Ubicación del proyecto, Universidad Técnica de Ambato campus Querochaca

TABLA 1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA DEL LUGAR DE ENSAYO

	
ESTADO	Ecuador
COORDENADAS GEOGRÁFICAS	1°21'0"S78°37'0
PROVINCIA	Tungurahua
CANTÓN	Cevallos
DENSIDAD POBLACIONAL	8163hab
SUPERFICIE	19km ²
ALTITUD	2820m

4.2 Características del lugar

El cantón se caracteriza por la producción agrícola orientada hacia la fruticultura en huertos para el abastecimiento del mercado regional y nacional y ocupa aproximadamente el 70% de la superficie del cantón, circunstancia que ha variado los últimos años por la incidencia de la actividad eruptiva del volcán Tungurahua.

La agricultura se complementa con la ganadería menor- cuyes y conejos y avicultura doméstica. Se destacan también la artesanía de calzado y afines, confecciones y la pequeña industria limitada a la producción avícola para el mercado nacional. Los jóvenes se orientan hacia la artesanía y ofertan mano de obra en Ambato. La avicultura del cantón representa el 3% de la producción nacional.

4.3 Equipos y Materiales

Los equipos y materiales utilizados se detallan a continuación:

REACTIVOS

1. Caldo cerebro-corazón
2. Medio de cultivo sólido (Agar MacConkey y Mueller Hinton)
3. Etanol al 98%

MATERIALES BIOLÓGICOS

1. Romero
2. Cepa certificada E. coli ATCC 25922

EQUIPOS Y MATERIAL DE LABORATORIO

1. Balanza analítica
2. Autoclave
3. Cámara de flujo laminar
4. Incubadora
5. Agitador magnético
6. Pipetas de 10ml y 25ml
7. Matraz Erlenmeyer
8. Vasos de precipitación
9. Soporte universal
10. Pinzas
11. Agua destilada
12. Refrigeradora
13. Refrigerante-Condensador
14. Hornilla Eléctrica
15. Mandil
16. Guantes
17. Cajas Petri de 90 mm
18. Tubos de ensayo
19. Probetas
20. Lámparas de alcohol

21. Agua destilada
22. Espátula
23. Asa de platino
24. Cepillo de lavar equipos de vidrio
25. Gradilla porta tubos
26. Gasas
27. Algodón
28. Papel aluminio
29. Balanza electrónica
30. Fósforos
31. Microscopio
32. Tubo Mc Farland #0.5
33. Discos oxoid en blanco

4.4 Factores en estudio

Los factores en estudio del presente trabajo de investigación son los siguientes:

a) Concentración de aplicación. Se manejó 4 concentraciones del extracto de romero y adicional un testigo de etanol al 98%.

1. 20%
2. 40%
3. 60%
4. 80%

b) Cepa bacteriana

Cepa certificada *Escherichia coli* ATCC 25922

4.5 Tratamientos

Los tratamientos a seguir en el experimento son 5.

Repeticiones del tratamiento.

Se trabajó con 20 repeticiones por cada tratamiento así: T0 al 98% de etanol, T1 al 20%, T2 al 40%, T3 al 60% y T4 al 80% del extracto de romero, distribuido en 5 cajas Petri con 4 discos, cada uno se impregnó con 0,5ml de cada concentración; para la medición de los halos de inhibición.

4.6 Diseño experimental

El diseño experimental que se usó en la investigación fue un diseño completamente al azar, con 20 repeticiones. Se realizó el análisis de varianza según el diseño planteado y la prueba de TUKEY 5% para comparar los tratamientos.

4.7 Metodología de la Investigación

4.7.1. Obtención de material biológico.

La cepa certificada *Escherichia coli* ATCC 25922 se adquirió en el laboratorio MEDIBAC.

4.7.2. Obtención del extracto de romero.

Para la obtención del extracto de romero, se tomó 2kg de ramas del arbusto de romero antes de la floración utilizando las hojas más jóvenes, a las cuales se las lavó con agua bidestilada y se las dejó secar por 24 horas bajo sombra; y se procesó con el equipo tipo Clevenger, obteniéndose el extracto mediante el proceso de destilación por arrastre de vapor, esta técnica separa sustancias ligeramente volátiles e insolubles en agua, de otros productos no volátiles mezclados con ellos (Dominguez X, 2009); posteriormente se sometió a un proceso de decantación para separar el extracto acuoso del oleoso del romero; con el extracto oleoso al 100% se preparó las 4 concentraciones porcentuales, así: T1 20% 4 ml de etanol + 1 ml del extracto oleoso de romero; T2 40% 3ml de etanol + 2ml del extracto oleoso de romero; T3 60% 2ml de etanol + 3ml del extracto oleoso de romero y T4 80% 1ml de etanol + 4ml del extracto oleoso de romero.

4.7.3 Elaboración de los medios de cultivo

Se prepararon los medios de cultivo según indicaciones de la casa comercial y de acuerdo a las necesidades de cada proceso de la investigación así: para la activación de la cepa se utilizó Agar Mackonkey como medio diferencial para crecimiento de enterobacterias,, el caldo cerebro-corazon fue utilizado para la determinación de la concentración mínima inhibitoria asi como concentración bactericida mínima, en el caso de la determinación de la sensibilidad antimicrobiana de la cepa certificada de *E. coli* ante las concentraciones del 20%, 40%, 60%, y 80% y el testigo con etanol al 98%; se utilizó agar mueller como medio específico.

4.7.3 Activación de la cepa

Para la activación de la cepa certificada de *Escherichia coli* ATCC 25922, se respetó lo indicado por la casa comercial en la cual refiere que el hisopo debe ser empapado por el fluido de hidratación que este mantiene en su parte superior, una vez activada la cepa se sembró en Agar Mackonkey mediante la técnica de estriación por agotamiento previa rotulación de la caja Petri y se llevó a incubación a 37 °C por 24 horas, en posición invertida.

4.8 Variables respuesta

Las variables respuesta de esta investigación se basó en el efecto bactericida in vitro, es decir la medición de los halos de inhibición bacteriana.

4.8.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las cepas bacterianas al extracto de romero

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria se realizó la preparación del inóculo como lo recomienda el National Committee for Clinical Laboratory Standards (Cockeril et al., 2012) para lo cual se tomó con un asa bacteriológica 5 colonias bien aisladas y del mismo tipo morfológico del medio cultivado y se inoculó en 5 ml de caldo cerebro-corazón, llevando a incubación a 37°C por dos horas, hasta que se observó una turbidez estandarizada al tubo 0,5 de escala de Macfarland para lo cual se observó en un fondo blanco con líneas negras como contraste, teniendo el estándar una concentración establecida de $1,5 \times 10^8$ de unidades formadoras de colonias.

La metodología se tomó del National Committee for Clinical Laboratory Standards, tomando a partir del inóculo estandarizado 4 ml para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de la siguiente manera:

En el tubo N° 1 se colocó 1ml del inóculo más 1ml del extracto de romero al 20%.

En el tubo N° 2 se colocó 1ml del inóculo más 1ml del extracto de romero al 40%.

En el tubo N° 3 se colocó 1ml del inóculo más 1ml del extracto de romero al 60%.

En el tubo N° 4 se colocó 1ml del inóculo más 1ml del extracto de romero al 80%.

Los tubos inoculados se los llevaron a incubación a una temperatura de 37°C por 24 horas y posterior a este tiempo, se observó la turbidez a las concentraciones analizadas y el tubo con menor turbidez se lo determinó como la CMI, siendo el tubo número 4 con extracto al 80% como la concentración mínima que impide el crecimiento de microorganismos. (Cockeril et al., 2011); (Cockeril et al., 2012); (Coyle et al., 2009).

4.8.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Para establecer la CMB, se escogió los tubos que presentaron menor turbidez en la determinación de la CMI y se lo sembró en agar Maconkey e incubando a 37°C por 24 horas. (Cockeril et al., 2011); (Cockeril et al., 2012); (Coyle et al., 2009), comprobando el cero crecimiento de colonias en placa tanto al 60% y 80% del extracto de romero.

4.8.3 Método de disco difusión y medición de los halos de inhibición

Se tomó con un hisopo estéril el inóculo preparado y estandarizado con el tubo número 5 de la escala Mc Farland, y al retirarlo se tuvo precaución de escurrir el hisopo sobre las paredes del tubo retirando el exceso de líquido.

Se sembró el inóculo en placa Petri de agar Mueller Hinton, previamente preparado como recomienda los estándares internacionales del National Committee for Clinical Laboratory Standards, para lo cual se estrió con un hisopo en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie del agar, y se repitió el proceso rotando la placa 60° en dos oportunidades más, se dejó secar 5 minutos antes de colocar los discos

Se colocó los discos con una pinza anatómica estéril sobre el agar Mueller y se los presionó suavemente para permitir su adherencia al agar de manera adecuada, se los ubicó en la placa a 15 mm del borde de la misma, se utilizaron cajas Petri de 90 mm y se ubicaron 4 discos impregnados en cada placa con 5 repeticiones por placa por cada una de las concentraciones al 20%, 40%, 60% y 80% del extracto de romero. Luego se colocó los discos en las placas y se incubó a 37°C en grupos no mayores a diez placas durante 24 horas completas y las placas se colocaron en forma invertida. Posteriormente se procedió a realizar la lectura de los antibiogramas y se lo hizo a través de la medición de los halos de inhibición con una regleta de medición que lo hará en milímetros. (Cockeril et al., 2011); (Cockeril et al., 2012); (Coyle et al., 2009).

- **Preparación de los discos de sensibilidad**

- a) Se adquirieron los discos de sensibilidad Antimicrobial susceptibility test marca OXOID del laboratorio Medibac.
- b) Mantenedos los discos en refrigeración para evitar su deterioro.
- c) Se esterilizó 10 cajas Petri por medio de luz ultravioleta para colocar los discos de sensibilidad Oxoid.
- d) Se ubicó los discos OXOID en cajas Petri esterilizadas para ser posteriormente impregnadas de las concentraciones detalladas en la investigación
- e) Con la ayuda de una pipeta se impregnó en los discos de sensibilidad las concentraciones de extracto de romero respectivas.
- f) Con las placas sembradas y los discos de sensibilidad preparados, se colocaron con una pinza estéril 4 discos de sensibilidad impregnados de las concentraciones conocidas del extracto de romero en cada placa. Asegurándonos que los discos contactaron perfectamente con la superficie del agar, para lo cual presionamos

ligeramente sobre la superficie del mismo a menos de 15 mm del borde de la placa, y distribuidos de forma adecuada para que no se produzca superposición de los halos de inhibición.

- g) Se incubó las placas invertidas (agar en la parte superior), en grupos no superiores a 5 placas, a 35°C en atmósfera aeróbica antes de que transcurran 15 minutos. Las placas se incubaron 16-18 horas (respetamos este parámetro, porque temperaturas menores pueden disminuir la velocidad del crecimiento del germen y la difusión del antibiótico dando halos irregulares difíciles de medir).
- h) Se midieron los halos de sensibilidad de la cepa bacteriana de *Escherichia coli* anteriormente sembradas en el agar MacConkey y los resultados se interpretaron según detalla la literatura como: Sensible (S), Intermedio o Moderadamente sensible (I) y Resistente (R). (Ceballos, 2000).

4.9. Procesamiento de la información

El procesamiento de la información se realizó mediante la medición de los halos de inhibición producidas por parte del extracto de romero en concentraciones al 20%, 40%, 60% y 80% sobre la cepa certificada, los mismos fueron tabulados y analizados en el programa INFOSTAT, posteriormente se obtuvo los resultados aceptando la hipótesis planteada.

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. RESULTADOS

5.1.1. Concentración mínima inhibitoria y Concentración bactericida mínima

La interacción entre las diluciones del extracto de romero y el crecimiento de la cepa mostró una actividad específica, así a incremento de la concentración menor turbidez reflejada en cada una de los tubos observados en la determinación de la Concentración Mínima inhibitoria, para la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 las concentraciones al 20% y 40% presentaron turbidez refiriendo que existe un crecimiento bacteriano positivo, mientras que al 60% y 80% no presentaron turbidez y por lo tanto no hubo presentación de inhibición del crecimiento bacteriano, y al ser sembrar en agar Mackonkey no hubo crecimiento de colonias de la cepa certificada, significando que ambas concentraciones tienen un efecto que corresponde a la mínima concentración que elimina el 99,9% del número original de bacterias (CMB) (Botana, Landoni, & Jiménez, 2002)

5.1.2. Halos de inhibición

Los halos de inhibición formados alrededor de los discos se midieron con la regla milimétrica Hiantibiotic ZoneScale de Himedia de las 20 repeticiones distribuidas en número de cuatro en las cinco cajas Petri, de cada uno de los extractos al 20%, 40%, 60% y 80%.

TABLA 2. PRUEBA DE TUKEY AL 5% DE SIGNIFICANCIA PARA LOS HALOS DE INHIBICIÓN

Variable	T0	T1	T2	T3	T4	C.V	E.E	P.Valor
Halos de Inhibición mm	0.0d	5.55c	6.80bc	9.10ab	10.90a	10.11	0.12	<0,0001

En la tabla 2 se observa que el tratamiento T4 y T3 mostraron significancia ($p < 0.0001$) y son estadísticamente iguales con (10,90 mm) y (9,10 mm) respectivamente, en relación al tratamiento T2 y T1 que también comparten rango de significación con (6,80 mm) y (5,55 mm) respectivamente. El coeficiente de variación es de 10,11%.

5.2. DISCUSIÓN

El extracto de romero utilizado para el desarrollo de esta investigación, fue de tipo oleoso y mostró resultados positivos al inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 in vitro, a una concentración del 80%, formando halos de inhibición bacteriano de 10,90 mm, al igual que (Solano, 2016) concluye en su tesis de pregrado que el extracto oleoso determinó halos de inhibición de 11,93 mm sobre la cepa certificada de *Streptococcus mutans*.

Marín, (2016) en su investigación manifiesta que el extracto acuoso de romero aplicado al 100% en una cepa de *Streptococcus mutans* no mostró un halo mayor a 6,15mm, al contrario el autor refiere que el extracto de romero más extracto de salvia mostró un halo de inhibición de 12,60mm; mientras que el resultado de ésta investigación que se desarrolló a partir del extracto de romero sin combinación con otra materia vegetal, aplicado en la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, si mostró actividad antimicrobiana al 80% de concentración, determinándose halos de inhibición de 10,90mm a las 24 horas de incubación a 37°C.

La dimensión de los halos de inhibición encontrados con el tratamiento T4 al 80% de extracto de romero fue de (10,90 mm), resultados similares los evidencia Solano et al., (2016) indicando que el extracto oleoso de romero produjo una media de 11,93 mm de halo de inhibición ($p < 0.001$), diferencia significativo al grupo control, además mostrando similitud con el efecto de la clorhexidina.

Los extractos acuosos de Salvia con Romero al 100% de concentración sobre el *Streptococcus mutans*, mostraron un halo de inhibición de 12.60mm a las 24 horas y de 15.40mm a las 48 horas, mientras que la acción bactericida del extracto acuoso de Salvia (*Salvia Officinalis*) al 100%, sobre el *Streptococcus mutans*, mostró un halo de inhibición de 12.45mm a las 24 horas y de 15.35mm a las 48 horas (Marín, 2016). El extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) utilizado en la presente investigación a la concentración de 60% mostró resultados similares con halos de inhibición de 9.10mm a las 24 horas de incubación, mientras que a la concentración de 80% los halos de inhibición fueron de 10.90mm a las 24 horas de incubación, siendo esta la concentración del extracto que no permitio que la bacteria se desarrolle.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES, BIBLIOGRAFÍA Y ANEXOS

6.1. CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto bactericida del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) in vitro sobre la cepa certificada de *Escherichia coli* ATCC 25922, presentando una inhibición de crecimiento bacteriano a concentraciones del 60% y 80%, mostrando efecto antimicrobiano.

Se determinó la Concentración mínima inhibitoria y Concentración bactericida mínima del crecimiento del extracto al 60% y 80% sobre la cepa certificada de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Presentó sensibilidad antimicrobiana en el T1 al 20% y T2 al 40% formando halos menores a 7 mm, mientras que el T3 al 60% presentó halos de 9,10 mm y el T4 al 80% de 10,90mm, concluyendo que el extracto presenta sensibilidad antimicrobiana a mayor concentración sobre la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Con los resultados obtenidos de la investigación se concluye que en la investigación existe una correlación directa que indica que, a mayor concentración de extracto de romero, mayor será el efecto antimicrobiano. Con el 0% de concentración no se formaron halos de inhibición. Con el 20% de concentración se formaron halos de 5,55mm. Con el 40% de concentración se formaron halos de 6,80mm. Con el 60% de concentración se formaron halos de 9,10mm y con el 80% de concentración se formaron halos de 10,90mm.

6.2. BIBLIOGRAFÍA

- Acha, B. (2011). Bacteriosis, infecciones debidas a E.coli enterotoxígena, enteroinvasiva y enterohemorrágica. In *Bacteriosis* (p. 10).
- Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., & Fernández, G. (2001). Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. *Anales de La Facultad de Medicina*. <https://doi.org/10.15381/anales.v62i2.4167>
- Ardilla, M., & Vargas, A. (2009). Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia Caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* Y *Thymus vulgaris* FRENTE A *Clostridium perfringens*. *Biosalud*, 8, 47–57.
- Asamblea Nacional. (2010). Ley Organica del Regimen de la Soberania Alimentaria. *Fernando Cordero Cueva, Francisco Vergara*, 13.
- Botana, L., Landoni, F., & Jiménez, T. (2002). *Farmacología y Terapéutica Veterinaria* (1st ed.). Madrid: McGRAW HILL Interamericana.
- Castaño, H. I., Ciro, G., Zapata, J. E., & Jimenez, S. L. (2010). Actividad bactericida del extracto etanolico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interes alimentario. *Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 17, 149–154. Retrieved from <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewFile/6334/5835>
- Ciro, G., Zapata, J., & Jiménez, S. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interes alimentario baatericidal, 17, 154.
- Cockeril, F., Wikler, M., Bush, K., Dudley, M., Eliopoulos, G., Hardy, D., ... Swenson, J. (2011). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standars Institute - NCCLS* (Vol. 31).
- Cockeril, F., Wikler, M., Bush, K., Dudley, M., Eliopoulos, G., Hardy, D., ... Swenson, J. (2012). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Clinical and Laboratory Standars Institute - NCCLS* (Vol. 32). <https://doi.org/M02-A11>
- Coyle, M., Cavalieri, S. J., Harberk, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., ... Spiegel, C. a. (2009). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiano*.
- Dominguez X. (2009). Destilacion por arrastre de vapor, características, ventajas y aplicaciones. In *Química orgánica* (p. 8).
- Estrada, S. (2010). *Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos romero (Rosmarinus officinalis) y tomillo (Thymus vulgaris)*. Tesis de Grado, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.
- Flores, M. (2013). Uso de medios en placa. *Brain Heart Infusion (BHI) Agar*, (April), 24–26.

- Garro, O., & Okulik, N. (2006). Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides . *Facultad de Agroindustria UNNE, 1(E-057)*, 1–4.
- Lara, E., & Itza, M. (2011). www.medigraphic.org.mx. *Harina de Plantas Aromáticas Como Promotores Del Crecimiento En Pollos de Engorda, 1(1)*, 9–15.
- Lax, V. (2014). *Estudio de variabilidad química, propiedades antioxidantes y biocidas de poblaciones espontaneas de Rosmarinus officinalis*. Universidad de Murcia.
- Lemes, C., & Rodriguez, C. (2001). Multiplicación vegetativa de *Rosmarinus officinalis* L.(romero). *Revista Cubana de ...*, (3), 79–82. Retrieved from http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962001000300001&script=sci_arttext
- Lemus, L. (2015). Determinacion de la concentracion minima inhibitoria de extractos de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. *Quimica Y Farmacia*, 143.
- Marín, G. (2016). “Efectividad del extracto acuoso de salvia, romero y de salvia-romero al 100% como bactericida sobre el *Streptococcus mutans*. ”Estudio microbiologico in vitro". *Universidad Central Del Ecuador*, 76.
- Martinez, A. (2009). Aceites esenciales. In *Aceites Esenciales* (p. 35). Medellin: Universidad de Antioquia.
- Pachón, D. (2009). *Aislamiento, identificacion y serotipificacion de enterobacterias del género Salmonella en una poblacion de Crocodylus intermedius*.
- Purca, T. (2013). Efectividad antibacteriana “ in vitro ” del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival, 97.
- Ramos, A. Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales e hidrosoles de *Rosmarinus officinalis* y *Taraxacum officinale* frente a microorganismos patógenos (2014). Retrieved from <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/11850%5Cnhttp://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/11850/1/RamosPencueAdrianaMarcela2014.pdf>
- Rondón, R. (2013). *Evaluación antimicrobiana in vitro del aceite esencial de Rosmarinus officinalis* L. “romero” frente a bacterias patógenas Grampositivas y Gramnegativas. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna.
- Solano, X. (2016). “Inhibición de crecimiento bacteriano in vitro de *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de romero (*rosmarinus officinalis*), aplicando la técnica microbiológica de difusión en disco .” *Universidad Central Del Ecuador*, 105.
- Sosa, R., & Navarro, A. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis*): Una revisión de sus usos no culinarios. *Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.*, 52(222), 23–36.
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacteriología Y Virología Médica*, (Cim), 663–672. Retrieved from <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>
- Vidal-Graniél, J. E. (2003). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea. *Salud En Tabasco*, 9(1), 188–193. Retrieved from

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48709108>

Yarnell, E., Ventola, C. L., Vahlensieck, W., Perepanova, T., Bjerklund Johansen, T. E., Tenke, P., ... Jimenez-Ferrer, E. (2006). Fitoterapia na actualidade, Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. *Plantas E Produtos Vegetais Em Fitoterapia*. <https://doi.org/10.3390/ijms160818396>

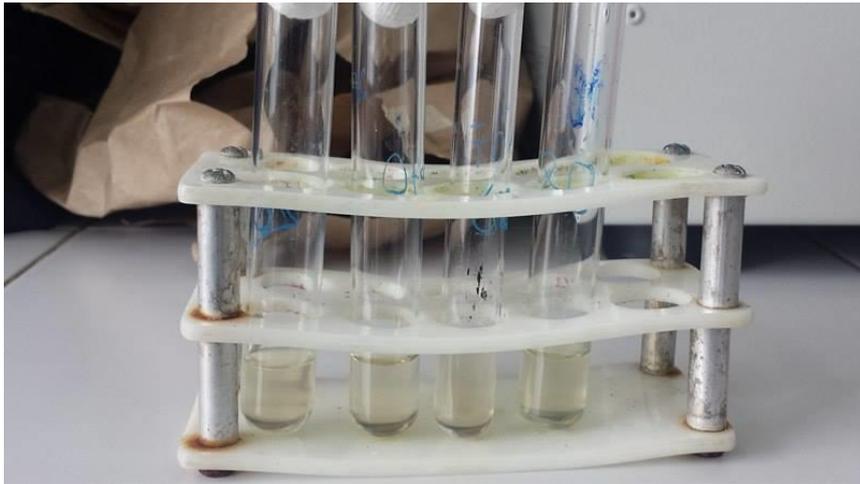
6.3. ANEXOS



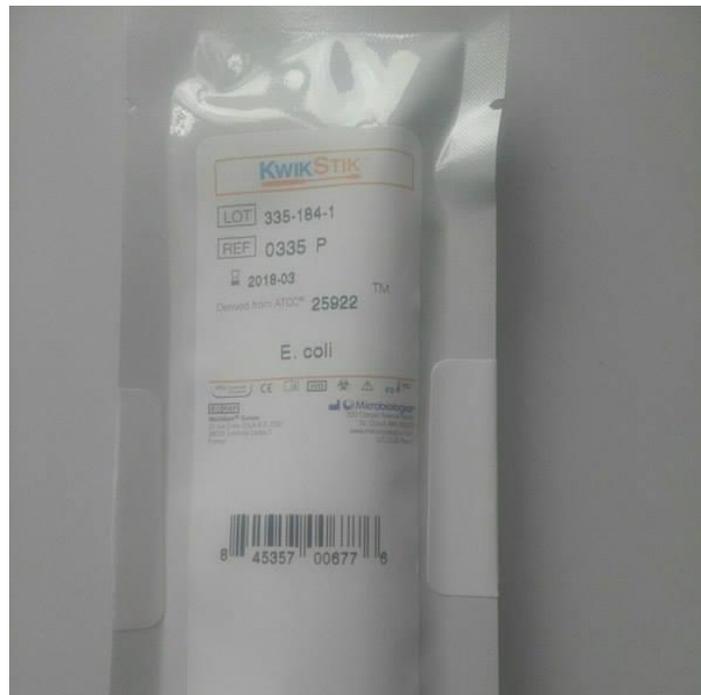
Anexo 1. Obtención del extracto de romero por el método de destilación por arrastre de vapor.



Anexo 2. Siembra de la bacteria en Agar MacConkey mediante estriación



Anexo 3. Concentraciones de extracto de romero 20%, 40% 60% y 80%



Anexo 4. Cepa certificada de *Escherichia coli* ATCC 25922



Anexo 5. Distribución de los discos de sensibilidad con concentraciones de Extracto de romero sobre el agar Mueller Hinton



Anexo 6. Incubación de las placas durante 24 horas

Anexo 7. Diámetro de los halos de inhibición de *Escherichia coli* ATCC 25922

TRATAMIENTOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
	mm																			
T0 0%	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T1 20%	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	0	0	6,0	11,0	0	6,0	0	11,0	0	6,0	0	11,0	10,0	0	0
T2 40%	10,0	10,0	10,0	0	10,0	10,0	0	0	12,0	11,0	11,0	6,0	10,0	6,0	6,0	0	6,0	6,0	6,0	6,0
T3 60%	10,0	10,0	8,0	8,0	10,0	10,0	8,0	8,0	10,0	10,0	10,0	8,0	10,0	8,0	8,0	8,0	11,0	11,0	8,0	8,0
T4 80%	13,0	12,0	10,0	10,0	11,0	11,0	11,0	11,0	12,0	11,0	10,0	10,0	12,0	11,0	10,0	11,0	10,0	10,0	11,0	11,0

Anexo 8. Análisis de varianza de los halos de inhibición

Esquema ADEVA

F de V	G.L	
Tratamientos	4	$T = (r - 1)$ en donde r = repeticiones
Error experimental	95	$t(r - 1)$ 5(5-1)
TOTAL	99	

TABLA 3. CONCENTRACIONES Y DILUCIONES DEL EXTRACTO DE ROMERO

SUSTANCIA	CONCENTRACIONES				
	0%	20%	40%	60%	80%
Etanol al 99,8%	5ml	4ml	3ml	2ml	1ml
Extracto de romero	0ml	1ml	2ml	3ml	4ml

Cada concentración se calculó para un volumen de 5ml, fueron colocadas en tubos de ensayo y almacenadas en refrigeración para mantener la muestra.

TABLA 4. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria a diferentes diluciones de extracto de romero.

Cepa Certificada	Diluciones del extracto de romero				Control negativo Etanol 99.8%
	20%	40%	60%	80%	
Crecimiento					
<i>E. coli</i>	+	+	-	-	+

TABLA 5. Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HALOS INHIBICIÓN TRANS	25	0,93	0,92	10,11

CAPÍTULO VII

PROPUESTA

Aplicar las concentraciones de extracto de romero (*rosmarinus officinalis*) al 60% y 80% que fueron las dosis que inhibieron el crecimiento de *E.coli* en la formulación para balanceado de aves.

7.1. DATOS INFORMATIVOS

Las personas involucradas en mi propuesta son los pequeños y grandes productores; y avicultores de la provincia

7.2. ANTECEDENTES DE LA PROPUESTA

Hay diversos métodos para la obtención de extractos de plantas, pueden ser obtenidos por destilación alcohólica, maceración o por arrastre de vapor, todos estos procesos conservan las propiedades de los extractos.

Corroborando los resultados de mi investigación, obtuve que el extracto de romero a concentraciones de 60% y 80% inhibió el crecimiento de *Escherichia coli* que son responsables de altos porcentajes de mortalidad y pérdidas económicas para los avicultores, por lo que se puede usar como una alternativa en el tratamiento y/o prevención de enfermedades evitando de esta manera el uso indiscriminado de antibióticos que afectan la salud humana.

7.3. JUSTIFICACIÓN

La adición del extracto de romero en el balanceado para pollos tiene como fin brindar a los avicultores una alternativa al uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades producidas por *E.coli*, ya que así evitaríamos la administración de antibióticos en las aves

y reduciríamos el costo de producción, mejorando la calidad de vida de las aves y brindando productos garantizados a nuestros clientes.

7.4. OBJETIVOS

- Reducir la incidencia de *E.coli* en las explotaciones avícolas de la provincia.
- Adicionar a las dietas balanceadas, extracto de romero de acuerdo a las concentraciones establecidas.

7.5. ANALISIS DE FACTIBILIDAD

La materia prima es decir el romero, lo podemos encontrar en los mercados del país sin ningún tipo de restricción y su precio esta al alcance de los pequeños productores. Para la obtención del extracto se realizan métodos completamente sencillos y factibles, de esta manera se puede usar en la alimentación animal para tratar enfermedades bacterianas y evitar el uso de antibióticos en los productos.

7.6. FUNDAMENTACIÓN

La presencia e incidencia de enfermedades de origen bacteriano han provocado grandes pérdidas para los productores sea al administrar antibióticos en el tratamiento o incluso por la alta mortalidad que causa.

Para esto se debe tener mayor conocimiento en la fitoterapia como alternativa al uso de antibióticos mejorando la producción y obteniendo animales de calidad para el consumo humano.

La adición de extracto de romero en la dieta ayudara a evitar la presencia de bacterias que afectan nuestra producción, y no creara resistencia como lo hacen los antibióticos.

7.7. METODOLOGÍA, MODELO OPERATIVO

Fomentar la utilización de extractos de plantas en la formulación de balanceado con el fin de combatir y/o prevenir las enfermedades causadas por *Escherichia coli*.

7.8. ADMINISTRACIÓN

Docentes y estudiantes de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato llevaran a cabo la realización de esta propuesta con el fin de brindar a los avicultores la capacitación adecuada en el uso del extracto obtenido mediante el romero en la producción y tratamiento de las aves.

7.9. PREVISIÓN DE LA EVALUACIÓN

La realización de esta propuesta permitirá a los avicultores mejorar la salud de sus aves, implementando el uso del extracto de romero para así obtener una producción de calidad y a la vez reducir los costos de producción.