



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS AMBIENTALES Y VETERINARIA**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE INGENIERO ZOOTECNISTA**

**“EFICACIA DEL EXTRACTO DE TOMILLO (*Thymus vulgaris*) COMO
ALTERNATIVA NATURAL AL USO DE ANTIBIÓTICOS Y SU
EFECTIVIDAD CONTRA LA BACTERIA *Escherichia coli* PRESENTE EN
ANIMALES DE INTERÉS ZOOTÉCNICO”**

KARLA ANTONELA BASTIDAS HUGO

TUTOR: Mgs. MARIA FERNANDA LOPEZ FIORES

IBARRA – ECUADOR

Marzo, 2026

Ibarra, : 02 / 03 / 2026

CERTIFICACIÓN TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de integración curricular titulado: “*Eficacia del extracto de tomillo (Thymus vulgaris) como alternativa natural al uso de antibióticos y su efectividad contra la bacteria Escherichia coli presente en animales de interés zootécnico*”, presentado por el estudiante **Karla Antonela Bastidas Hugo** con cédula de ciudadanía N° __1752882140__, para obtener el Título de Ingeniera Zootecnista.

Certifico que el trabajo cumple con todos los parámetros establecidos, mediante el cual el estudiante demuestra el desarrollo de competencias en el campo de conocimiento de su profesión con un nivel de argumentación coherente, para ser sometido a la evaluación por parte de los lectores.



FIRMA



Mgs. María Fernanda López Flores
C.I. 1002509600
FECHA: 02 / 03 / 2026

PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El tribunal examinador, aprueba el presente trabajo en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra:



(f):

Mgs. Maria Fernanda Lopez Flores

C.C.: 1002509600



(f):.....

Msc. Haro Bedon Luis Humberto

C.C.:1002739389



(f):.....

Dra. Yadira Fernanda Ordoñez Vivanco

C.C.: 1103764864

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, *Karla Antonela Bastidas Hugo*, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones a título gratuito y oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, _09 de marzo 2026_



(f): _____

Karla Antonela Bastidas Hugo

C.C.: 1752882140

AUTORIA

Yo, *Karla Antonela Bastidas Hugo*, portadora de la cédula de ciudadanía N° 1752882140, declaro que la presente trabajo de investigación es de total responsabilidad de la autora, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.



(f):.....

Karla Antonela Bastidas Hugo

C.C.: 1752882140

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Este trabajo representa más que una sola investigación, es el reflejo de años de esfuerzo , sacrificio y amor hacia esta carrera.

Agradezco la PUCE-I por abrirme sus puertas y me proporciono de una beca para permitirme formarme como profesional y persona.

A mis padres, Hernan Bastidas y Mirian Hugo, quienes han sido el pilar fundamental en mi vida. Gracias por darme la oportunidad de estudiar, por su trabajo constante y por creer en mi incluso cuando se me presentaba la duda y por la paciencia que me han brindado en esta etapa de mi vida.

A mis abuelos, German Bastidas y Clara Chamorro quienes han estado pendientes de mi, me han brindado sus consejos y amor . A mi tío Andrés Bastidas por su apoyo constante en mis estudios, por cada palabra de ánimo y por impulsarme a no rendirme. A mis maestros, Mgs. María Fernanda López Mgs. Valdemar Andrade por su guía académica paciencia y compromiso durante este proceso gracias por compartir su conocimiento y acompañarme en cada etapa de este trabajo.

A mi mejor amiga Bella Luz Jacome que siempre me brindo su compañía, me dio aliento en los momentos difíciles, estuvo pendiente de mis logros y los celebro conmigo. A mis amigos y compañeros de carrera, quienes hicieron de este camino una experiencia inolvidable en especial a mis compañeros de Zootecnia, y con un profundo cariño Melani Morales, Jorge Rivera y Carlos Piñalosa gracias por las risas, el apoyo las largas jornadas académicas y por demostrar que el compañerismo verdadero sí existe.

Agradecer también a mi gata Mili, aquel fiel ser que me acompañó cada noche de desvelo, en cada trabajo terminado al amanecer, y cada momento de estrés y frustración. Gracias por tu silenciosa compañía y por hacer más llevadero este proceso.

Este logro se los dedico a todos ustedes porque:

“Aprender en compañía hace más ligero el camino y más grande el logro”

Karla Antonela Bastidas Hugo

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN TUTOR	ii
PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iii
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS	iv
AUTORIA	v
DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
CAPÍTULO I	11
INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO II	14
2. OBJETIVOS:	14
2.1 Objetivo general:	14
2.2 Objetivos específicos:	14
2.3 Hipótesis	14
CAPÍTULO III	15
ESTADO DEL ARTE.....	15
3.1 Uso de Antibióticos Relación con la Producción Zootécnica	15
3.2 El Uso de Extractos Naturales Como Alternativa de Tratamiento	16
3.2.1 Propiedades Antimicrobianas Del Tomillo.	16
3.2.2 Despolarización de la membrana celular:	16
3.2.3 Uso de Otras Alternativas Para el Sustituto de Antibióticos en la Producción Animal. 19	
3.3 Método de Diseminación de la <i>Escherichia coli</i> en Zonas Productoras.....	20
3.3.1 Transmisión por vía Fecal-Oral	20
3.4 Protocolos Aplicados en Investigaciones Previas.....	21
3.4.1 Obtención del extracto	21
3.4.2 Medio de cultivo	22
3.4.3 Estandarización del inóculo	22
3.4.4 Medición de los Halos de Inhibición.....	22

3.5	Importancia de la dosificación de medicamentos naturales en la producción animal.	23
CAPÍTULO IV		25
METODOLOGÍA:.....		25
4.1	Delimitación espacial.....	25
4.2	Variables.	26
4.3	Análisis Estadístico.....	27
4.3.1	Repeticiones.	29
4.3.2	Unidades experimentales.....	29
4.3.3	Análisis funcional.....	29
4.4	Tipo de estudio	29
4.5	Metodología de investigación	30
4.6	Obtención del extracto:.....	30
4.7	Preparación de cultivo y siembra bacteriana	32
4.8	Preparación y distribución de los tratamientos	33
4.9	Protocolo de manejo del extracto.....	34
4.10	MATERIALES.....	34
4.10.1	Materiales biológicos:	34
4.10.2	Materiales de laboratorio:.....	35
4.10.3	Equipos complementarios:.....	35
CAPÍTULO V		37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		37
5.1	Cultivo Bacteriano y comportamiento del halo de inhibición.....	37
5.2	Análisis estadístico.....	38
5.2.1	Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza.....	38
5.2.2	Análisis de varianza (ANOVA) para el diámetro del halo de inhibición (mm) 38	
5.2.3	Comparación de Medias mediante la Prueba Tukey.....	39
5.2.4	Análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de inhibición relativa (PRI,%) 41	
5.2.5	Comparación múltiple del PRI (%).....	42
5.3	Persistencia del efecto antibacteriano del tomillo a las 24-48 horas	43
5.4	Dosificación por estudios in-vivo en animales de producción según búsqueda bibliográfica.	47
5.4.1	Consideraciones generales del extracto etanólico concentrado:	49

5.5	Discusión.....	49
5.5.1	Confiabilidad y varianza experimental	49
5.5.2	Comportamiento general de los tratamientos evaluados	50
5.5.3	Gestión de bioseguridad y disposición final de material contaminado	50
5.6	Discusión de los resultados obtenidos	51
5.7	Comparación del extracto de tomillo frente a los antibióticos.....	51
5.8	Comparaciones con investigaciones similares	52
	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
	BIBLIOGRAFÍA.....	55
	ANEXOS.....	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ubicación geográfica del laboratorio de microbiología	25
Tabla 2. Esquema De Distribución.....	28
Tabla 3. Esquema Del ANOVA	28
Tabla 4. Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza	38
Tabla 5. Análisis De Varianza ANOVA Del Dímetro De Inhibición	39
Tabla 6. Análisis de varianza de la variable PIR.....	41
Tabla 7. Dosis recomendada del extracto etanólico	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del timol y del carvacrol	17
Figura 2. Resistencia antimicrobiana de origen animal y humano.....	19
Figura 3. Ubicación geográfica del laboratorio	26
Figura 4. Estandarización del inóculo bacteriano.....	33
Figura 5. Placas con cultivo con tratamiento y sin tratamiento.....	37
Figura 6. Prueba de Tukey al 5% del tamaño del halo de inhibición	40
Figura 7. Porcentaje de inhibición relativa (PIR) por tratamiento	42
Figura 8. Crecimiento del halo de inhibición por tiempo a las 24 y 48 horas	44
Figura 9. Comparación de halos de inhibición	45
Figura 10. Prueba de etanol	47

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos representa una de las mayores amenazas para la salud pública global, impulsada por el uso indiscriminado de antibióticos en la producción animal. Esta investigación evaluó la eficiencia del extracto etanólico de tomillo (*Thymus vulgaris*) como alternativa natural frente a patógenos como la *Escherichia coli*. Se empleó un diseño descriptivo y comparativo mediante un ensayo in vitro con cinco repeticiones por tratamiento. La metodología consistió en el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) utilizando agar Muller-Hinton, estandarizando el inóculo bacteriano. Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) para validar la significancia de los datos. Las variables evaluadas incluyeron el diámetro del halo de inhibición (mm) y el porcentaje de inhibición relativa (PIR). El mejor resultado obtenido fue el de la concentración del tomillo al 100% y 75%, alcanzando el halo de inhibición promedio de 31,72 mm y 25,774 mm con un PIR del 96,26% y 81,627%, superando significativamente a los antibióticos comerciales evaluados entre estos del grupo de tetraciclinas (Tetraciclina y Oxitetraciclina), cuyos halos no excedieron los 6,74 mm. Se concluye que el extracto de *Thymus vulgaris* posee una actividad bactericida superior a las tetraciclinas convencionales, posicionándose como un fitobiótico viable y eficiente para reducir la dependencia de fármacos sintéticos en la zootecnia.

Palabras clave: Resistencia antimicrobiana, Fitoterapia, Inhibición bacteriana, Extractos vegetales, bactericida, Zootecnia.

ABSTRACT

Antibiotic resistance represents one of the greatest threats to global public health, driven by the indiscriminate use of antibiotics in animal production. This research evaluated the efficacy of ethanolic extract of thyme (*Thymus vulgaris*) as a natural alternative against pathogens such as *Escherichia coli*. A descriptive and comparative design was used, employing an in vitro assay with five replicates per treatment. The methodology consisted of the disk diffusion method (Kirby-Bauer) using Muller-Hinton agar, with standardized bacterial inoculum. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test for mean comparison ($p < 0.05$) were applied to validate the significance of the data. The variables evaluated included the diameter of the inhibition zone (mm) and the percentage of relative inhibition (PRI). The best results were obtained with the thyme concentrations of 100% and 75%, achieving an average inhibition zone of 31.72 mm and a PIR of 96.26%, significantly outperforming the commercial antibiotics evaluated, whose inhibition zones did not exceed 6.74 mm. It is concluded that the extract of *Thymus vulgaris* possesses bactericidal activity superior to conventional tetracyclines, positioning itself as a viable and efficient phytobiotic for reducing dependence on synthetic drugs in animal husbandry.

Keywords: Antimicrobial resistance, Phytotherapy, Bacterial inhibition, Plant extracts, Bactericidal, Animal husbandry.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es reconocida como una de las 10 principales amenazas para la salud pública a nivel mundial según la (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2021), con proyecciones de millones de muertes anualmente si no se interviene correctamente, se prevé que las personas lleguen a consumir 131,109 toneladas anuales de residuos antibióticos y que puede llegar a alcanzar las 200,235 toneladas para el 2030 (Malik, 2023; Senasica, 2023). Este fenómeno se ve agravado por el uso excesivo e indiscriminado de los antibióticos en la producción animal, tanto con fines terapéuticos como para la suplementación para el crecimiento, facilitando la evolución de la cepas bacterianas resistentes que se transmiten a los humanos a través de la cadena alimentaria o medio ambiente como se refleja en la *Escherichia coli* (Piña et al., 2021).

En el Ecuador esta problemática se refleja en hallazgos donde se logra evidenciar la falta de control en los periodos de retiro del medicamento, lo que resulta en residuos farmacológicos en productos cárnicos y lácteos, pero la información sistémica y estadística sobre el control el manejo de los antibióticos en animales de producción es limitada y fragmentada, lo que genera un vacío en los conocimientos que impide la implementación de la política de salud pública efectiva (Calvopiña Montenegro, 2024). Ejemplo: algunos estudios incluso han confirmado la presencia de *E. coli* con genes de resistencia en muestras fecales de bovinos, los cuales actúan como huéspedes bacterianos que pasan a los alimentos de consumo diario (Bingshen Liu, 2025).

En este contexto, se ha intensificado la búsqueda de alternativas naturales como las plantas medicinales para reemplazar el uso de antibióticos convencionales (Mohsenzadeh, 2007). Lo que ha cobrado interés por sus propiedades antimicrobianas, antioxidantes y promotoras de la salud animal, como una necesidad urgente para evaluar alternativas que permitan asegurar la inocuidad alimentaria y la sostenibilidad del sector pecuario (Rivera et al., 2023).

El desarrollo de esta investigación contribuirá significativamente a la literatura científica al proporcionar el resultado de la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana del *Thymus vulgaris* y sus compuestos fenólicos (timol y el carvacrol) contra *E. coli* (Rivera et al, 2023). Los resultados evidenciaron que el extracto vegetal constituye una alternativa más sostenible y accesible para los productores, contribuyendo al fortalecimiento de la sanidad animal y el uso responsable de los recursos naturales (Ahangaran, 2021). Para que posteriormente, los resultados de esta investigación puedan servir como base para ensayos fitoterapéuticos aplicados para las producciones zootécnicas.

La búsqueda de extractos vegetales, como el Tomillo, se alineó con el enfoque internacional de “One Health”, promovido por la OMS y la Organización Mundial de la Salud Animal (OMSA), que busca equilibrar la salud humana, animal y ambiental (OIE, 2016). Los objetivos que abarca esta investigación, dentro del Objetivo Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda del 2030. Contribuyen principalmente al Objetivo 3: salud y bienestar que propone “Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos” al ofrecer una alternativa que reduce la aparición y la transmisión de superbacterias, mejorando la seguridad alimentaria en la calidad de los productos de origen animal (Organización de las Naciones Unidas [ONU], 2020). Al igual que el Objetivo 12: Producción y consumo responsable que busca “Garantizar modalidades de consumo y producción sostenible”, al proponer un modelo de producción más ecológica y accesible para pequeños productores minimizando la dependencia de los antibióticos químicos y promoviendo la eficiencia de los recursos naturales (ONU, 2020).

La presente investigación se estructura en cinco capítulos que detallan el proceso de evaluación del extracto del tomillo. En el Capítulo I se presenta la introducción y comprende el planteamiento del problema sobre la resistencia antimicrobiana. El capítulo II establece los objetivos y la hipótesis del trabajo orientada a la inhibición de *Escherichia coli*. En el capítulo III se desarrolla el estado del arte, donde se aborda el uso de antibióticos en la producción zootécnica, la resistencia antimicrobiana, las propiedades antibióticas del tomillo, los mecanismos de acción frente a los patógenos y los protocolos empleados en las investigaciones previas. El capítulo IV describe la metodología aplicada, incluyendo el diseño experimental y los protocolos de laboratorio. Finalmente, el capítulo V presenta los resultados y la discusión de los resultados del ensayo *in vitro*,

comparando la eficacia del extracto de tomillo frente a antibióticos comerciales, en el apartado final exponemos las conclusiones donde se valida la eficacia del extracto como alternativa natural.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS:

2.1 Objetivo general:

Determinar la eficacia del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) en la inhibición del crecimiento de las cepas de *Escherichia coli*, mediante un ensayo in vitro con diferentes concentraciones como alternativa natural, orientada a reducir el uso de antibióticos asociados a la resistencia antimicrobiana en la producción animal.

2.2 Objetivos específicos:

1. Evaluar la eficiencia de los extractos de tomillo (*Thymus vulgaris*) con métodos estandarizados de extracción, expresando su concentración en porcentaje (%), para cuantificar la eficiencia de los mismos.
2. Comparar la eficacia antimicrobiana del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) frente a antibióticos de amplio espectro para determinar el más eficiente en la inhibición de *Escherichia coli*.
3. Elaborar una propuesta de manejo para el extracto con mayor eficiencia, considerando dosificación, frecuencia de uso y farmacocinética en animales mayores y menores.

2.3 Hipótesis

H₀: Las diferentes concentraciones del extracto de *Thymus vulgaris* no generan diferencias significativas en el diámetro del halo de inhibición en (mm) ni en el porcentaje de inhibición relativa (PRI) frente a la *Escherichia coli* de forma in vitro.

H_a: Las diferentes concentraciones del extracto de *Thymus vulgaris* generan diferencias significativas en el diámetro del halo de inhibición (mm) y/o en el porcentaje de inhibición relativa (PIR) frente a *Escherichia coli* en condiciones in vitro.

CAPÍTULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1 Uso de Antibióticos Relación con la Producción Zootécnica

La producción zootécnica tiene como objetivo maximizar la eficiencia en la producción de carne, leche, huevos, y otros derivados animales (Organización mundial de Sanidad Animal [OMSA], 2023). Uno de los mayores desafíos en este campo es el control de infecciones bacterianas, que pueden afectar gravemente la salud y el rendimiento de los animales (OMSA, 2023). Para mitigar este riesgo, se han utilizado antibióticos sintéticos en la cría intensiva de animales, tanto como tratamiento curativo como preventivo (Boto, 2020). Sin embargo, el uso extendido de antibióticos ha provocado problemas serios, como la resistencia bacteriana, que representa una amenaza tanto para la salud animal como humana (Boto, 2020).

El uso de antibióticos en la ganadería no solo se ha limitado al tratamiento de enfermedades sino que también a su empleo como promotores de crecimiento en la alimentación animal (Rodríguez, 2020). Sin embargo, su aplicación inadecuada ha favorecido la aparición de nuevas cepas resistentes como la *Escherichia coli*, dificultando el tratamiento de infecciones y aumentando el riesgo de transmisión de resistencia a través de los productos de origen animal destinados al consumo humano (Boto, 2020).

Basándonos en la opinión de Ramírez (2022), el uso intensivo de antibióticos de amplio espectro afecta la microbiota natural de los animales, eliminando bacterias benéficas y reduciendo las defensas naturales del organismo. Como respuesta, la industria farmacéutica ha desarrollado antibióticos cada vez más potentes, lo que agrava el ciclo de resistencia bacteriana (Ramírez, 2022)

Después de décadas usando antibióticos sintéticos, se ha notado que en muchos de los casos los animales presentan resistencia a ciertos productos lo que ha llevado a incurrir en el uso de plantas para el tratamiento de ciertas enfermedades bacterianas como la *Escherichia coli*; demostrado que algunos extractos naturales pueden estimular el sistema inmunológico de los animales, mejorar la digestión y promover un crecimiento

más eficiente, además que ayuda al aumento de defensas en el cuerpo de los animales (Porras, 2022)

3.2 El Uso de Extractos Naturales Como Alternativa de Tratamiento

En este contexto, los extractos de plantas medicinales, como el tomillo (*Thymus vulgaris*), han emergido como una alternativa potencial a los antibióticos convencionales. Estas plantas contienen compuestos bioactivos que pueden tener efectos antimicrobianos, antioxidantes y antiinflamatorios (Álvarez, 2020). Investigaciones como la de Morales Castro (2015), han demostrado que algunos aceites esenciales de plantas, como el aceite esencial de tomillo, tienen propiedades antibacterianas que podrían ser útiles en la lucha contra bacterias patógenas en la producción animal

El extracto de tomillo en la alimentación de animales se puede tomar como una alternativa ecológica y de bajo costo, siendo usado para la mejora de la salud intestinal en aves, porcinos y ganado, usando dosis específicas para cada especie (Morales Castro, 2015). Esto representa un verdadero desafío en el uso ya que la composición de la planta también depende de la situación geográfica en donde es cultivada, recomendando investigaciones in vivo para conocer de primera mano su eficacia a largo plazo en diferentes animales (Morales Castro, 2015).

3.2.1 Propiedades Antimicrobianas Del Tomillo.

El tomillo que viene de la familia *Lamiaceae* tiene propiedades conocidas en la medicina tradicional pues contiene compuestos como timol y carvacrol, bien conocidas como antimicrobianas (Majid Gholami-Ahangaran, 2019). Estos compuestos pueden inhibir el crecimiento de bacterias como *E. coli*, actuando sobre la membrana celular bacteriana, alterando su permeabilidad provocando que la homeostasis celular no exista y causando la alteración del metabolismo vital de las células provocando la muerte de la bacteria. (Majid Gholami-Ahangaran, 2019)

3.2.2 Despolarización de la membrana celular:

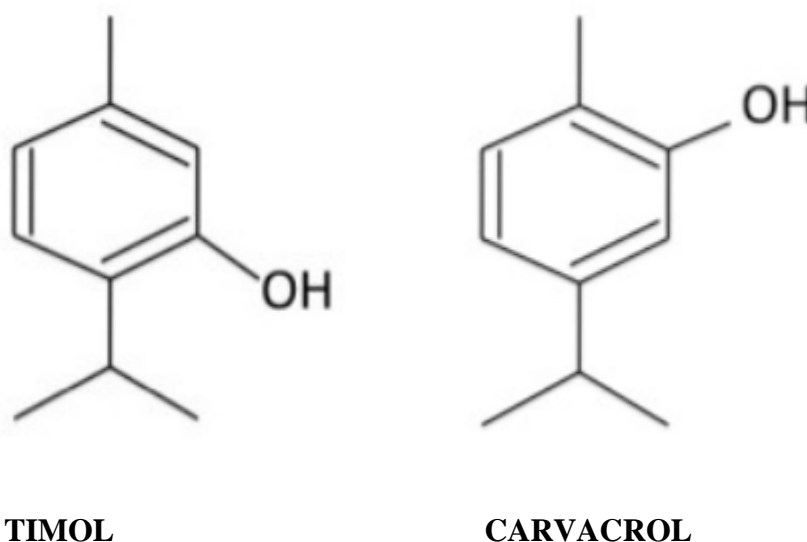
Según Marín (2020), el “Timol” induce la despolarización de la membrana bacteriana. Esto interfiere con la capacidad de la célula para mantener un gradiente electroquímico de protones, esencial para la producción de energía a través de la

fosforilación oxidativa. Esta alteración afecta gravemente la producción de ATP, la fuente principal de energía celular (Marín, 2020).

El carvacrol y el timol son isómeros fenólicos monoterpénicos, compuestos mayoritarios del aceite esencial del tomillo (*Thymus vulgaris*), los cuales se sintetizan a través de la ruta del mevalonato (intermediario metabólico que biosintetiza el colesterol, esteroides e isoprenoides), teniendo como precursores directos al γ -terpineno y al p-cimeno. Su actividad biológica radica principalmente en el grupo hidroxilo (-OH) de su anillo fenólico, lo que les confiere propiedades hidrofóbicas u capacidad de transporte de protones (Zhai, 2018).

Figura 1.

Estructura química del timol y del carvacrol



Nota. Estructura química del timol y el carvacrol. Adaptado de *Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos*, por García-García, (2008).

Ambos monoterpénicos presentan elevada actividad antimicrobiana, antioxidante e inmunomodulador en animales como aves, porcinos, bovinos y otros rumiantes (Caneschi, 2023). El carvacrol, gracias a su naturaleza hidrofóbica de le facilita el integrarse en la bicapa lipídica de la membrana de la bacteria, lo que provoca un aumento en la permeabilidad pasiva (capacidad de la membrana celular de dar paso a diversas

sustancias sin consumir energía), lo que provoca fuga de iones esenciales como K^+ y pérdida de proteínas intracelulares, además de inhibir la bomba de H^+ -ATPasa (o bomba de protones es una enzima que utiliza la hidrólisis del ATP para bombear iones de H^+ a través de la membrana) induciendo a un agotamiento metabólico, motilidad por alteración de flagelos y muerte celular (Adam Kowalczyk et al 2020).

En animales monogástricos como porcinos y aves, estos compuestos se administran por vía oral a través del alimento o el agua de bebida, resistiendo en gran medida la degradación gástrica. En el intestino delgado de emulsificante con las sales biliares y se absorbe entre 70-90% por difusión pasiva hacia el plasma, el cual se metaboliza en el hígado por acción enzimática del citocromo P450 mediante la hidroxilación, se excreta por vía renal y biliar (Zhai, 2018).

En rumiantes, la biodisponibilidad se da de manera post-ruminal se estima que alrededor del 20-50%, con una accesibilidad aproximada al 50% tras el metabolismo ruminal, observándose además con modificaciones en el perfil fermentativo con incremento de ácidos grasos volátiles como el propionato y reducción relativa del acetato, lo que contribuye a mejorar la eficiencia alimentaria (Caneschi, 2023).

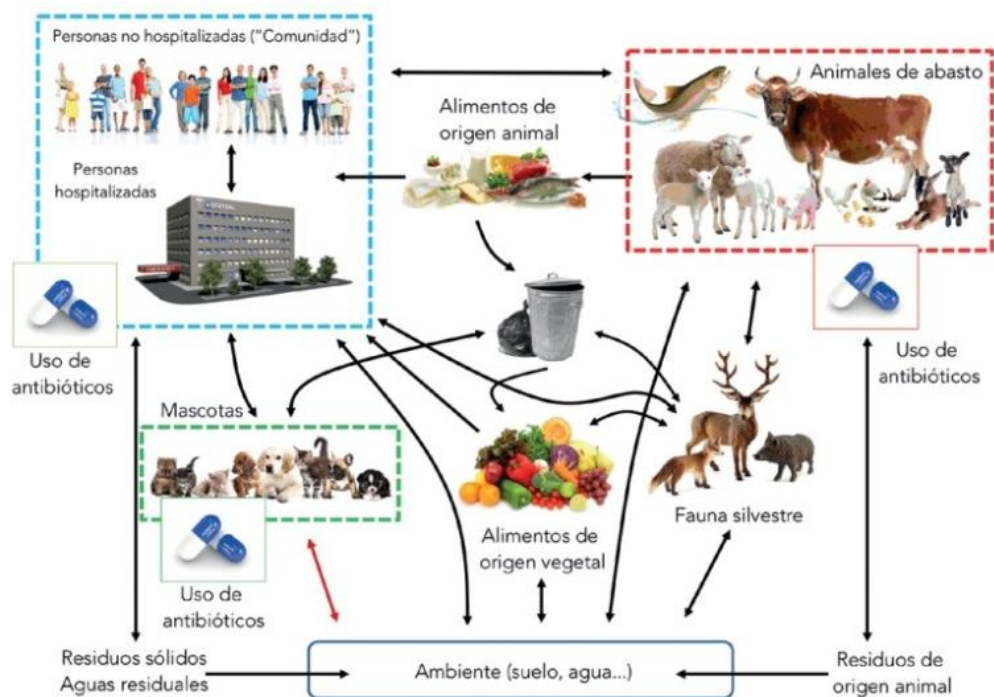
En el hígado de los porcinos o de aves inducen enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), reduciendo el estrés oxidativo, lo que a nivel inmunológico estimula la liberación controlada de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α , favoreciendo el reclutamiento y activación de neutrófilos y macrófagos con mayor capacidad fagocítica (Ahangaran, 2021). Asimismo, estimulan la producción de linfocitos T y B (glóbulos blancos originarios de la médula ósea y madurados en el timo para identificar y eliminar patógenos) en órganos linfoides como el bazo, incrementando la inmunoglobulina A secretora (IgA) en la mucosa intestinal, promoviendo la inmunidad innata y adaptativa, en especial en etapas críticas como el post-destete, donde se reporta reducción de mortalidad de hasta el 29% (Caneschi, 2023). También contribuyen a mejorar la integridad epitelial intestinal, reduciendo la incidencia de diarreas y mejorando la absorción de nutrientes, con incrementos reportados de hasta 11% en ganancia de peso y mejora la digestibilidad hasta un 12% en los sistemas productivos (Zhai, 2018).

3.2.3 Uso de Otras Alternativas Para el Sustituto de Antibióticos en la Producción Animal.

Muchos de los antibióticos a la larga causan resistencias en los animales, es por esto que existen alternativas vegetales para sustituirlos, tomando en cuenta la demanda creciente de los productos naturales, entre los cuales incluyen productos derivados de plantas que tienen compuestos para los animales que ayudan en el sistema inmunológico (Castillo, 2016)

Figura 2.

Resistencia antimicrobiana de origen animal y humano



Nota. Ecología, epidemiología y relaciones entre fuentes potenciales de microorganismos resistentes a los antibióticos. Adaptado *La microbiota y los probióticos en el ámbito veterinario*, por Rodríguez, (2020).

Como se puede observar en el gráfico el uso de antibióticos está inmiscuido en todo el entorno y sin duda alguna causa alteraciones indiscriminadas causando daños colaterales en el desarrollo de resistencias y efectos secundarios sobre la microbiota del individuo tratado (Rodríguez, 2020). Los probióticos usados en los animales ayudan a la

flora intestinal del animal sin alterar el sistema inmunológico como alimento funcional en la nutrición de animales (Morales Chávez, 2018)

La denominación “probiótico” o “alimento funcional probiótico” se aplica tanto a los microorganismos como a los productos alimenticios, que contienen determinados microorganismos viables en número suficiente para alterar o modificar la flora intestinal original (por implantación o colonización) en cualquier compartimiento digestivo del huésped y así ejercer efectos beneficiosos para la producción de los animales (Castillo, 2016)

Esta alimentación a través de probióticos en la nutrición animal también es de gran ventaja en la alimentación humana y la sanidad y producción animal (Morales Chávez, 2018). Otra manera de fomentar la mejor salud de los animales y evitar enfermedades son las plantas y los vegetales aprovechando las propiedades antimicrobianas como alternativa a los antibióticos (Castillo, 2016)

3.3 Método de Diseminación de la *Escherichia coli* en Zonas Productoras.

Según Calvopiña (2024), esta bacteria tiene una gran facilidad de propagación especialmente en zonas de poca higiene, puede ser transmitida por animales portadores, por ambiente y en ciertos casos, por humanos.

3.3.1 Transmisión por vía Fecal-Oral

Según Peñaloza Piña (2021) este es el método principal de transmisión de la *E. coli*, ésta se aloja en la excreción de su portador, a esta le gusta alojarse en las heces de sus portadores, para luego transmitir por alimento y agua. Este mismo puede sobrevivir en superficies como los suelos de los corrales, bebederos, comederos, y equipo de manejo, al ser usada alguna prenda u objeto contaminado, y no se aplican técnicas de higiene, el sujeto se expone directamente a la bacteria (Peñaloza Piña, 2021).

Al ser el agua la principal fuente de alimentación y uso para higiene el agua, servirá como transporte de propagación, puesto a que la misma se aplica para limpieza o consumo, la *E. coli* es residente de fuentes de agua como estanques, ríos, pozos, y al ser consumida automáticamente el sujeto se convierte en un receptor y transmisor andante (Peñaloza Piña, 2021)

Otras formas de contagio pueden ser por consumo de alimentos contaminados, puesto a que tanto forrajes como balanceados, se pueden contaminar si no son almacenados correctamente, o si estos se encuentran cerca de desechos, e incluso simplemente se puede dar por la simple exposición de sujetos ya portadores del patógeno (López, 2020)

3.4 Protocolos Aplicados en Investigaciones Previas.

3.4.1 Obtención del extracto

En el libro “Investigación en plantas de importancia médica” por Verde-Star (2016), detalla la metodología para estudiar las plantas con fines terapéuticos, buscando identificar y aislar los compuestos bioactivos que pueden aplicarse en el desarrollo de los fármacos. Donde explica que para la obtención del extracto requerido para la investigación se requiere lo siguiente:

El siguiente proceso requiere aplicar etanol aproximadamente 100 g de la planta por cada 1 L de etanol al 70-96%, se cubre con algodón cada recipiente y se espera por un lapso de 72 h a una temperatura ambiente, en un lugar oscuro y se agita ocasionalmente para facilitar la extracción, para posteriormente filtrar la muestra, la cual será sometida al rotavapor para que el mismo separe el solvente del extracto por medio de la evaporación del etanol (Verde-Star, 2016)

La investigación realizada por (Castro, 2015), donde implementa esta metodología para la extracción del aceite de tomillo explica que:

“El rotavapor tiene el objetivo de destilar en una sola etapa y de forma cuidadosa el producto mediante la evaporación y condensación de los disolventes. Una vez obtenido los aceites se realiza la dilución de los mismos con distintas cantidades del etanol” (Castro, 2015)

El extracto líquido se transfiere a un balón de evaporación del rotavapor y se lo somete a una temperatura máx. de 40 °C. con sistema de vacío activado, el balón girara lentamente para aumentar la superficie de evaporación, permitiendo evaporarse al etanol, sin dañar los compuestos requeridos. (Castro, 2015)

Teniendo preparadas las diferentes cantidades y listo el cultivo con ayuda de papel filtro este será empapado y colocado con los diferentes tratamientos y testigos sobre las

cajas inoculadas y se mete nuevamente dentro de la estufa por otras 24 h a 37 °C (Castro, 2015). Incluso en otra investigación realizada por Sarah Saci (2025), se implementa un paso extra a este método de extracción, en donde se puede obtener el producto final en presentación de polvo a través de la liofilización.

3.4.2 Medio de cultivo

Para este tipo de investigación se recomienda realizar el medio de cultivo Müller-Hinton, debido a su composición, ya que permite realizar pruebas de susceptibilidad antimicrobiana debido a su composición, permite la fácil difusión de los antibióticos y su naturaleza no es selectiva, asegurando el crecimiento de microorganismos como la *E. coli*. (Carbajal González, 2014)

Para la preparación de medio de cultivo Müller- Hilton, se diluye 39g del agar en 1000 ml de agua, se calienta a punto de ebullición hasta ver el producto diluido, se pone la mezcla en frascos y se los lleva a la autoclave, por 15 min a 121 C°, posteriormente se distribuye en las placas Petri con una capa de grosor de 4mm de grosor. (Carbajal González, 2014)

3.4.3 Estandarización del inóculo

La turbidez de la suspensión bacteriana debe ajustarse al estándar 0.5 de McFarland. Esta estandarización es crucial, ya que asegura que la cantidad de bacterias sembradas sea constante en todos los tratamientos, permitiendo una comparación precisa (CLSI, 2021). Este patrón equivale aproximadamente a una concentración de 1.5×10^8 Unidades Formadoras de Colonias (UFC/ml) (CLSI, 2021).

3.4.4 Medición de los Halos de Inhibición

Dentro del trabajo de Carbajal González (2014), también explica cómo se debe de realizar la toma de los datos obtenidos después de exponer la muestra de bacteriana a los antibióticos mediante el análisis de los halos de inhibición (zona clara alrededor de un agente antimicrobiano en un cultivo bacteriano, donde no hay crecimiento bacteriano, usado para determinar la sensibilidad del agente al compuesto).

Una vez retirada la muestra, con ayuda de un calibrador electrónico se mide las zonas de inhibición producidas por cada tratamiento. Para determinar el porcentaje de

inhibición relativa (PIR) se usa los resultados obtenidos por los extractos, comparados con los obtenidos por el control positivo del antibiótico. (Carbajal González, 2014)

Donde A se representa como el diámetro promedio del halo de inhibición del extracto o del antibiótico, y B sería el diámetro promedio de inhibición del extracto a mayor concentración (Carbajal González, 2014)

$$PIR (\%) = \frac{Ax100}{B}$$

3.5 Importancia de la dosificación de medicamentos naturales en la producción animal.

El correcto manejo de medicamentos naturales, puede ayudar a maximizar sus beneficios terapéuticos diversos estudios indican que la administración de Fitobióticos en rangos adecuados permite mejorar la salud intestinal, el crecimiento y la respuesta inmune, sin generar efectos adversos por mal manejo de la dosificación. la misma que al ser precisa asegura una mayor eficacia biológica y una mejor tolerancia a largo plazo en comparación con esquemas no controlados (Martínez, 2015)

Desde el punto de vista productivo, se ha reportado que la dosificación adecuada de los extractos vegetales puede mejorar la conversión alimenticia, así como incrementar la ganancia diaria de peso hasta en un 11% en bovinos, cuando se alcanzan concentraciones funcionales. Estos efectos se asocian a una mejor eficiencia digestiva y a la modulación del ecosistema microbiano intestinal (Martínez, 2015).

En relación con el control de patógenos, la dosificación técnica del tomillo potencia su acción antimicrobiana y antioxidante. si la dosificación específicas permiten reducir la carga microbiana intestinal, mejora los parámetros en la leche como proteína y grasa, con incrementos aproximados del 4,3% en bovinos, y disminuir la presencia de parásitos gastrointestinales, con reducciones cercanas al 60% en larvas, cuando se integra dentro de programas sanitarios controlados (Zeng, 2015).

La seguridad constituye otro aspecto clave de la dosificación. El ajuste de la dosis según especie y peso corporal permite evitar fenómenos de toxicidad, especialmente cuando se superan las concentraciones máximas, como valores mayores a 360 mg/kg, reportados en algunos ensayos antiparasitarios (Wells, 2023). Mantener las dosis dentro del rango recomendado posibilita un uso sostenido sin la generación de residuos indeseables en la leche y la carne, favoreciendo además la reducción del uso de antibióticos convencionales y la presión selectiva asociada a la resistencia antimicrobiana (Wells, 2023)

Desde un enfoque clínico y de manejo, la dosificación individualizada de la fitoterapia permite mejorar la digestibilidad de los nutrientes y la respuesta inmune proporcionando un bienestar animal (Nehme, 2021). Por ejemplo en aves se ha reportado que las dosis cercanas a 250 mg/kg de dieta contribuyen a modular la microbiota intestinal y reducir la carga bacteriana sin afectar su consumo (Nehme, 2021).

Se ha comprobado que la suplementación con aceites esenciales en lechones destetados induce una activación coordinada de la inmunidad humoral y celular, elevando la proliferación de linfocitos, la tasa de fagocitos y los niveles séricos de IgG, IgA, IgM (anticuerpos contra infecciones), C3 y C4 (proteínas fundamentales del sistema inmunitario, encargadas de defender el organismo marcar los patógenos, estimular la inflamación y destruir al patógeno) estos efectos inmunoestimulantes observados se determinaron que dependen netamente de la dosificación pues una dosis adecuada optimiza la respuesta inmunitaria, mientras que una excesiva podría suprimir la población de células T, por lo tanto la formulación es un factor determinante para pasar de un efecto neutro a una protección activa (Sandner, 2020).

En términos productivos, esta estrategia reduce la morbilidad sin necesidad de antibióticos. El impacto es especialmente notable en porcinos donde la suplementación con aceites esenciales ha llegado a reducir la mortalidad de un 33% a tan solo 4% (Zhai, 2018).

Al constituirse como una alternativa natural con potencial antimicrobiano frente a bacterias como la *E. coli*, debido a su contenido de compuestos etanólicos presenta una matriz más compleja, su contenido posee una baja toxicidad oral, rápido metabolismo hepático, eliminación eficiente por vía urinaria y biliar y ausencia de bioacumulación en tejidos comestibles, lo que respalda su uso seguro a dosis bajas y moderadas en animales de interés zootécnico según el Panel sobre Aditivos y Productos o Sustancias utilizadas en la Alimentación Animal [EFSA] (2012).

CAPÍTULO IV

METODOLOGÍA:

4.1 Delimitación espacial

La presente investigación se encuentra desarrollará en el laboratorio de microbiología:

Tabla 1.

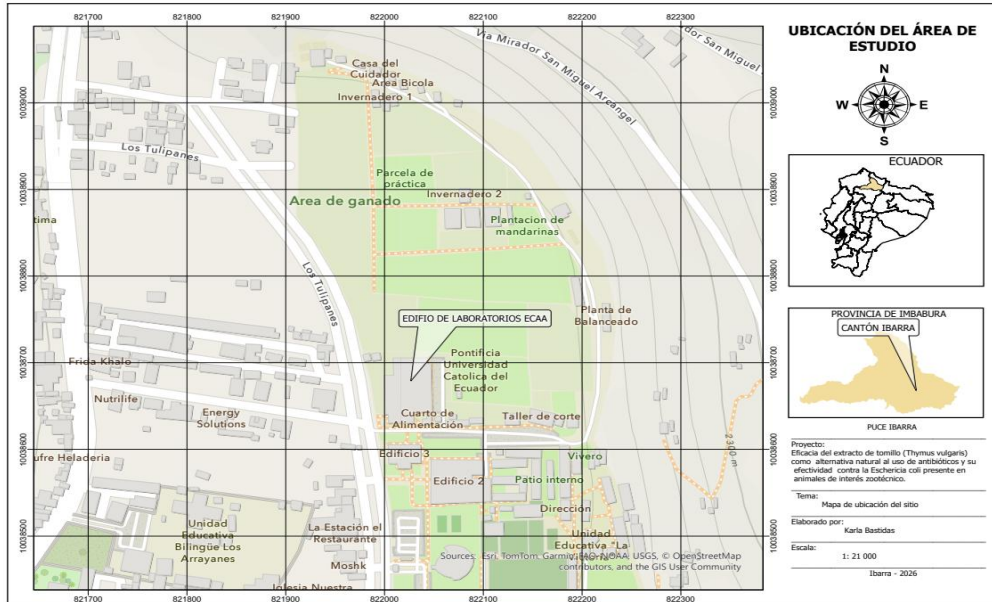
Ubicación geográfica del laboratorio de microbiología

Localización	
Provincia	Imbabura
Cantón	Ibarra
Parroquia	El Sagrario
Sector	La Victoria
Latitud	0°33'14''N
Longitud	78°02'57''O
Altitud	2980 m.s.n.m

Nota. Datos de ubicación del laboratorio. Adaptado de *Anuario agroclimático 2016-2023*, por Recalde (2024), Centro de Publicaciones PUCE.

Figura 3.

Ubicación geográfica del laboratorio de microbiología de la PUCE-I (provincia de Imbabura Ecuador)



Nota. Horizonte geográfico de la investigación. Adaptado de ArcGIS Pro (2025).

4.2 Variables.

- Variable independiente

Antibióticos testigos (tetraciclina y oxitetraciclina), extracto de tomillo y sus concentraciones:

Se evaluaron cuatro concentraciones del extracto (100%, 75%, 50%, 25%) preparadas mediante diluciones seriadas a partir de una solución madre de 1000 mg/ml, cada concentración se aplicó en placas con medio de agar Müller-Hinton previamente inoculadas con *Escherichia coli* (Carbajal González, 2014). Tras la incubación a 37°C durante 24 horas, se midió el diámetro del halo de inhibición en milímetros, producido por cada tratamiento, siguiendo el método de difusión en disco descrito por (Carrillo, 2018). Adicionalmente se incluyó unos antibióticos como control positivo y un control negativo solo cultivado con *Escherichia coli*.

- Variable dependiente:

Halo de inhibición: Se determino midiendo el diámetro de inhibición en (mm) mediante el uso de un calibrador digital, siguiendo los estándares del CLSI (2021).

Porcentaje de inhibición: se evaluó mediante la fórmula de Abbott con los datos obtenidos en las pruebas de difusión de disco:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{\text{diámetro tratamiento}}{\text{diámetro control positivo}} \right) \times 100 \quad \text{o} \quad \text{PIR} (\%) = \frac{Ax100}{B}$$

Los resultados fueron comparados con el control negativo para validar la ausencia de interferencias por el solvente (Asadpour, 2023).

4.3 Análisis Estadístico

Tipo de diseño experimental: Diseño Completamente al Azar (DCA) en donde se trabajará con 6 tratamientos y 3 repeticiones por tratamiento, para un total de 18 unidades experimentales dentro de las cuales cada repetición contiene 5 discos de papel impregnados con los tratamientos sumando un total de 90 discos evaluados en el ensayo. Las cuales se aplicarán en cajas Petri dividiéndose de la siguiente manera:

Tratamientos:

- T1: (Control Positivo):(caja Petri + medio de cultivo inoculado + tetraciclina 500mg/ml)
- T2: (Control Positivo) (caja Petri + medio de cultivo inoculado + oxitetraciclina 100mg/ml)
- T3: testigo absoluto: dosis alta de extracto de tomillo (100%) (caja Petri caja Petri + medio de cultivo inoculado + extracto de tomillo al 100% de concentración)
- T4: dosis media de extracto de tomillo (75%) (caja Petri caja Petri + medio de cultivo inoculado + extracto de tomillo al 50% de concentración)
- T5: dosis media de extracto de tomillo (50%) (caja Petri caja Petri + medio de cultivo inoculado + extracto de tomillo al 50% de concentración)
- T6: dosis baja de extracto de tomillo (25%) (caja Petri caja Petri + medio de cultivo inoculado + extracto de tomillo al 25% de concentración)

- Control Negativo: caja con medio inoculado sin tratamiento, destinado únicamente a la validación visual del crecimiento bacteriano (no incluido en el análisis estadístico para evitar sesgos por varianza nula)

El procesamiento estadístico se realizó mediante el software XLSTAT (versión 2023.2.0;1411; ID de licencia: b1672737- bf0f-472b-a655-46d8039fd975) para realizar el ANOVA, asegurando un procesamiento eficiente y preciso de los datos.

Tabla 2.

Esquema De Distribución

<i>Tratamiento</i>	<i>Descripción</i>	<i>Concentración</i>
T1	Tetraciclina	500mg/ml
T2	Oxitetraciclina	100mg/ml
T3	E. Tomillo	1000 mg/ml
T4	E. Tomillo	750 mg/ml
T5	E. Tomillo	500 mg/ml
T6	E. Tomillo	250 mg/ml

Nota. Distribución de tratamientos evaluados en el ensayo.

Tabla 3.

Esquema Del ANOVA

<i>FV</i>	<i>GL</i>
Total corregido	17
Tratamiento	5
Error	12

Nota. Modelo correspondiente al diseño experimental DCA para el esquema del ANOVA.

4.3.1 Repeticiones.

La presente investigación utilizó 3 repeticiones por tratamiento. Cada repetición correspondió a una unidad experimental (caja Petri).

4.3.2 Unidades experimentales.

Cada unidad experimental estuvo constituida por una caja Petri con medio de cultivo Müller Hinton. Para aumentar la precisión y reducir el error experimental, en cada unidad experimental (caja) se colocaron 5 discos de papel impregnados con los tratamientos

4.3.3 Análisis funcional.

- Prueba de normalidad de Shapiro Wilks
- Prueba de homogeneidad de varianzas Levene
- Coeficiente de variación
- Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5%

4.4 Tipo de estudio

Los enfoques de la presente investigación que se desarrollaran en este proyecto son:

- **Descriptiva:** se centrará en describir las características del efecto antibacteriano del extracto de tomillo sobre la *Escherichia coli*, evaluando la formación de los halos de inhibición en diferentes concentraciones del extracto.
- **Comparativa:** se realizará una comparación entre los resultados obtenidos con los tratamientos experimentales y el grupo control tratado con antibiótico comercial, para determinar la eficacia relativa del extracto natural frente a los agentes farmacológicos convencionales.

4.5 Metodología de investigación

Su aplicación fue de forma *in vitro* distribuyendo las muestras de *E. Coli* tomada del cepario de la PUCE-I en diferentes cajas petri con agar Müller Hinton, con el método de siembra halo de inhibición o difusión en disco, con un asa bacteriana e ingresar las muestras en una estufa por 24 horas a una temperatura de 37 °C dándole una condición adecuada para el desarrollo de la muestra y posteriormente se aplicó en diferentes concentraciones o dosis el extracto de tomillo y de los otros productos. Las placas se incubaron a temperatura adecuada durante 24h, y posteriormente se contaron las colonias bacterianas formadas para evaluar la eficiencia antimicrobiana (Castro, 2015)

4.6 Obtención del extracto:

La extracción de los compuestos activos del tomillo se realiza en dos fases: primero la extracción por maceración y luego, la concentración del extracto mediante el rotavapor. (Verde-Star, 2016)

Fase 1: Extracción por maceración:

1. Preparación del material vegetal: Para la obtención del extracto del tomillo siguiendo el protocolo mencionado en metodología, ocupamos alrededor de 350 gramos de tomillo fresco reservando únicamente sus hojas, flores y tallos pequeños de la planta, los cuales fueron sometidos a un proceso de secado controlado a 40°C, por 3 días en la estufa del laboratorio de microbiología, hasta que el material se encuentre deshidratado , obteniendo poco más de 107.50 gramos de material seco.
2. Maceración en frío: el tomillo seco fue triturado, quedándose con 100 g triturados, los mismos que se pasaron a macerar en 1 L de etanol al 96% en una relación de 1:10 (m/v), para una extracción eficiente. La mezcla se dejó en reposo durante 72 horas a temperatura ambiente, evitando la exposición directa a la luz y realizando, agitando ocasionalmente, para facilitar la extracción.
3. Filtración: el macerado líquido se separó de los residuos sólidos mediante filtración con papel filtro Whatman, asegurando la recuperación máxima del solvente y del extracto crudo.

Fase 2: Extracción por Rotavapor

1. Evaporación del solvente a presión reducida: El macerado etanólico obtenido de la mezcla de 1L de etanol y tomillo fue sometido a un proceso de evaporación del solvente en el equipo de rotavapor. El proceso se manejó a una temperatura máxima de 40° C y presión reducida para disminuir el punto de ebullición del etanol.
2. Obtención y pesaje: el etanol evaporado se recuperó en el balón de aforo y el extracto concentrado del tomillo se recolectó en un recipiente de vidrio ámbar estéril. Se registró el peso final del extracto.

Para calcular el rendimiento de la extracción y se almacenó a una temperatura de 4°C hasta su uso experimental.

Finalmente se utilizó la siguiente fórmula para establecer el rendimiento, teniendo como resultado el 10% de extracto puro por cada 100 gramos de hojas de tomillo

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso de la planta (g)}} \times 100$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{10 \text{ g}}{100 \text{ g}} \times 100 = 10 \%$$

3. Dilución: de la solución madre se realizaron las soluciones en secuencia con 1000 mg/ml (100%), 750 mg/ml (75%), 500 mg/ml (50%), 250 mg/ml (25%). (Carbajal González, 2014)

Para determinar los gramos a utilizar se desarrolló la siguiente fórmula:

$$\text{Gramos} = \frac{\text{Concentracion} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \times \text{Volumen}(\text{ml})}{1000}$$

$$\text{Gramos} = \frac{1000 \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \times 1 \text{ ml}}{1000} = 1 \text{ g}$$

La cual determina que se debe utilizar 1g = 1000mg por cada ml de solución.

El producto final obtenido del rotavapor tiene un aspecto de consistencia semisólida de naturaleza espesa, de color verde oscuro. Se retiró el producto del equipo obteniendo

un volumen total de 10 ml el mismo que se considera como la concentración al 100%. Del mismo producto se realizan las disoluciones, se reserva una parte del producto el cual no requiere añadirle ningún insumo extra que equivale a los 1000mg/ml (100%), y para las concentraciones al 75% (750 ml/mg), 50% (500 ml/mg), 25% (250 ml/mg), los mismos que se estandarizan a 5ml por tubo usando el cálculo de dilución ($V_1 = (C_2 \times V_2) / C_1$) por ejemplo para calcular al 75%: ($V_1 = (750 \text{ ml/mg} \times 5 \text{ ml}) / 1000 \text{ mg/ml} = 3.75 \text{ ml}$ de concentrado) y se añade etanol al 10% para la disolución hasta ocupar 5ml en cada tubo de ensayo, repitiendo el mismo procedimiento para el resto de disoluciones de 50% y 25% para la prueba de difusión de agar. Las soluciones se almacenaron a 4°C hasta su uso.

4.7 Preparación de cultivo y siembra bacteriana

Para obtener una clara comparación de los tratamientos, se cultivaron las cepas de *E. coli* por medio del Método de difusión en disco (Kirby-Bauer) en el laboratorio de microbiología:

1. Se preparó el Agar Mueller-Hilton (39 g/L), se calentó a punto de ebullición hasta ver el producto diluido.
2. Se puso la mezcla en frascos y se los llevó al autoclave, por 15 min a 121 C°, posteriormente se distribuyó en las placas Petri con una capa de grosor de 4mm de grosor.
3. **Difusión de disco:** a través del método de inundación con el fin de obtener un césped bacteriano aplicamos 1ml de la suspensión bacteriana sobre la superficie del agar.

4.2.1 Estandarización del Inóculo (0.5 McFarland)

- **Preparación del cultivo:** a partir de la muestra de *E. Coli*, se ocupó una asa bacteriana y se inoculó un tubo estéril que contenga 4-5ml de solución salina estéril o caldo LB (Luria-Bertani).
- **Homogeneización:** se mezcló la suspensión bacteriana con ayuda de un vórtex hasta obtener una solución turbia y homogénea

- **Comparación:** Para trabajar con la cepa de *E. Coli* se prepararon cajas con agar Muller- Hinton estériles, en su mayoría de plástico desechable. Antes de aplicar la bacteria en su respectiva caja, se estandarizó el inóculo bacteriano, se realizó conforme al estándar de 0.5 McFarland con el fin de asegurar una concentración bacteriana homogénea en todas las unidades experimentales. La turbidez de la suspensión fue ajustada inicialmente por comparación visual y posteriormente verificada por espectrofotometría una longitud de 625 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se mantuvieron dentro del rango de 0.08-0.16, lo que corresponde aproximadamente a 1.5×10^8 Ufc/ml, lo que permite minimizar la variabilidad experimental atribuible a la carga bacteriana inicial.

Figura 4.

Estandarización del inóculo bacteriano según el estándar de 0.5 McFarland.



Nota. Ajuste visual y por espectrofotometría de la suspensión equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL.

4.8 Preparación y distribución de los tratamientos

4. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se ocupó la técnica de difusión de agar Muller-Hinton. En cada caja petri se colocaron discos de papel previamente esterilizados de 6 mm impregnados de 20 μ l de cada tratamiento.

- Control negativo T0: no se aplica ninguna sustancia
 - Antibiótico testigo T1, T2: se impregnan los discos con tetraciclina y oxitetraciclina para asegurar un control positivo estandarizado a 500 mg/ml y 100 mg/ml de oxitetraciclina.
 - Extractos (T3, T4, T5, T6): el extracto concentrado obtenido se distribuye en las siguientes concentraciones 100%, 75%, 50%, 25%.
5. Las placas se incuban a 37°C durante 24 horas. Posterior al transcurso de ese tiempo, se miden los diámetros de los halos de inhibición usando un calibrador digital.

4.9 Protocolo de manejo del extracto

6. Se registraron los diámetros de los halos de inhibición con el calibrador digital con una precisión de 0.01 mm.
7. Se calculó el porcentaje de inhibición relativa (PIR) comparando el halo del extracto frente a los antibióticos. Donde A= Halo del extracto disuelto o el antibiótico y B= Halo del extracto a mayor concentración

$$PIR (\%) = \frac{Ax100}{B}$$

8. Determinó la concentración más eficaz
9. Establecieron pautas de uso (dosis, frecuencia y posibles vías de aplicación) basadas en literatura previa y resultados obtenidos.

4.10 MATERIALES

4.10.1 Materiales biológicos:

- Tomillo (*Thymus vulgaris*)
- *Escherichia coli* (cepa proveniente del cepario de la PUCE-I)
- **Reactivos y soluciones:**
- Tetraciclina (testigo positivo)

- Medio de cultivo (Agar nutritivo o Müller Hinton según el protocolo bacteriano)
- Soluciones de esterilización (alcohol etílico al 70%, hipoclorito de sodio al 5%)
- Etanol
- Agua destilada
- Discos de papel estériles
- Solución salina

4.10.2 Materiales de laboratorio:

- Cajas Petri estériles
- Tubos de ensayo
- Pipetas automáticas y puntas estériles
- Micropipetas (0.1 - 1000 μ L)
- Recipientes de vidrio (matraces, vasos de precipitados, embudos, frascos de almacenamiento de extractos)
- Papel filtro
- Balanza analítica
- Rotavapor
- Espectrofotómetro
- Incubadora a 37°C
- Aza bacteriana estéril
- Calibrador electrónico
- Mechero
- Papel comparativo de 0.5 de McFarland

4.10.3 Equipos complementarios:

- Campana de bioseguridad

- Agitador magnético
- Centrífuga (en caso de requerir separación de partículas en extractos o cultivos)
- Vórtex

CAPÍTULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Cultivo Bacteriano y comportamiento del halo de inhibición

Se realiza una comparación visual entre la caja Petri que no se aplicó ningún tratamiento utilizada como control negativo con el resto de placas, donde se observó un crecimiento uniforme y continuo, formando un césped bacteriano lo que confirma la ausencia de factores inhibitorios externos.

Las placas inoculadas con tratamientos tanto antibióticos comerciales como extractos etanólico de *Thymus vulgaris*, presentaron zonas circulares claras alrededor de los discos impregnados, correspondientes a los halos de inhibición bacteriana. Estas zonas evidenciaron la capacidad de los tratamientos al interferir con el crecimiento de *Escherichia coli*, generando diferencias visibles frente al control sin tratamiento.

La comparación entre la placa con cultivo sin tratamiento y las placas con el cultivo tratado, permitió verificar de manera cualitativa la eficacia inhibitoria de los compuestos evaluados y sirvió como base visual para el análisis cuantitativo posterior.

Figura 5.

Placas con cultivo con tratamiento y sin tratamiento



Nota. Comparación visual de la placa con cultivo sin tratamiento, con tratamiento de tomillo y tratamiento con tetraciclina.

5.2 Análisis estadístico

5.2.1 Pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza.

En base a los datos obtenidos de la evaluación in vitro, antes de proceder con el análisis de varianza (ANOVA), es fundamental verificar los supuestos estadísticos de normalidad usando la prueba de Shapiro Wilk, y la homogeneidad de varianza mediante las pruebas de Levene.

Los resultados pertenecientes a la (Tabla 3) indicaron que los valores de p para ambas fueron superiores al nivel de significancia establecido ($\alpha=0,05$), diámetro del halo de inhibición y porcentaje de inhibición relativa (PIR), siguen una distribución normal ($p>0.05$) y representan varianzas homogéneas ($p>0.05$), lo que permite confirmar que las variaciones observadas en el experimento se deben al efecto de los tratamientos y no a los errores o variabilidades afectadas por el muestreo.

Tabla 4.

Prueba de normalidad y homogeneidad de varianza

Variable				Shapiro-test		Levene-test	
	Observaciones	Promedio	Desviación estándar	W	P-Valué	F	P-Valué
Halo de inhibición (mm)	18	18.532	10.578	0.962	0.646	0.384	0.851
PIR (%) inhibición	18	58.040	33.285	0.936	0.246	0.3585	0.867

5.2.2 Análisis de varianza (ANOVA) para el diámetro del halo de inhibición (mm)

El análisis de varianza se realizó para determinar si existen diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones del extracto y los antibióticos. El diámetro del halo de inhibición permitió determinar el grado de sensibilidad de la *Escherichia coli* frente al potencial de los diversos tratamientos. El análisis de varianza ANOVA evidenció diferencias altamente significativas ($F= 77,443$; ($p<0.0001$)) entre las concentraciones de extracto y los antibióticos comerciales.

Tabla 5.*Análisis De Varianza ANOVA Del Dímetro De Inhibición*

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Total corregido</i>	17	1902.342				
<i>Tratamiento</i>	5	1845.159	369.032	77.443	<0,0001	***
<i>Error</i>	12	57.183	4.765			

Signification codes: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1

Promedio (mm) 18.5
CV (%) 11.8

Esto confirma que el tipo de tratamiento influye directamente en la capacidad de inhibición bacteriana. La significancia estadística obtenida respalda la hipótesis de que el extracto de tomillo posee propiedades antimicrobianas cuya eficiencia varía en función a su dosis. La homogeneidad y normalidad de estos datos $p > 0.05$ confirman que las diferencias observadas no son producto del azar, sino del efecto real de los compuestos evaluados. El promedio general fue de 18,5 mm con un coeficiente de variación (C.V) de 11,8%, lo que sugiere una variabilidad baja respecto al promedio.

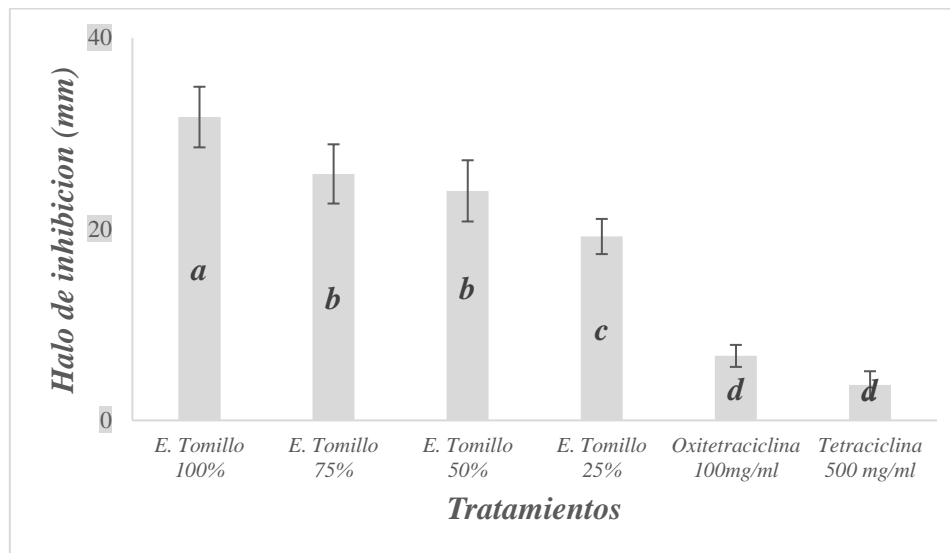
Para fortalecer esta sección, se considera que en los estudios in vitro con extractos naturales con un CV inferior al 15% es porque se ha dado un buen control y manejo en el ensayo. Además la formación de los halos homogéneos sugiere que el extracto etanólico posee una adecuada capacidad de difusión en el medio agar Müller-Hinton, factor importante para la correcta evaluación mediante el método de difusión de disco (Montenegro, 2024).

5.2.3 Comparación de Medias mediante la Prueba Tukey

Una vez confirmada la existencia de diferencias significativas en la prueba ANOVA, se realiza la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de confianza del 95%, la misma que nos permite agrupar los tratamientos según la similitud estadística y determinar qué concentración del extracto o de los antibióticos tiene mayor eficacia. Los resultados de la prueba Tukey revelaron un marcado comportamiento en cuanto a dosis-respuesta, donde el incremento en la concentración del extracto se tradujo en un aumento proporcional del efecto antimicrobiano.

Figura 6.

Prueba de Tukey al 5% del tamaño del halo de inhibición



El tratamiento con extracto de tomillo al 100% (T3) destacó como el más eficaz, alcanzando un halo de inhibición (31,721 mm; grupo A), siendo estadísticamente superior al resto de tratamientos. Las concentraciones de 75% (25,774 mm) y 50% (24,002 mm) conformaron un mismo (grupo B), sin diferenciar entre ellas, pero superiores al 25% (19,230 mm) del (grupo C).

Es relevante destacar que todos los extractos vegetales, incluso en su concentración más baja, superaron la eficacia de los antibióticos comerciales. La oxitetraciclina (6,746 mm) y la tetraciclina (3,722 mm) se ubicaron en el rango de menor sensibilidad (Grupo D), sin diferencias significativas entre ellas.

La reducida sensibilidad de *E. Coli* ante los antibióticos comerciales evaluados (tetraciclina y oxitetraciclina) sugiere un fenómeno de resistencia bacteriana consolidado, lo cual es una problemática global de resistencia en la ganadería. Diversos autores señalan que el uso prolongado e indiscriminado de tetraciclinas en la producción animal ha generado un incremento progresivo de cepas resistentes. Al respecto, Porras (2022) reporta que las tetraciclinas presentan altos porcentajes de ineficiencia en cepas de origen zootécnico, lo que coincide con una baja actividad observada en este ensayo. (López, 2020)

A diferencia de estos fármacos convencionales, que actúan sobre blancos moleculares específicos como la subunidad ribosomal 30S, los compuestos del tomillo ejercen una acción multiobjetivo (Benítez, 2020). El thymol, como compuesto fenólico, altera la permeabilidad de la membrana, produciendo una muerte celular. Este mecanismo inespecífico, dificulta al agente patógeno desarrollar resistencia, validando al tomillo como una alternativa viable frente a diversos patógenos (Solano, 2021).

La formación de estos halos se debe a la difusión de los compuestos activos, principalmente de compuestos como el timol y el carvacrol, a través del agar. Estos resultados son comparables con los de Montero-Recalde (2018) quienes determinaron que halos superiores a 15 mm en extractos vegetales indican una actividad antibacteriana elevada contra bacterias Gram-negativas.

5.2.4 Análisis de varianza (ANOVA) del porcentaje de inhibición relativa (PRI,%)

El porcentaje de inhibición relativa (PRI) permitió cuantificar la eficacia de cada tratamiento en comparación con un estándar de referencia. El análisis de varianza reveló diferencias significativas entre los tratamientos ($F=30,990$; $p<0.0001$). El promedio general registrado fue de 58,040%, con un coeficiente de variación (CV) de 18,3%, lo que indica una variabilidad moderada respecto al promedio.

Tabla 6.

Análisis de varianza de la variable del Porcentaje de inhibición de la bacteria por medio de soluciones de Extracto de tomillo

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>de Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>	<i>P-values significance codes</i>
<i>Modelo</i>	5	17479.944	3495.989	30.990	<0,0001	***
<i>Total corregido</i>	17	18833.687				
<i>Tratamiento</i>	5	17479.944	3495.989	30.990	<0,0001	***
<i>Error</i>	12	1353.743	112.812			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$
 Signification codes: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1

<i>Promedio (%)</i>	58.040
<i>CV (%)</i>	18.300

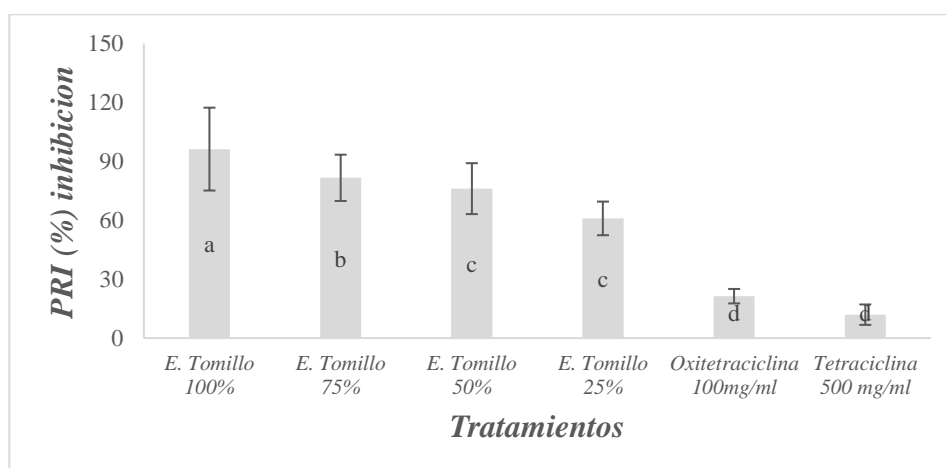
5.2.5 Comparación múltiple del PRI (%)

El extracto de tomillo al 100% alcanzó el mayor índice de inhibición con un (96,260%; Grupo A), seguido por la disolución al 75% (81,627%; Grupo B). Por otra parte las concentraciones de 50% (76,125%) y el 25% (60,966%) se ubicaron en conjunto en el Grupo C, aunque no presentaron diferencias estadísticas entre sí, mostraron una reducción marcada con respecto al resto de concentraciones.

En el extremo inferior, los antibióticos comerciales presentaron los valores más bajos de PRI (21.342% y 11.919% respectivamente) siendo del Grupo D sin diferencias en entre ellos. La marcada brecha entre la eficacia del tomillo y la tetraciclina pone de manifiesto la vulnerabilidad de los tratamientos frente a las cepas posiblemente mutadas. En el contexto de la ganadería, el uso de antibióticos con tan bajo porcentaje de inhibición no solo es ineficaz para controlar infecciones, sino que acelera la selección de genes de resistencia que puede llegar a transferir la resistencia al ser humano por la cadena alimenticia (Rivera, 2023).

Figura 7.

Porcentaje de inhibición relativa (PIR) por tratamiento



Estudios previos sugieren que los extractos ricos en compuestos fenólicos, al presentar un PRI tan elevado, actúan como potentes bactericidas que desnaturalizan proteínas esenciales de la pared bacteriana (Marín, 2020). Este alto porcentaje de inhibición observado en las concentraciones de T3 y T4 respalda la posibilidad y viabilidad de sustituir parcialmente los antibióticos sintéticos por aditivos Fito bióticos,

además de que presentan propiedades que actúan como conservantes naturales. Esto no solo mejora la respuesta sanitaria del hato, sino que responde a la creciente demanda de los consumidores por productos de consumo libres de residuos químicos y farmacológicos (Rivera, 2023).

5.3 Persistencia del efecto antibacteriano del tomillo a las 24-48 horas

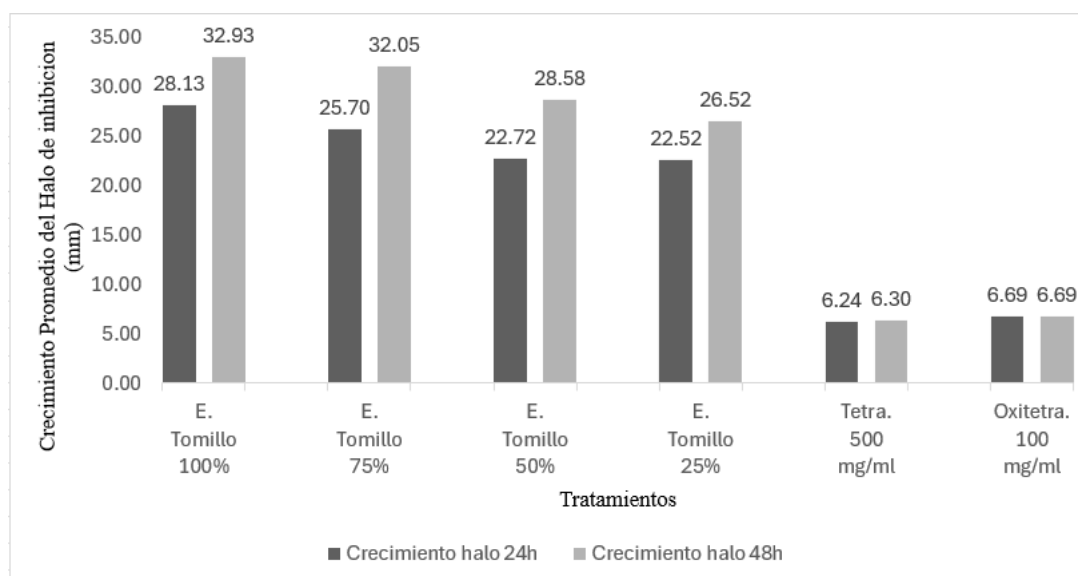
Luego de obtener los resultados de la primera prueba, una de las observaciones de las cuales nos percatamos fue que pasada las 24 horas el halo, tenía un tamaño totalmente diferente a las 48 tenía el diámetro del halo casi duplicaba al de las 24 horas en los tratamientos con las diferentes concentraciones del extracto de tomillo, mientras que en los antibióticos convencionales no hubo cambios, por la misma razón implementamos una evaluación extra.

Con el objetivo de analizar la persistencia del efecto antibacteriano de los tratamientos evaluados, se realizó una medición adicional del diámetro del halo de inhibición a las 48 horas de incubación, comparándolo con los valores obtenidos inicialmente a las 24 horas. Este análisis permitió identificar cambios en la magnitud del efecto inhibitorio y describir la estabilidad temporal de la acción antimicrobiana del tomillo y de los antibióticos comerciales.

Los resultados evidenciaron que los tratamientos a base de extracto de tomillo, particularmente en las concentraciones más altas, mantuvieron e incluso incrementaron su respectivo diámetro de halo de inhibición a las 48 horas, lo que indica que la acción antibacteriana sostenida durante el tiempo evaluado. Este comportamiento sugiere que los compuestos activos presentes en el extracto conservan su eficacia inhibitoria más allá del periodo inicial de evaluación.

Figura 8.

Crecimiento del halo de inhibición por tiempo a las 24 y 48 horas



Nota. Comparación del diámetro promedio del halo de inhibición (mm) a las 24 y 48 horas de las diferentes concentraciones del extracto de tomillo.

Cómo se observa en la gráfica en promedio los halos del extracto incrementaron unos ± 5 mm, un rango aproximado del 6-12%, lo que indica una persistencia en el efecto antibacteriano durante el periodo de evaluación. Este comportamiento sugiere que los compuestos fenólicos, se continúan difundiendo en el medio agar con el transcurso del tiempo, manteniendo su inhibición más allá del periodo inicial de incubación. Es importante destacar que este aumento progresivo no evidencia deformaciones del halo ni crecimiento bacteriano interno, lo que confirma su efecto bactericida.

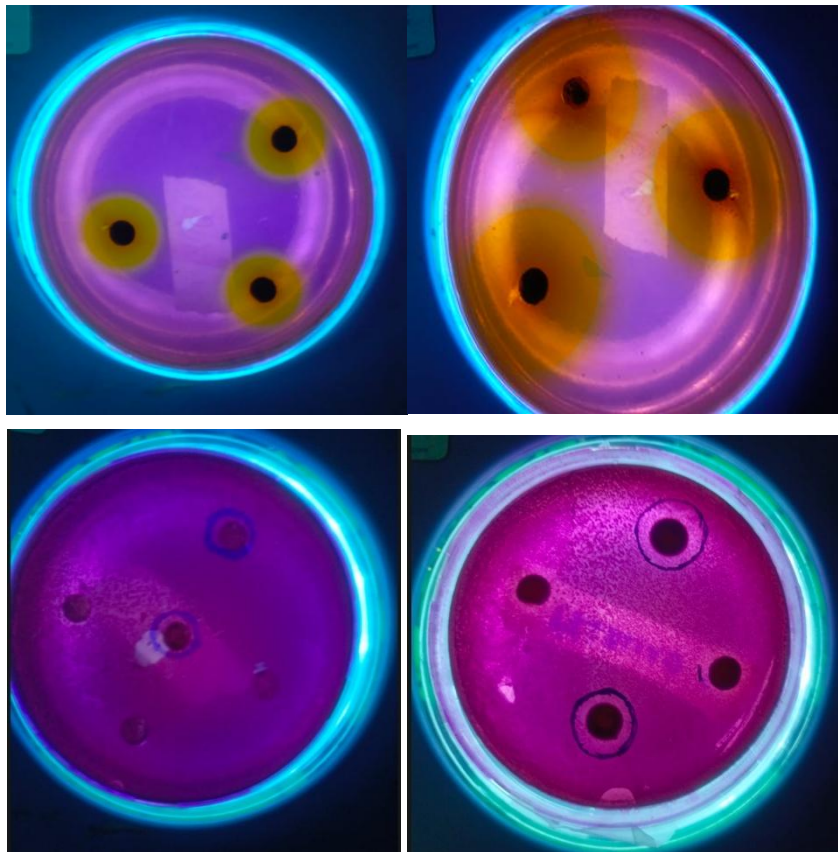
En contraste a los tratamientos en la concentración más baja del extracto (25%), se observó que era considerablemente más pequeña que el resto de los tratamientos del extracto, pero aun así su zona de inhibición era visible y funcional, siendo superior a las observadas en los antibióticos comerciales, lo que evidencia que incluso a bajas concentraciones el extracto tiene mayor relevancia contra el patógeno. También notando que la concentración del 75% destacó como uno de los mejores resultados pues registra mayor incremento del halo de hasta 7mm a las 48h de incubación.

Por el contrario, los tratamientos correspondientes a la tetraciclina y la oxitetraciclina presentaron un comportamiento diferente. El diámetro del halo tendió a

estabilizarse a las 24 horas, no presentó cambio alguno posterior a este tiempo. Este patrón sugiere una pérdida parcial de la eficacia inhibitoria de los antibióticos frente a la cepa evaluada con el transcurso del tiempo, lo cual podría asociarse a mecanismos de tolerancia o resistencia bacteriana para las tetraciclinas en cepas de origen zootécnico.

Figura 9.

Comparación de halos de inhibición de la concentración más baja y los antibióticos comerciales.



Nota. Las dos primeras imágenes son el mismo tratamiento a las 24 y 48 horas, y las otras dos son los halos de las tetraciclinas con una inhibición casi nula.

Correspondientes a los antibióticos comerciales mostraron una reducción o estabilización del halo de inhibición entre las 24-48 horas, evidenciando una pérdida

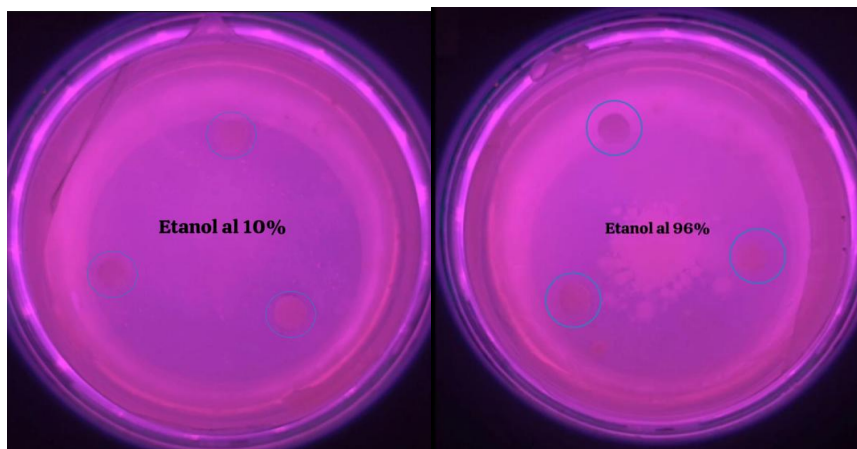
parcial de su efecto antibacteriano con el transcurso del tiempo. Esta disminución sugiere una menor persistencia de la acción inhibitoria frente a la cepa evaluada.

Al comparar el comportamiento temporal de los tratamientos, se evidenció que los extractos etanólico del tomillo poseen una mayor estabilidad y persistencia antibacteriana frente a la cepa de la *Escherichia coli* que los antibióticos comerciales. Mientras que la eficacia de las tetraciclinas tiende a disminuir con el tiempo, el timol y el carvacrol mantuvieron e incrementaron sus halos de inhibición a las 48 horas de incubación, lo que demuestra una actividad sostenida y no solo inmediata. Esta capacidad de mantener el control microbiológico de forma prolongada sugiere que sus compuestos activos, superan en persistencia a los fármacos convencionales, consolidando al extracto vegetal como una alternativa natural altamente efectiva y estable.

De igual manera esta prueba nos ayuda a determinar que el efecto del extracto es aplicado por los agentes fitobióticos del tomillo y no del etanol, debido a que a pesar de que el etanol es un bactericida y un solvente, posee una acción rápida y de corta duración, su mecanismo consiste en desnaturalizar las proteínas y la alteración de membranas celulares, actuando en 30 segundos a 2 minutos en concentraciones menores al 80%, incluso en concentraciones elevadas mayores al 90% llegan a deshidratar la célula superficialmente, lo que significa que no llega a penetrar correctamente la pared celular, siendo este efecto dependiente estrictamente del contacto directo en la fase líquida (Disinfectants, 2024). No obstante en ensayos de difusión de agar, el etanol se evapora en pocos minutos post aplicación en el disco, perdiendo rápidamente su concentración activa (Sauerbrei A. et al, 2020).

Figura 10.

Prueba de etanol



Nota. Prueba de control de etanol en las dosis utilizadas en el presente ensayo, etanol al 10% y etanol al 96%

Como se puede observar en estas pruebas de control de etanol, el halo es casi imperceptible, sumado al respaldo bibliográfico nos lleva a determinar que tanto el incremento del halo observado en el presente ensayo de 24-48h de los tratamientos con extracto no puede atribuirse al etanol, ya que su mecanismo de acción ocurre en minutos y no en horas. La persistencia e incluso la expansión del halo en dicho intervalo se explica por la estabilidad y difusión por los compuestos fenólicos.

5.4 Dosificación por estudios in-vivo en animales de producción según búsqueda bibliográfica.

Basándonos en investigaciones donde se implementó el uso del extracto etanólico del tomillo para estimular la inmunidad de las distintas especies usadas para producción ganadera. Podemos determinar recomendar las siguientes dosis por especie:

Los resultados el presente estudio in vitro evidenciaron que el extracto etanólico perteneciente a *Thymus vulgaris* presenta una actividad inhibitoria significativa frente a la exposición de la cepa bacteria de la *Escherichia coli*, por lo cual al representarse como las concentraciones con mayor eficiencia y concentración los tratamientos T3 (extracto etanólico al 100%) y T4 (extracto etanólico al 75%) en cuanto al halo de inhibición, con

estos resultados, se proyecta como alternativa más viable para su aplicación en condiciones in vivo. Basándose en investigaciones realizadas con anterioridad, la presente propuesta de manejo considerando su la dosificación, frecuencia y aplicación aplicado en animales de producción a partir de evidencia científica y bibliográfica.

Tabla 7.

Dosis recomendada del extracto etanólico concentrado de Thymus vulgaris en especies grandes según bases bibliográficas.

ESPECIE	DOSIS mg/kg de Dieta	Duración de ciclo/ tratamiento
Cabras	10-20 mg/kg/día	7-14 días
Bovinos	250- 500 mg/kg/día	14-21 días
Porcinos	100-300 mg/kg /día	10-18 días
Aves	60-350 mg/kg/día	7-14 días
Aves de postura	100-250 mg/kg/día	5-7 días
Cuyes	100-250 mg/kg/día	10-15 días

Nota. tabla elaborada a partir de la información recopilada de García (2018), Rivera et al (2023), Duarte (2024) y Martínez (2015)

Utilizando como referencia las dosis recomendadas por animal en la (tabla 4), podemos calcular la dosis total por animal en utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Dosis total (ml)} = \text{peso del animal (kg)} \times \text{dosis recomendada (mg/kg)}$$

Asumiendo que el producto se esté aplicando en aves de postura con un peso 1.5 kg y la dosificación recomendada es de 175 mg/kg/día entonces su respectiva dosis será de 262.5 mg/día considerando que la bibliografía recomienda que su administración sea dos veces por semana se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Dosis total (mg)} = \text{peso del animal (Kg)} \times \text{dosis recomendada (mg/kg)}$$

- Dosis total (mg)= 1.5 kg x 175 mg/kg/día = 262.5 mg/día
- Fórmula de dosis por toma (mg)= dosis diaria (mg)/ número de tomas
- 262.5 mg/día / 1 toma/día= 262.5 mg/día

Esta dosis se le da de 1 a 2 veces por semana en el agua.

Al tener el contenido en presentación de gotas, se calcula de la siguiente manera:

- Peso del animal: 1.5 kg
- Dosis recomendada: 175 mg/kg/día
- Concentración del extracto al 750 mg/ml
- Frecuencia: 1 vez al día
- Dosis diaria: $1.5 \times 175 = 262.5$ mg/día
- Dosis por toma: $262/1 = 260$ mg/día
- Volumen de toma: $262.5 / 750 = 0.35$ ml \times 20 gotas/ml = 7 gotas/día

5.4.1 Consideraciones generales del extracto etanólico concentrado:

Al constituirse como una alternativa natural con potencial antimicrobiano frente a bacterias como la *E. coli*, debido a su contenido de compuestos etanólicos presenta una matriz más compleja, su contenido es de baja toxicidad oral, rápido metabolismo hepático, eliminación eficiente por vía urinaria y biliar y ausencia de bioacumulación en tejidos comestibles, lo que respalda su uso seguro a dosis bajas y moderadas en animales de interés zootécnico según la (EFSA, 2022).

Se recomienda de que el uso sea oral, mezclado con el agua o alimento por su palatabilidad y menor estrés, proporcionar 1 vez al día en sus respectivos ciclos de uso. Repetir su ciclo de uso solo si el patógeno persiste, no usar más de 3 ciclos al año. El tratamiento debe suspenderse cuando se observe una reducción igual o superior al 50% de la carga bacteriana (Martínez, 2015).

5.5 Discusión

5.5.1 Confiabilidad y varianza experimental

La homogeneidad de varianzas y la normalidad de los datos confirman que las diferencias observadas entre los tratamientos no son producto al azar, sino que es el efecto real de los tratamientos aplicados. El coeficiente de variación obtenido se mantuvo dentro de rangos aceptables lo que indica precisión experimental y buen control del ensayo. La baja variabilidad en el tratamiento del extracto mayor concentrado sugiere que no solo ofrece mayor eficacia antibacteriana, sino que también una respuesta más estable, proponiendo que sea la respuesta más estable para una próxima aplicación in vivo.

5.5.2 Comportamiento general de los tratamientos evaluados

El análisis de los resultados del ensayo confirma que el tipo de tratamiento influye significativamente tanto en el diámetro de inhibición como en el PRI. Se observó una clara tendencia dosis- dependiente: a mayor concentración del extracto, mayor es el efecto antimicrobiano, de forma consistente. Mientras que el extracto de tomillo al 100% mostró un mayor efecto inhibitorio con halos amplios y baja variabilidad, los antibióticos comerciales (tetraciclina y oxitetraciclina presentaron una eficacia notablemente inferior, incluso comparados con la concentración más baja del 25% (T6).

Esto se ve reflejado en la dosis-respuesta, a medida que la concentración del extracto aumenta, se observa un incremento progresivo en el diámetro del halo de inhibición. Esta tendencia indica que la eficacia antibacteriana del extracto está directamente relacionada con la concentración aplicada (Ulloa-Vergara, 2025).

Esta menor respuesta de los fármacos convencionales sugiere que la cepa de *E. coli* utilizada posee una sensibilidad reducida, lo que respalda la necesidad de explorar alternativas naturales como el tomillo. Esto no solo garantiza la eficacia frente a las cepas resistentes, sino que reduce la probabilidad de que la bacteria desarrolle nuevos mecanismos de defensa (Marín, 2020).

5.5.3 Gestión de bioseguridad y disposición final de material contaminado

El ensayo, al involucrarse con el manejo de bacterias, se debe de aplicar lineamientos de bioseguridad correspondientes al Nivel de Bioseguridad 2 (BSL-2), debido a que se trata de un microorganismo potencialmente infeccioso que requiere medidas de contención y eliminación (Gobierno de Ecuador, 2022). Para este nivel de bioseguridad, se requiere del respectivo equipo de protección personal (EPP) el cual evita la exposición al agente biológico. Para el respectivo manejo del cultivo bacteriano, se requiere de una cabina de bioseguridad con flujo de aire controlado, garantizando un área de trabajo estéril y minimiza la generación de aerosoles.

Posterior al uso de los equipos y materiales se desinfectan con soluciones desinfectantes y con exposición a la radiación ultravioleta (UV) (Ortiz, 2024).. Todo el material incluyendo las cajas contaminadas se sometieron al proceso de esterilización en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos, bajo presión a vapor (procedimiento estándar para la eliminación de microorganismos), los mismos que luego

de ser esterilizados se retiran los residuos biológicos. Cumpliendo con las normas de bioseguridad después del experimento (Ortiz, 2024).

5.6 Discusión de los resultados obtenidos

La investigación tuvo como objetivo evaluar la eficacia antibacteriana del extracto etanólico de tomillo en sus distintas concentraciones frente a la *Escherichia coli*, comparándolo con las tetraciclinas de uso común en la producción animal. Los resultados nos permiten estudiar el comportamiento de los extractos, considerando su efecto inhibitorio, la relación dosis-respuesta y su potencial como alternativa natural frente a la problemática de las resistencias microbianas.

Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Mohsenzadeh (2007) y Morales (2023) quienes atribuyen el efecto inhibitorio del tomillo sobre bacterias Gram negativas a la acción de compuestos fenólicos como el thymol y el carvacrol. La superioridad del extracto a mayor concentración frente a la tetraciclina y oxitetraciclina sugiere una sensibilidad reducida de la cepa *E. coli* hacia estos fármacos, fenómeno asociado posiblemente al desarrollo de mecanismos de resistencia frente a antibióticos convencionales.

5.7 Comparación del extracto de tomillo frente a los antibióticos

Los antibióticos comerciales evaluados, presentaron una eficacia notablemente inferior incluso en comparación a la dosis más baja del extracto vegetal. Esta menor respuesta sugiere que la cepa de *Escherichia coli* utilizada posee una sensibilidad reducida frente a las tetraciclinas, lo que respalda la necesidad de explorar alternativas naturales como el tomillo.

Esta resistencia adquiere relevancia debido a que las tetraciclinas son de los antibióticos más prescritos en clínicas veterinarias, representando hasta el 22.5% de las administraciones en diversas especies (Mercer, 2022). Su bajo costo y amplio espectro motivan que sean recomendadas frecuentemente para una gran variedad de afecciones. Sin embargo, su empleo rutinario como profilácticos o promotores de crecimiento, muchas veces sin antibiogramas previos, ha disparado la prevalencia de resistencia a niveles superiores al 80-95% en explotaciones de porcinos y aves. Está sobre prescripción

y el uso de dosis subóptimas aceleran la selección de bacterias resistentes, lo que explica porque en este estudio los fármacos comerciales fallaron en comparación con las alternativas fitoterapéuticos (Mercer, 2022).

Además, el tomillo representa una alternativa accesible, de bajo costo y ambientalmente sostenible, especialmente para sistemas productivos rurales donde el acceso a medicamentos veterinarios puede ser limitado.

5.8 Comparaciones con investigaciones similares

Los resultados de la actual investigación concuerdan con múltiples estudios que han evaluado el efecto antimicrobiano del tomillo y otras plantas medicinales frente a bacterias patógenas de importancia zootécnica. (Mohsenzadeh, 2007) reportó que aceites esenciales como el de *Thymus vulgaris* presentan una inhibición significativa del crecimiento de *E. Coli* en los medios de cultivo, destacando que la magnitud del efecto depende directamente de la concentración aplicada.

La homogeneidad de varianzas y la normalidad de los datos confirman que las diferencias observadas entre tratamientos no son producto del azar ni de errores experimentales, sino que responden al efecto real de los tratamientos aplicados. Esto fortalece la validez estadística y científica de los resultados obtenidos.

La baja variabilidad observada en el tratamiento con extracto al 100% sugiere que esta concentración ofrece no solo una mayor eficacia antibacteriana, sino que también sugiere una respuesta más estable, lo cual es un aspecto favorable a considerar su posible aplicación in vivo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El tomillo representa una alternativa accesible, de bajo costo y ambientalmente sostenible, en especial para los sistemas de producción rurales. Su uso podría contribuir a reducir la dependencia de los antibióticos sintéticos y mitigar la resistencia a los antibióticos, mejorar la sanidad animal sin comprometer la inocuidad de los productos de origen animal, siendo más seguro para los consumidores.

Los hallazgos de esta investigación permiten rechazar la hipótesis nula (H0), ya que mostró que la aplicación del extracto de tomillo en diversas concentraciones, sí presentan un efecto significativo sobre la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*. En consecuencia, se acepta la hipótesis alternativa (Ha), confirmando que el extracto reduce de manera significativa la carga bacteriana bajo condiciones in vitro.

El extracto de tomillo demostró una eficacia superior a los antibióticos convencionales, logrando una inhibición relativa del 96.26% en su concentración máxima, frente al 22% de las tetraciclinas. Incluso en la dosis más baja del 25% del extracto, mantuvo una inhibición eficiente con halos de 19,23 mm, confirmando que el fitobiotico posee mayor estabilidad temporal y potencial antibacteriano, presentándose como una alternativa viable para reducir el uso de fármacos en la producción animal.

Los antibióticos comerciales de la variedad de las tetraciclinas presentaron halos de inhibición promedios de 3,72 mm y 6,75 mm, posicionándose en el grupo estadístico de menor sensibilidad lo que sugiere que se encuentra presente la resistencia a estos antibióticos por parte de la *E. Coli* evaluada.

Podemos concluir que debido al excesivo uso de antibióticos en la producción ganadera, y en la normalización del uso de tetraciclinas ante infecciones bacterianas han generado que cepas como la *E. Coli* se vuelvan resistentes a las mismas, además de que sus residuos se impregnan en la materia prima de consumo, por lo que el implemento del uso de los extractos, influiría mucho a nivel de salud, como se ha determinado en esta investigación, los extractos naturales llegan a funcionar incluso con mayor eficacia que estos productos farmacéuticos, tiene una mayor facilidad de eliminación del sistema que los antibióticos e incluso ofrecen mayores beneficios, comprobando que su aplicación puede llegar a beneficiar a los animales, productores y consumidores.

Recomendaciones:

Realizar ensayos in vivo en animales de interés zootécnico para evaluar la eficacia del extracto de *Thymus vulgaris* sobre parámetros productivos, sanitarios e inmunológicos, considerando dosis evaluadas en esta investigación entre 100 y 500 mg/kg de dieta según especie.

Complementar estudios con una caracterización química mediante el HPLC que permitan cuantificar con precisión las concentraciones de Timol y Carvacrol con el fin de estandarizar el extracto y mejorar la reproducibilidad de los resultados.

Evaluar extractos etanólico de otras plantas y comparar la eficacia con la del tomillo, como orégano, canela, o clavo de olor, usando el mismo diseño experimental para comparar su eficacia con diferentes patógenos como la *E. coli*.

Se sugiere implementar el extracto de tomillo como tratamiento complementario a los protocolos convencionales de sanidad en especial las producciones con antecedentes de resistencia antimicrobiana, con el fin de reducir las dosis y frecuencias de uso de antibióticos sintéticos sin comprometer la eficacia del control bacteriano.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam Kowalczyk., M. P. (2020). *Timol y aceite esencial de tomillo: nuevos conocimientos sobre aplicaciones terapéuticas seleccionadas*. Faculty of Pharmacy, Wroclaw Medical University.
- Ahangaran, M. G. (2021). *Suplementación con timol y carvacrol en la salud y el rendimiento avícola*. Medicina y ciencia veterinaria. Volumen 8, Número 1págs. 267-288.
- Álvarez, J. V. (2020). *Potencial de los aceites esenciales en la salud animal: Revisión de alternativas*. Editorial Universitaria.
- Álvarez, J. V. (2020). *Potencial de los aceites esenciales en la salud animal: Revisión de alternativas*. Editorial Universitaria.
- Benítez, Á. S. (2020). *Efecto del aceite esencial de Thymus vulgaris en la respiración de Escherichia coli uropatógena*. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma De Puebla.
- Bingshen Liu, Z. S. (2025). *Genes de resistencia a antibióticos en el sistema suelo-planta modificado con estiércol animal: presencia, transmisión, huéspedes bacterianos y riesgos para la salud humana*. Ecotoxicología y seguridad ambiental.
- Boto, A. G. (2020). *Resistencia antimicrobiana: Una preocupación global*. Revista Cubana de Farmacia, 54(2), e363.
- Calvopiña Montenegro, P. C.-E.-G.-P.-B. (2024). *Presencia y resistencia antimicrobiana de Escherichia coli BLEE en muestras fecales de bovinos productores de leche al norte de Ecuador*. Siembra, 11.
- Carbajal González, L. M. (2014). *Actividad de antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de Thymus sp L.(Tomillo} contra Staphylococcus aureus*. Perú : Universidad Nacional "San Luis Gonzaga' De Ica.

- Castillo, L. (2016). *Probióticos y prebióticos como alimentos funcionales en nutrición animal*. Bogotá: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales.
- Benítez, Á. S. (2020). *Efecto del aceite esencial de Thymus vulgaris en la respiración de Escherichia coli uropatógena*. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma De Puebla.
- Bingshen Liu, Z. S. (2025). *Genes de resistencia a antibióticos en el sistema suelo-planta modificado con estiércol animal: presencia, transmisión, huéspedes bacterianos y riesgos para la salud humana*. Ecotoxicología y seguridad ambiental.
- Boto, A. G. (2020). *Resistencia antimicrobiana: Una preocupación global*. Revista Cubana de Farmacia, 54(2), e363.
- Calvopiña Montenegro, P. C.-E.-G.-P.-B. (2024). *Presencia y resistencia antimicrobiana de Escherichia coli BLEE en muestras fecales de bovinos productores de leche al norte de Ecuador*. Siembra, 11.
- Carbajal González, L. M. (2014). *Actividad de antibacteriana de los extractos acuoso y etanólico de Thymus sp L.(Tomillo) contra Staphylococcus aureus*. Perú : Universidad Nacional "San Luis Gonzaga" De Ica.
- Castillo, L. (2016). *Probióticos y prebióticos como alimentos funcionales en nutrición animal*. Bogotá: Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales.
- Caneschi, A. (2023). *Aceites esenciales vegetales como herramienta en el control de la mastitis bovina: una actualización*. Departamento de Ciencias Médicas Veterinarias.
- Cuello, J. M. (2018). *Evaluación Del Aceite Esencial De Canela (Cinnamozeylanicum) En Pollos De Engorde Cobb 500 Infectados Con Salmonella Typhimurium*". Cevallos : Universidad Técnica De Ambato.
- CLSI, C. a. (2021). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. (31st ed.)*. CLSI Document M100. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Disinfectants, C. C. (2024). *Directriz Para La Desinfección Y Esterilización En Centros De Salud*. Centers For Disease Control And Prevention.

- Duarte, E. A. (2024). *Efecto Fitobiótico Del Extracto De Tomillo (Thymus Vulgaris) En Pollo De Engorde, Chiquimula*. Universidad De San Carlos De Guatemala.
- (EFSA), E. F. (2012). *EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP)*. European Food Safety Authority (EFSA).
- García, L. R. (2018). *Alimentación de cerdos de crecimiento a finalización adicionando un fitobiótico a base de tomillo y algarrobo*. México: Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en.
- García-García, R. M. (2008). *Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos*. Puebla: Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas –.
- Gaona, S., & Matabay, R. (2017). *Impacto de las Compras Públicas en las Asociaciones de Producción Textil de la Economía Popular y Solidaria en la Ciudad de Quito, en el Periodo 2014-2016*. Quito: Universidad Central del Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/bitstream/25000/10828/1/T-UCE-0005-100-2017.pdf>
- Gobierno de Ecuador, M. d. (2022). *Normativa de bioseguridad en laboratorios clínicos y de investigación*. Gobierno de Ecuador, Ministerio de Salud Pública.
- Hina Malik, R. S. (2023). *Revisión del uso de antibióticos y la resistencia en la producción animal de alimentos en la Región de Asia Sudoriental de la OMS*. *Revista de Infecciones y Salud Pública*, pág 172-182.
- Ley de Economía Popular y Solidaria*. (2012). Obtenido de <https://www.seps.gob.ec/wp-content/uploads/Reglamento-General-de-la-Ley-Organica-de-Economia-Popular-y-Solidaria.pdf>
- López, F. S. (2020). *Bioseguridad en granjas: Un pilar contra las enfermedades entéricas*. *Revista de Producción Animal*, 32(4), 112-125.
- Maldonado Rivera, C. V. (2023). *Revisión bibliográfica de la planta Thymus vulgaris L. (Tomillo) y su potencial uso como agente antioxidante y antimicrobiano en la industria alimentaria*. Universidad del Atlántico.
- Marín, A. B. (2020). *Mecanismos de acción del timol y el carvacrol en la inhibición bacteriana*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 12(2), 235-245.

- Mejía López, A., Herrera, B., & Salazar, M. (2017). *Tomillo (Thymus vulgaris) como agente antimicrobiano en la producción de queso fresco*. *Revista Amazónica: Ciencia y Tecnología*
- Ortiz, G. P. (2024). *Manual de manejo de residuos biológico-infecciosos (RPBI) en laboratorios de investigación*. Instituto Nacional de Salud Pública. INSP.
- OIE. (2016). *Estrategia de la OIE sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos y su uso prudente*. . Organización Mundial de Sanidad Animal .
- ONU, O. d. (2020). *La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe*. CEPAL.
- OPS. (2017). *Zoonosis Salud Animal*. Organización Panamericana de la Salud.
- OIE . (2016). *Estrategia de la OIE sobre la resistencia a los agentes antimicrobianos y su uso prudente*. Obtenido de <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/es-oie-amrstrategy.pdf>
- OPS. (s.f.). *Organización Panamericana de la Salud*. Obtenido de Resistencia antimicrobiana en la producción animal.: <https://www.paho.org/es/panaftosa/resistencia-antimicrobiana-produccion-animal>
- OMSA, O. M. (2023). *La resistencia a los antimicrobianos*. Organización Mundial de Sanidad Animal.
- Ramírez, C. &. (2022). *El impacto del uso de antibióticos en la flora intestinal de animales de producción*. *Revista Veterinaria Argentina*, 28(285).
- Recalde, A. &. (2024). *Datos adaptados de Anuario agroclimatico* . Centro de Publicaciones PUCE.
- Rodríguez, J. (2020). *La microbiota y los probióticos en el ámbito veterinario*. ed. Zaragoza.
- Paredes et al, P. e. (2021). Prevalencia y resistencia a los antimicrobianos de *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* en los alimentos para animales en Colombia. *Organización Panamericana de la salud*, 1.

- Peñaloza Piña, L. M. (2021). Peñaloza Piña, Lucía Maribel, & Aspiazu Hinostr
Mecanismos de resistencia de Escherichia Coli en América Latina. *Peñaloza Piña, Lucía Maribel, & Aspiazu Hinostr*, Karla Alexandra. (2021). *Mecanismos de re Vive Revista de Salud*, 90-103.
- Porras, F. D. (2022). Evaluación de la resistencia a los antibióticos de cepas de Escherichia coli aisladas en carne de cerdo comercializada en los mercados municipales de la ciudad de Guatemala. *Ciencia, Tecnología y Salud* , 7.
- Sandner, G. (2020). *Actividades inmunomoduladoras de aceites esenciales seleccionados*. University of Applied Sciences Upper Austria.
- Sauerbrei A. et al. (2020). *Bactericidal and virucidal activity of ethanol and povidone-iodine*. Obtenido de Journal of Hospital Infection: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7520996/>
- Sarah Saci, E.-h. N. (2025). *Explorando el extracto de Thymus vulgaris como agente fitoterapéutico: un enfoque multifacético para abordar la colibacilosis aviar y la resistencia a los fármacos*. Elsevier Inc.
- Senasica. (2023). *Plan Estratégico Contra La Resistencia A Los Antimicrobianos (RAM)*. México: Secretaría De Agricultura Y Desarrollo Rural.
- Solano, G. C. (2021). *Aditivos naturales en la producción de rumiantes*. Universidad Nacional de Costa Rica.
- Ulloa-Vergara, M. (2025). *Estudio comparativo de la acción bactericida del Thymus vulgaris L. (Tomillo) en concentraciones del 25%, 50% y 100% vs la clorhexidina al 2%*. Universidad Internacional del Ecuador.
- Valdivieso, A., Siluk, C., & Michelin, C. (2022). Análisis Prospectivo Estratégico del Sector Textil Productivo Ecuatoriano para Incrementar la Competitividad en las Exportaciones. *SIGMA*, 13. doi:<https://doi.org/10.24133/sigma.v9i02.2827>
- Van Boeckel TP, B. C. (2015). *Tendencias globales en el uso de antimicrobianos en animales destinados al consumo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 5 de mayo de 2015;112(18):5649-54. doi: 10.

- Verde-Star, M.J., García-González, S., & Rivas-Morales, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales.
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España: OmniaScience. 1-40.
- Ulloa-Vergara, M. (2025). *Estudio comparativo de la acción bactericida del Thymus vulgaris L. (Tomillo) en concentraciones del 25%, 50% y 100% vs la clorhexidina al 2%*. Universidad Internacional del Ecuador.
- Van Boeckel TP, B. C. (2015). *Tendencias globales en el uso de antimicrobianos en animales destinados al consumo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 5 de mayo de 2015;112(18):5649-54. doi: 10.
- Wells, C. W. (2023). *Efectos de los aceites esenciales sobre las características económicamente importantes de las especies de rumiantes: una revisión exhaustiva*. ScienceDirect.
- Zeng, Z. (2015). *Aceites esenciales y plantas aromáticas como aditivos alimentarios en la nutrición de no rumiantes: una revisión*. Revista de ciencia animal y biotecnología.
- Zhai, H. (2018). *Potencial de los aceites esenciales para aves y cerdos*. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.005> .

ANEXOS



