



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**TESIS DE LICENCIATURA**

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE  
ESENCIAL DE ROMERO CONTRA BACTERIAS  
ASOCIADAS A MASTITIS**

**Para obtener el título de Médica Veterinaria Zootecnista**

**PRESENTA**

Edith Yañez Mejía

**Director**

Dr. Adrian Zaragoza Bastida

**Codirectora**

Dra. Nallely Rivero Pérez

**Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, abril del 2025**



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**TESIS DE LICENCIATURA**

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE  
ESENCIAL DE ROMERO CONTRA BACTERIAS  
ASOCIADAS A MASTITIS**

**Para obtener el título de Médica Veterinaria Zootecnista**

**PRESENTA**

Edith Yañez Mejía

**Director**

Dr. Adrian Zaragoza Bastida

**Codirectora**

Dra. Nallely Rivero Pérez

**Asesores**

M en C. Ana Lizet Morales Ubaldo

Dra. Deyanira Ojeda Ramírez

Dr. José Esteban Aparicio Burgos

**Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, abril del 2025**



# Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

*Institute of Agricultural Sciences*

**Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

*Academic Area of Veterinary Medicine and Zootechnics*

Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, a 20 de abril del 2025

**Asunto:** Autorización de impresión

**Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado**

Directora de Administración Escolar de la UAEH

Por este conducto y con fundamento en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 40 del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado que le fue asignado a la pasante de la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia **Edith Yañez Mejia**, quien presenta el trabajo de Tesis denominado “**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO CONTRA BACTERIAS ASOCIADAS A MASTITIS**”, que después de revisarlo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión de este, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los miembros del jurado:

**PRESIDENTE** Dr. Adrian Zaragoza Bastida

**SECRETARIO** Dra. Nallely Rivero Perez

**VOCAL 1** M en C. Ana Lizet Morales Ubaldo

**VOCAL 2** Dra. Deyanira Ojeda Ramírez

**SUPLENTE 1** Dr. José Esteban Aparicio Burgos

Sin otro particular por el momento, me despido de usted.

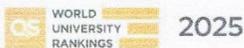
Atentamente

“Amor, Orden y Progreso”

**Dra. Maricela Ayala Martínez**  
**Coordinadora de Programa**  
**Educativo de Medicina Veterinaria**  
**y Zootecnia.**

Avenida Universidad #133, Col. San Miguel Huatengo,  
Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hidalgo,  
México: C.P. 43775.  
Teléfono: 7717172001 Ext. 42105  
mvzjefatura@uaeh.edu.mx

“Amor, Orden y Progreso”



uaeh.edu.mx

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a todas las personas y seres que me apoyaron a mi formación académica, por ser un pilar en mi crecimiento personal y por guiarme en este camino que apenas está comenzando.

# INDICE

INDICE.....	i
I. ÍNDICE DE TABLA.....	iii
II. GLOSARIO DE TERMINOS.....	iv
III. RESUMEN.....	v
IV. ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1. Importancia de la ganadería en México.....	8
2.2. Mastitis.....	9
2.3. Resistencia antimicrobiana.....	10
2.4. Aceites esenciales y su función en la medicina veterinaria.....	11
2.5. <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero).....	11
2.5.1. Clasificación taxonómica.....	11
2.6. Importancia en la medicina tradicional y moderna.....	12
2.6.1. Propiedades farmacológicas.....	12
2.7. Agentes patológicos contagiosos y ambientales.....	13
2.7.1. <i>Enterococcus</i> spp.....	13
2.7.2. <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	14
2.7.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	14
2.7.4. <i>Serratia liquefaciens</i> .....	15
2.7.5. <i>Escherichia coli</i> .....	15
2.7.6. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
4. JUSTIFICACIÓN.....	18
5. HIPOTESIS.....	19
6. OBJETIVOS.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
7.1. Sitio de colecta.....	21

7.2.	Identificación de la planta.....	22
7.3.	Extracción del aceites esenciales <i>Rosmarinus officinalis</i> . .....	22
7.4.	Prueba de esterilidad del aceite de romero. ....	22
7.5.	Material biológico.....	23
7.6.	Reactivación de las cepas bacterianas .....	23
7.7.	Preparación del inóculo .....	23
7.8.	Actividad antibacteriana .....	23
7.8.1.	Método de difusión en disco.....	24
7.8.2.	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) .....	24
7.8.3.	Concentración Mínima Bactericida (CMB) .....	25
7.8.4.	Efecto Bactericida y Bacteriostático.....	25
7.9.	Análisis estadístico .....	25
8.	RESULTADOS.....	26
8.1.	Rendimiento del aceite esencial de romero. ....	26
8.2.	Actividad antibacteriana .....	26
8.2.1.	Método de difusión en disco.....	26
8.2.2.	Concentración Mínima Inhibitoria y Concentracion Mínima Bactericida ...	27
9.	DISCUSIÓN.....	28
10.	CONCLUSIÓN. ....	31
11.	REFERENCIAS. ....	32

## I. ÍNDICE DE TABLA

<b>Tabla 1.</b> Resultados de los halos de inhibición (mm) del AER de contra bacterias asociadas con mastitis. ....	26
<b>Tabla 2.</b> Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del AER contra bacterias asociadas con mastitis (mg/mL). ....	27

## II. GLOSARIO DE TERMINOS

---

Término	Significado
ATCC	Colección Americana de cultivos de referencia (por sus siglas en inglés: American Type Culture Collection)
AE	Aceite esencial
AER	Aceite esencial de romero
RAM	Resistencia antimicrobiana
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida

---

### III. RESUMEN

La mastitis es una inflamación del parénquima del tejido de la ubre que causa cambios patológicos en el tejido glandular y anomalías en la leche, lo que lleva a pérdidas económicas significativas para la industria lechera en México y todo el mundo.

El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* contra bacterias asociadas a mastitis, para proponerlo como una alternativa de tratamiento. Se extrajo el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* por arrastre de vapor y se determinó su actividad antibacteriana por medio de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB) y su relación de estas para determinar el efecto antibacteriano.

El AER mostró actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, evidenciando halos de inhibición de 11.5 mm y 13.5 mm, respectivamente. Se determinó un efecto bactericida contra el 50% de las cepas evaluadas, con diferencias significativas en las concentraciones de CMI y CMB ( $P = 0.00001$ ). *Pseudomonas aeruginosa* presentó la mayor CMI y *Serratia liquefaciens* mostró la menor eficacia bactericida con una relación de CMB/CMI de 8.9.

Estos resultados sugieren el potencial del AER como alternativa antibacteriana contra bacterias asociadas a mastitis resistentes a antimicrobianos convencionales, sin embargo, se requiere de estudios adicionales que identifiquen el metabolito que le confiere la actividad antibacteriana y garanticen su evaluación en modelos *in vivo*.

**Palabras clave:** Mastitis, resistencia antimicrobiana, aceite esencial, *Rosmarinus officinalis*.

## IV. ABSTRACT

Mastitis is an inflammation of the udder tissue parenchyma that causes pathological changes in glandular tissue and abnormalities in milk, leading to significant economic losses for the dairy industry in Mexico and worldwide.

The objective of the present study was to determine the antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil against bacteria associated with mastitis, to propose it as an alternative treatment. *Rosmarinus officinalis* essential oil was extracted by steam distillation and its antibacterial activity was determined by means of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and their ratio to determine the antibacterial effect.

The AER showed antibacterial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, showing inhibition halos of 11.5 mm and 13.5 mm, respectively. A bactericidal effect was determined against 50% of the strains evaluated, with significant differences in MIC and MBC concentrations ( $P = 0.00001$ ). *Pseudomonas aeruginosa* had the highest MIC and *Serratia liquefaciens* showed the lowest bactericidal efficacy with an MBC/MIC ratio of 8.9.

These results suggest the potential of AER as an antibacterial alternative against bacteria associated with mastitis resistant to conventional antimicrobials; however, additional studies are required to identify the metabolite that confers the antibacterial activity and ensure its evaluation in in vivo models.

**Keywords:** mastitis, antimicrobial resistance, essential oil, *Rosmarinus officinalis*.

# 1. INTRODUCCIÓN

En México existen diversos tipos de sistemas de producción de leche, con diferencias en nivel y alcance, desde sistemas altamente tecnificados hasta los sistemas familiares de traspatio (Gallegos-Daniel, 2023).

El sistema de producción láctea es categorizado como de los principales sustentos del sector agroalimentario mexicano y el tercero en importancia dentro del subsector pecuario, después de la carne bovina y avícola, esto debido a su gran impacto económico, social y culturales, en especial, por suministrar un alimento básico para la población mexicana (Álvarez Macías, 2024).

Los bovinos especializados en producción de leche se ven afectados por diversas enfermedades entre ellas y una de las más importantes es la mastitis, esta enfermedad ataca con mayor prevalencia a las hembras especializadas en la producción láctea, esta enfermedad produce una disminución tanto de la calidad como de la producción de leche ( Bonestroo et al., 2023).

Los patógenos de la mastitis se clasifican como contagiosos y/o ambientales, siendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma* spp. los patógenos más comunes que provocan mastitis contagiosa, por otro lado, los enterococos son agentes causales ambientales de la mastitis, con infecciones causadas principalmente por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* (Jin Kim, 2022).

El tratamiento para la mastitis se basa en la administración parenteral de antimicrobianos y actualmente por el mal uso de estos medicamentos ha aparecido cepas bacterias resistentes a diferentes antimicrobianos.

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en uno de los problemas de salud más alarmantes a nivel mundial y se considera una amenaza global para la salud pública, el uso indebido y excesivo de los antimicrobianos es el principal factor que determina la aparición de patógenos farmacorresistentes (OMS, 2021).

La RAM pone en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de una serie de infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos (OPS, 2021). Lo que da como resultado la exhaustiva búsqueda por nuevas alternativas funcionales para el tratamiento de bacterias resistentes a antimicrobianos.

El uso de los aceites esenciales ha sido fundamental para esta labor; en este estudio se utilizó el aceite esencial de romero, este contiene numerosos compuestos bioactivos naturales con diferentes efectos farmacológicos, especialmente potencial antimicrobiano (Vázquez Rodríguez, 2015).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* contra bacterias asociadas a mastitis, para proponerlo como una alternativa de tratamiento.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Importancia de la ganadería en México

La ganadería es uno de los motores más importantes del sector agroalimentario en México, debido que es una fuente importante de alimentación humana, la leche proporciona nutrientes esenciales y es una fuente importante de energía alimentaria, proteínas de alta calidad y grasas, el (SIAP, 2024) reportó que se obtuvieron tres mil 184 millones de litros, dato superior en 59 millones más a lo obtenido en el mismo trimestre del año previo que fue de tres mil 125 millones, es decir, 1.9 por ciento de incremento.

En el mes de marzo se reportó con una cifra de 3 mil 184 millones litros solo en producción nacional para consumo local y con 44 millones litros de exportación, lo que nos indica la alta demanda de este producto alimenticio, el 13 de mayo del 2024 fue el último reporte sobre el consumo per-capita de la población mexicana, que es de 131litros (LICONSA, 2024).

La calidad de los productos lácteos es una preocupación constante en el sector ganadero ya que la NOM-243-SSA1-2010 nos indica la leche únicamente se puede denominar al líquido que se obtiene de las glándulas mamarias de vacas sanas o de cualquier otra especie de mamífero, la cual cuenta con características nutrimentales adecuadas para incluirla, junto con sus derivados, dentro de la alimentación diaria.

Esto nos hace mirar hacia la existencia de numerosas enfermedades que pueden adquirir el ganado y afectar la producción y por ende la calidad de dicho producto, siendo la mastitis la inflamación de las glándulas mamarias o la ubre una de las enfermedades más importantes que afectan al ganado bovino disminuyendo la cantidad, calidad y condición de la leche incluyendo los cambios drásticos en el sabor, color y olor de la leche (Amber et al., 2018).

Esta enfermedad es un riesgo que no sólo afecta a los animales, también impacta en la economía nacional, pues se estima que podría causar pérdidas en la producción láctea hasta del 30 por ciento argumento (MSD, 2022).

## 2.2. Mastitis.

La mastitis es una enfermedad devastadora para los animales lecheros que afecta el bienestar animal que reduce el rendimiento y la calidad láctea, se clasifica según la epidemiología, contagiosa, ambiental y oportunistas producida por numerosos agentes tanto bacterias Gramm negativas y Gramm positivas, entre ellas *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus agalactiae* (*S. agalactiae*) y *Mycoplasma spp.*

Se transmiten de una vaca infectada a una vaca sana, generalmente en el momento del ordeño, a través de las manos, toallas y/o la máquina de ordeño. (Sharun, y otros, 2021), (Morales-Ubaldo et al., 2023).

Actúan como reservorios bacterianos y las ambientales causada por bacterias que se encuentran principalmente fuera de la sala de ordeño, es decir, las bacterias que provienen del entorno de la vaca, como el material de cama, el suelo, el estiércol, las heces y el agua estancada y está altamente influenciada por las prácticas de manejo (Cheng, 2020).

Sin embargo, la infección no solo se produce a raíz de una intervención patógena sino al consiguiente cambio de la microbiota mamaria de una disminución de los comensales, a un aumento de los patobiontes autóctonos existentes, lo que da como resultado disbiosis mamaria.

La sobrepoblación de la microbiota comensal suprime los patobiontes autóctonos existentes, desencadenados por factores externos, por ejemplo, dieta, medicación (uso inadecuado de fármacos), entorno higiénico y por motivos internos como enfermedades de la ubre (Maity, 2021).

Las interacciones del hospedero con patógenos han sugerido que las variaciones en la ecología microbiana de la ubre dependen del estado fisiológico de la vaca, las características anatómicas de la ubre, los rasgos genéticos asociados con la respuesta inmunológica y los factores ambientales (Maity, 2021).

### 2.3. Resistencia antimicrobiana.

La resistencia antimicrobiana es uno de los problemas más importantes en la actualidad por ser una gran amenaza a la salud animal y la salud humana alrededor de todo el mundo, debido al mal uso que se le dio a numerosos fármacos el (INEGI, 2023) reporto el incremento de las ventas de medicamentos de uso humano en el 2022, si bien el problema de la resistencia antimicrobiana que hoy en día es un gravísimo problema no se originó en estos años, esas cifras nos dan una pauta del uso desmedido en venta y compra de medicamentos.

Las bacterias utilizan su capacidad evolutiva para adaptarse al constante cambio selectivo ejercido por los tratamientos con antibióticos, lo que nos origina que exista una eficacia reducida de la intervención terapéutica contra las infecciones humanas y animales.

Los mecanismos responsables de la resistencia a los antimicrobianos tanto innata como adquirida incluyen en elementos genéticos que permiten la difusión constante de patógenos altamente resistentes entre los ecosistemas de diversos sectores, como la medicina humana, la medicina veterinaria y el medio ambiente (Palma, 2020).

La prevalencia de mastitis resultó en el uso extensivo de antibióticos, intramamarios y parenterales. Se revelaron que el 90% de los residuos de antibióticos en la leche son consecuencia de la terapia de mastitis (Kovacević, 2021).

Se han descrito varios mecanismos posibles para el desarrollo de resistencia a los agentes antimicrobianos, entre los que se incluyen la infiltración retardada de los agentes antimicrobianos a través de la matriz del biofilm, la tasa de crecimiento de los organismos del biofilm y el aumento de patógenos resistentes a los antimicrobianos como consecuencia del uso excesivo de antibióticos durante el período seco de la vaca (Maity, 2021).

Actualmente los tratamientos antibióticos tradicionales provocan fácilmente la aparición de cepas resistentes. Los resultados de la terapia antibacteriana en la mastitis pueden estar relacionados no sólo con la sensibilidad antibiótica de los factores etiológicos, sino también con su capacidad de portar integrones y genes de virulencia por parte de los agentes patológicos que pueden estar presentes en esta enfermedad (Turkyilmaz, 2023).

Se han encontrado la aparición de la RAM como penicilina, amoxicilina, tetraciclina, amikacina, gentamicina o eritromicina, piperacilina, ceftazidima, cefquinoma, tigeciclina, colistina y vancomicina, incluyendo el problema de los residuos de medicamentos también está aumentando. Frente al continuo crecimiento de patógenos resistentes a los antibióticos, existe la necesidad de encontrar nuevos compuestos antimicrobianos (Morales Ubaldo, 2023).

#### 2.4. Aceites esenciales y su función en la medicina veterinaria.

Los AE son líquidos aromáticos y volátiles extraídos de materiales vegetales como flores, semillas, hojas, brotes, hierbas, corteza, madera, frutos y raíces. Los componentes presentes en los aceites esenciales son producidos como metabolitos secundarios por las plantas para ayudar a su supervivencia frente a los estresores ambientales, incluidos los patógenos (Aber, 2021).

La historia mundial menciona, que para las civilizaciones fue de importancia relevante el uso culinario que dieron a las plantas, así como en la composición de perfumes y medicinas, siendo esta última de uso terapéutico tradicional en todas las culturas (Flores Villa, 2020).

#### 2.5. *Rosmarinus officinalis* (Romero).

##### 2.5.1. Clasificación taxonómica

Es una planta herbácea perteneciente a la familia *Lamiaceae*, del género *Salvia*, del subgénero *Rosmarinus*, es originaria del mediterráneo, pero actualmente se distribuye por todo el mundo. su período de floración es de mayo a junio y el de fructificación es de primavera a verano (Borges, 2018).

Dentro de la familia *Lamiaceae* destaca la importancia del género *Rosmarinus*, que contiene las siguientes especies: *R. laxiflorus*, *R. eriocalyx*, *R. tomentosus*, *R. lavandulaceus* y *R. officinalis*, siendo esta última la más utilizada, gracias a que sus metabolitos secundarios que se encuentran en casi todas las partes de la planta (hojas, tallos, flores y raíces) mostrando éstas una gran variedad de actividades biológicas benéficas (Ali, 2019).

La planta de romero es un arbusto aromático leñoso con hojas perennes fragantes en forma de aguja. Crece hacia arriba y puede extenderse hasta una altura de 2 m. Las hojas son de 2-4 cm de largo y 2-5 mm. ancho, verde arriba y blanco abajo con pelos lanudos cortos y densos. Las diferentes variaciones de la planta pueden dar lugar a el crecimiento de ramas y flores de diferentes colores (blancas, rosadas, moradas o azules) (Banjaw, 2024). Estas variaciones de plantas de romero pueden modificar el rendimiento de aceite y los compuestos químicos del romero.

## 2.6. Importancia en la medicina tradicional y moderna.

Durante la antigüedad y la actualidad se ha usado el romero en infusiones, extractos, bálsamos, aceite esencial, alcoholes, etc. para su uso externo o interno, debido a sus propiedades antisépticas (antibacteriano y antifúngico), antiespasmódicas, anticonvulsivas, antiinflamatoria, colerética y colagoga, además de estar demostrado su potencial como antioxidante (Vázquez Rodríguez, 2015).

Su aceite esencial y extractos son antimicrobianos con propiedades antioxidantes (Basheer, 2018), anti-hepatotóxicos, anti-nefrotóxicos, antiinflamatorios, antitumorales, antihelmínticos (Zoral, 2018).

### *2.6.1. Propiedades farmacológicas*

Los componentes con propiedades farmacológicas se agrupan en flavonoides, terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos) y derivados hidroxicinámicos (Ali, 2019).

En el romero se encuentran dos principales constituyentes activos: los flavonoides (como la diosmetina, diosmina, hispidulina, apigenina, luteolina y sinensetina, entre otros) y triterpenoides (como la rosmariquinona, el ácido carnósico, ácido ursólico, ácido oleanólico y la picrosalvina, entre otros). La actividad antimicrobiana de los extractos y aceite esencial del romero es atribuida principalmente al  $\alpha$ -pineno, el acetato de bornilo, el alcanfor y el 1,8-cineol (Ebrahimi, 2020).

## 2.7. Agentes patológicos contagiosos y ambientales.

La mayoría de los agentes patógenos aislados en esta enfermedad son estafilococos, estreptococos y coliformes, pero otros microorganismos pueden infectar el ubre (Olivares-Pérez et al., 2015).

### 2.7.1. *Enterococcus spp.*

Son bacterias Gram positivas que viven en los tractos gastrointestinales de humanos y otros animales. *Enterococcus spp.* puede sobrevivir en el medio ambiente durante largos períodos de tiempo y puede infectar las glándulas mamarias (Jin Kim, 2022).

Se considera el principal patógeno ambiental causante de mastitis. Los enterococos se encuentran comúnmente en los intestinos de los animales y sus heces, debido al uso sin medida de antibióticos orales (Gao, 2019).

Algunas cepas de enterococos pudieron adaptarse, cambiando la microbiota propiciando la infección a ubres de manera ambiental y con un mal manejo en ordeñadoras y operadores de ordeñadoras.

Se reportado que *E. faecalis* está en alimentos de origen animal, incluida la carne, la leche y sus productos, y se ha relacionado con enfermedades en la población humana como la infección del tracto urinario. Los estudios han informado de la presencia de factores de virulencia que facilitan la adherencia y la colonización, la citólisis y la diseminación de *E. faecalis* en el hospedero (Hashem, 2021).

Aunado a lo anterior, *E. faecalis* tiene una maquinaria formadora de biopelículas que permite que la bacteria se adhiera a superficies bióticas y abióticas que confieren resistencia antimicrobiana adicional (Jin Kim, 2022).

*Enterococcus faecalis* posee resistencia intrínseca a los antibióticos comerciales, como las cefalosporinas, aminoglucósidos, clindamicina y trimetoprima-sulfametoxazol, ampicilina y vancomicina (García-Solache, 2019). Debido a su resistencia en evolución, la mastitis causada por *E. faecalis* podría ser difícil de tratar con la mayoría de los antimicrobianos comerciales (Sattar Bag, 2022)

*Enterococcus faecium*, es una bacteria oportunista (Wei, 2024), resistente a una variedad de antibióticos, incluidos aminoglucósidos, macrólidos,  $\beta$ -lactámicos y tetraciclinas (Liu, 2024)

### 2.7.2. *Stenotrophomonas maltophilia*.

Es una bacteria oportunista y ambiental (Brooke, 2021). Estas células bacterianas son Gram negativas, de morfología uniforme y se presentan bacilos cortos, delgados, rectos o curvados, aislados o en pares. La movilidad se debe a dos o más flagelos polares, puede sobrevivir en casi cualquier ambiente acuático o húmedo donde puede persistir durante largos periodos (Răpuncean, 2021) por lo tanto *S. maltophilia* puede migrar del intestino a la glándula mamaria e inducir mastitis (He, 2023).

*S. maltophilia* tiene la capacidad para producir biopelículas como un gen fuerte de virulencia por lo tanto esta bacteria posee una alta resistencia a los antibióticos, tales como beta lactamicos, aminoglucósidos, quinolonas, macrólidos, trimetoprima/sulfametoxazol, tetraciclinas, fenicoles y polimixinas (Ocak, 2023).

### 2.7.3. *Pseudomonas aeruginosa*.

Es un patógeno oportunista y ambiental que puede provocar mastitis subclínica dentro los hatos lecheros, debido que esta bacteria está ampliamente presente en áreas húmedas, lugares con un mal manejo sanitario e higiénico de los animales y utensilios. El curso más común se caracteriza inicialmente por mastitis leve que evoluciona a una etapa de infección crónica (Schauer, 2021)

Es una bacteria Gram-negativa pueden poseer varios factores de virulencia responsables de su patogenicidad, entre ellos es la exotoxina A (*tox A*) y la exoenzima S (*exo S*) son dos cepas asociadas con la infección de mastitis subclínica en bovinos (Banerjee, y otros, 2017)

En el estudio de (Turkyilmaz, 2023) se encontró la relación de *Pseudomonas aeruginosa* y su RAM a numerosos antibióticos como el ciprofloxacino, netilmicina, cefoperazona, amikacina, aztreonam, enrofloxacin.

La presencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a los antibióticos en tratamientos enfocados a mastitis puede suponer un riesgo para la salud pública, debido a la

facilidad con la que las bacterias pueden transmitir sus genes de resistencia a los seres humanos a través del consumo de alimentos.

#### 2.7.4. *Serratia liquefaciens*.

Es un bacteria Gram negativas que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, esta bacteria se puede encontrar en diversos entornos y hospederos, como suelo, insectos, plantas, agua y materias primas alimentarias, en estas podemos encontrar *Serratia* spp. produciendo de lipasa y proteasa resistente al calor en la leche cruda fría (Begrem, 2021).

La contaminación por un mal manejo a la hora de la limpieza, por ejemplo, productos inadecuados para la limpieza de pezones antes o después de la ordeña, han reportado infección con *Serratia* spp. (Friman, 2019).

#### 2.7.5. *Escherichia coli*.

Es un patógeno altamente contagioso que invaden y se multiplican en la ubre de la vaca, inducen una respuesta inmune del hospedero y se eliminan rápidamente (Cheng, 2020).

Es uno de los principales agentes etiológicos de la mastitis clínica aguda en el ganado lechero, *Escherichia coli* comprende un grupo heterogéneo de residentes comensales del intestino, por ello y debido a la flexibilidad de su genoma, ha evolucionado para causar mastitis tras la contaminación fecal de la piel del pezón, *E. coli* causa infecciones predominantemente agudas, de corta duración entre 10 a 30 días (Goulart, 2022).

Algunas cepas de *E. coli*, son bacterias comensales naturales del tracto gastrointestinal de los bovinos, por lo cual es más probable que *E. coli* de ganado afectado por mastitis sea oportunista, por lo cual un sistema inmunológico deficiente, particularmente durante el periparto cuando se reduce el reclutamiento de leucocitos a la glándula mamaria, dejando indefensa la ubre y propiciando a que haya una infección bacteriana (Goulart, 2022).

Debido a que es una de las enfermedades de producción más frecuentes y costosas del ganado lechero. Con frecuencia se trata con antimicrobianos de amplio espectro lo que ha provocado su RAM, por lo tanto, *E. coli* exhibió resistencia contra oxacilina y sulfametoxazol-trimetoprima (Rana, 2022)

#### 2.7.6. *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria Grampositiva que es capaz de superar todas las barreras del sistema de defensa del hospedero, esto debido a que posee un amplio espectro de factores de virulencia como la producción de enzimas, antígenos, adhesinas y toxinas, incluyendo la capacidad de la formación de biopelículas, esta bacteria ha desarrollado multirresistencia a los antibióticos como la ampicilina, oxacilina y tetraciclina, por lo tanto, *Staphylococcus aureus* presenta altos índices de resistencia, lo cual provoca que haya menos antimicrobianos que se puedan usar como tratamiento eficaz (Rana, 2022; Guzmán-Rodríguez, 2021).

*Staphylococcus aureus* sigue siendo el patógeno más prevalente que causa infecciones intramamarias en el ganado lechero a nivel mundial (Valmorbida et al., 2017), asociado con varias formas de mastitis clínica y subclínica no causa anomalías o fatalidad; sin embargo, produce enzimas degradativas y toxinas que dañan irreversiblemente el tejido de ordeño, disminuyendo la producción de leche y con esto su calidad (Cheng, 2020).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, la ganadería ocupa un lugar fundamental en la economía y la seguridad alimentaria de la población, siendo la producción láctea un pilar esencial en la alimentación humana. Sin embargo, los sistemas de producción láctea enfrentan diversos desafíos, entre los cuales se destacan los problemas sanitarios.

Uno de los problemas sanitarios más recurrentes es la mastitis, una enfermedad que afecta significativamente el bienestar animal y la estabilidad económica, generando pérdidas importantes en la producción láctea. La mastitis es una complicación frecuente que disminuye la producción de leche y está asociada a un amplio grupo de agentes patógenos y factores ambientales. Esta enfermedad no solo reduce la cantidad y calidad de la leche, sino que también incrementa la administración de antimicrobianos.

El uso excesivo de antimicrobianos ha generado preocupaciones sobre la resistencia microbiana, un peligro latente que afecta a la población humana, animal y vegetal. El abuso de antimicrobianos para combatir la mastitis deja residuos en la leche y fomenta la aparición de cepas resistentes de patógenos.

En este contexto, es imperativo buscar alternativas que permitan controlar la mastitis sin recurrir al uso indiscriminado de antimicrobianos. En el presente trabajo, se estudió y experimentó con aceite esencial de romero como un tratamiento alternativo para combatir bacterias asociadas a la mastitis. Este enfoque innovador representa un avance significativo hacia un tratamiento eficaz y sostenible para esta enfermedad.

El uso de aceite esencial de romero puede ofrecer una solución prometedora que contribuya a reducir la dependencia de antimicrobianos y, por ende, a mitigar el riesgo de resistencia microbiana. Además, implementar tratamientos alternativos basados en productos naturales podría mejorar el bienestar animal y la calidad de la leche.

## 4. JUSTIFICACIÓN

La ganadería, y en particular la producción láctea, juega un papel esencial en la economía y seguridad alimentaria de México. La leche es un alimento básico en la dieta de la población, lo que subraya la importancia de mantener la estabilidad y eficiencia de los sistemas de producción láctea. Sin embargo, la mastitis, una enfermedad común provocada por bacterias multirresistentes, representa un desafío significativo. Este problema no solo disminuye la cantidad y calidad de la leche, sino que también afecta la estabilidad económica de los productores y pone en riesgo la salud pública debido a la presencia de residuos de antimicrobianos en la leche. El uso excesivo de antibióticos en el tratamiento de la mastitis ha llevado a un incremento en la resistencia microbiana, lo que complica aún más el control de esta enfermedad. La resistencia microbiana es una amenaza global que no solo afecta la microbiota, sino que también limita las opciones de tratamiento disponibles para los profesionales de la salud animal.

Por lo tanto, es imperativo buscar alternativas efectivas y sostenibles que permitan controlar la mastitis sin recurrir al uso indiscriminado de antibióticos. Una de las alternativas prometedoras es el uso de plantas medicinales, prácticas que han demostrado beneficios significativos en la medicina tradicional. La planta *Rosmarinus officinalis*, comúnmente conocida como romero, es conocida por sus propiedades antibacterianas y ha sido utilizada históricamente en el tratamiento de diversas afecciones.

El aceite esencial de romero se presenta como una opción económica y accesible para el tratamiento antibacteriano de la mastitis, lo que podría reducir la dependencia de antibióticos y, por ende, la resistencia microbiana. Implementar el uso de aceite esencial de romero en la producción láctea no solo mejoraría la salud y bienestar de los animales, sino que también garantizaría la seguridad y calidad de la leche consumida por la población. Además, la adopción de tratamientos alternativos basados en productos naturales contribuiría a la sostenibilidad del sector agropecuario, permitiendo una producción láctea más eficiente y segura. Por estas razones, es fundamental continuar investigando y promoviendo el uso de terapias alternativas para asegurar el bienestar animal y la calidad de los productos lácteos en México.

## 5. HIPOTESIS

El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* presentará actividad antibacteriana contra bacterias asociadas con mastitis.

## 6. OBJETIVOS

Objetivo general.

- Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* contra bacterias asociadas a mastitis, para proponerlo como una alternativa de tratamiento.

Objetivos específicos.

1. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* contra bacterias asociadas a mastitis.
2. Determinar la Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* contra bacterias asociadas a mastitis.
3. Determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* contra bacterias asociadas a mastitis.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Sitio de colecta

Se adquirió la planta completa, incluyendo hojas y tallos de romero (*Rosmarinus officinalis*), en el municipio de Tizayuca Hidalgo, México (19° 47' y 19° 55' de latitud norte; los meridianos 98° 54' y 99° 02' de longitud oeste; altitud de 2 300).

El Municipio de Tizayuca, tiene una extensión territorial de 92.5 kilómetros cuadrados y se encuentra a 52 kilómetros de la Ciudad de México, colinda al norte con Tolcayuca, estado de Hidalgo, y al Sur y Oeste con el Estado de México. Clima semiseco templado, con lluvias de junio a septiembre, abarcando el 100% de la superficie municipal.

El municipio está compuesto principalmente por maguey y nopal, cactus, arbustos leñosos de diversos tipos, también se encuentran árboles de Pirul, el Pino, el Capulín y el Huizache, además de tener árboles útiles como, árboles frutales y abundantes hierbas silvestres que se utilizan para remedios caseros.

Su suelo está conformado principalmente de phaeozem y leptosol, no son salitrosos, son semipermeables, son firmes puesto que existe tepetate o poca profundidad, el nivel freático se encuentra a más de 3 metros (INEGI, 2010).



**Figura 1.** Imagen representativa de Romero (*Rosmarinus officinalis*).

## 7.2. Identificación de la planta.

La planta de romero es un arbusto aromático leñoso con hojas perennes fragantes en forma de aguja. Crece hacia arriba y puede extenderse hasta una altura de 2 m. Las hojas son de 2-4 cm de largo y 2-5 mm. ancho, verde arriba y blanco abajo con pelos lanudos cortos y densos. Las diferentes variaciones de la planta pueden dar lugar a el crecimiento de ramas y flores de diferentes colores (blancas, rosadas, moradas o azules).

Para la identificación de la planta se consultó el herbario de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), y se verificó que la planta correspondiera a (IBUNAM: MEXU:26365).

## 7.3. Extracción del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*.

El romero fue lavado y secado a temperatura ambiente cambiándola de posición diariamente, para evitar formación de hongos, debido a su alto contenido de humedad. Se utilizó la parte aérea para la extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor a través de una alambique de cobre.

Se determinó el rendimiento del AER mediante la siguiente ecuación expresión (Quert Álvarez, 2001)

$$P = \frac{M1}{M2} \cdot 100$$

donde:

M1: masa final de aceite esencial.

M2: masa inicial de follaje

100 = factor matemático.

## 7.4. Prueba de esterilidad del aceite de romero.

En una caja petri estéril con Agar Müller Hilton (BD Bioxon, Heidelberg, Germany), se agregaron 5 µL de aceite esencial de romero (AER) y se incubó durante 24 horas a 37° C, transcurridas las 24 horas se verificó la presencia o ausencia de crecimiento, este procedimiento se realizaron cuatro repeticiones. En caso de existir crecimiento de

microorganismos en la zona de inoculación, se realizó una esterilización de la muestra mediante dos filtros de membrana, uno de 33 mm y el otro de 0.22µm (Millex-GV).

#### 7.5. Material biológico

Para determinar la actividad antibacteriana se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* de la colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y las cepas multiresistentes a antimicrobianos, aisladas de casos clínicos *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*<sup>1</sup>, *Enterococcus faecium*<sup>2</sup>, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>1</sup>, *Pseudomonas aeruginosa*<sup>2</sup>, *Serratia liquefaciens* y *Escherichia coli*, pertenecientes al laboratorio de bacteriología del Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp), de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Las cepas se mantuvieron en crioconservación a -80°C hasta su uso.

#### 7.6. Reactivación de las cepas bacterianas

Las cepas fueron reactivadas de la crioconservación en agar Müller-Hinton (BD Bioxon, Heidelberg, Germany), por medio de la técnica de estría simple, se incubaron durante 24 horas a 37 ° C, posteriormente se le realizó tinción de Gram a cada una de las cepas para corroborar su morfología y pureza.

#### 7.7. Preparación del inoculo

Una vez confirmada la pureza de cada bacteria, se inoculó una colonia de cada cepa en caldo nutritivo (BD Bioxon, Heidelberg, Germany), el cual fue incubado en agitación constante (70rpm) durante 24 horas a 37° C. Trascurrido el tiempo de incubación, el inóculo, se ajustó con caldo nutritivo al 0.5 del patrón de turbidez de McFarland (Remel, R20421, Lenexa, KS, USA), el cual corresponde a  $150 \times 10^6$  cel/mL.

#### 7.8. Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se determinó por medio de la técnica de difusión en disco, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Mínima Bactericida (CMB) y la relación de estas, de acuerdo con lo establecido por el CLSI (2012) y a lo publicado por el

Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI, 2012) Rangel-López y colaboradores (Rangel-López et al., 2020) y Zaragoza-Bastida y colaboradores (Zaragoza-Bastida, 2020)

#### 7.8.1. Método de difusión en disco

La prueba de difusión en disco se realizó con las cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se agregaron 100 µL de una solución bacteriana previamente ajustada al 0.5 del patrón de turbidez McFarland (Remel, R20421, Lenexa, KS, USA) de cada una de las cepas bacterianas, procurando distribuir de manera uniforme la muestra y se colocaron discos de papel filtro impregnados con aceite esencial de romero al 100%. Posteriormente las cajas fueron incubadas de 37 °C por 24 horas.

Trascurrido el tiempo se midieron los halos de inhibición (CLSI, 2012). La sensibilidad se clasificó según Imame y colaboradores (Imane et al., 2022) en función del diámetro de la siguiente manera: 8 mm - no sensible, 9-14 mm - sensible, 15-19 mm - muy sensible y más de 20 mm - extremadamente sensible.

#### 7.8.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria se utilizó el método de microdilución en placa. Para el AER las concentraciones evaluadas fueron, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.15, 0.07 mg/mL, como control negativo se utilizó caldo nutritivo estéril.

Como control positivo se utilizó Kanamicina (AppliChem 4K10421) a concentraciones de 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.12 µg/mL, cada uno de los tratamientos fue evaluado por triplicado en una placa de 96 pozos, para lo cual se colocaron 100 µL de cada una de las concentraciones a evaluar más 10 µL bacteriana previamente ajustada a 0.5 de McFarland. Una vez que la placa fue inoculada, se incubó a 37° C por 24 horas en agitación constante (70 rpm).

Para determinar la CMI usaron de sales de *p*-iodonitrotetrazolium (Sigma-Aldrich 18377). Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 20 µL de una solución al 0.04% (w/v) de *p*-iodonitrotetrazolium en cada pozo, la placa se incubó por 30 minutos a la temperatura correspondiente según la bacteria evaluada y se realizó la lectura, determinándose como CMI aquella concentración a la cual la solución viró a rosa.

### 7.8.3. *Concentración Mínima Bactericida (CMB)*

Para determinar la CMB, previa adición del *p*-iodonitrotetrazolium, se inocularon 5µL de cada pozo en agar Mueller Hinton (DIBICO ®), posteriormente la caja petri se incubo a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura y se determinó como CMB aquella concentración a la cual no se observó crecimiento bacteriano en la caja petri. (Olmedo-Juárez, 2019).

### 7.8.4. *Efecto Bactericida y Bacteriostático*

Para determinar el efecto bactericida o bacteriostático del EHLt, EHCc, EHSb, y las fracciones acuosa y acetato de etilo de cada extracto, se calculó la relación entre la CMB/CMI, considerando que todo valor menor o igual a 4 indica un efecto bactericida y que valores mayores a 4 son indicativos de un efecto bacteriostático (Djihane, B *et al*,2020)

## 7.9. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana fueron normalizados (log10) y analizados mediante un diseño completamente al azar a través de ANOVA. Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante un análisis estadístico de comparación por Tukey con un nivel de significancia del 95% ( $\alpha=0.05$ ), usando el programa MINITAB versión 18.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Rendimiento del aceite esencial de romero.

El rendimiento del aceite esencial de romero fue de 1.82% de la muestra.

### 8.2. Actividad antibacteriana

#### 8.2.1. Método de difusión en disco.

Los resultado de la actividad antibacteriana del AER por el método de difusión en disco contra las cepas indicadoras de *E. coli* y *S. aureus* indican que las bacterias antes mencionadas son sensibles a la acción antibacteriana del AER, sin diferencias estadísticas significativas ( $P=0.253$ ). Específicamente para *E. coli*, se determinó un halo de inhibición promedio de 11.5 mm con un intervalo de confianza (IC) del 95% de (8.76, 14.23), clasificándose como sensible. Por otro lado, para *S. aureus*, se registró un halo de inhibición promedio de 13.5 mm con un IC del 95% de (10.76, 16.24), igualmente interpretado como sensible, la información se detalla en el cuadro 1.

**Tabla 1.** Resultados de los halos de inhibición (mm) del AER de contra bacterias asociadas con mastitis.

Cepa evaluada	N	Halos de inhibición mm± <i>Desv.Est.</i>	IC de 95%	Interpretación
<i>E. coli</i> <sup>35218</sup>	4	11.5±1	(8.76, 14.23)	Sensible
<i>s. auerus</i> <sup>6538</sup>	4	13.5±3	(10.76, 16.24)	Sensible
P-valor		0.253		

*Desv.Est*=Desviación estándar de la media, *IC* Intervalo de confianza del 95

### 8.2.2. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida

Los resultados muestran variabilidad en la sensibilidad de las cepas frente AER, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*<sup>2</sup> presentaron valores de CMI y CMB similares (2.5 y 5 mg/mL, respectivamente), con una relación CMB/CMI de 1.0, lo que sugiere un efecto bactericida directo. En contraste, *E. faecium*<sup>1</sup> y *Stenotrophomonas maltophilia* exhibieron CMI de 0.15 mg/mL y MBC de 0.62 mg/mL, resultando en una relación MBC/CMI de 4.1, indicando un efecto bacteriostático (Cuadro 2).

Por otro lado, *Pseudomonas aeruginosa* (cepas 1 y 2) mostró valores elevados de CMI y CMB (10 mg/mL), con una relación de 1.0, mientras que *Serratia liquefaciens* presentó la mayor relación CMB / CMI (8.9), sugiriendo una menor eficacia bactericida. *Escherichia coli* evidenció una CMI de 1.25 mg/mL y una CMB de 5 mg/mL, con una relación de 4.0. La prueba estadística reveló diferencias significativas entre los valores obtenidos para las distintas cepas (P = 0.00001) (Cuadro 2).

**Tabla 2.** Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del AER contra bacterias asociadas con mastitis (mg/mL).

Cepas evaluadas	AER (mg/mL)			Kanamicina (µg/mL)	
	CMI	CMB	CMB / CMI	CMI	CMB
<i>E. coli</i> <sup>35218</sup>	0.62 <sup>c</sup>	0.62 <sup>a</sup>	1	2	2
<i>s. auerus</i> <sup>6538</sup>	2.5 <sup>d</sup>	5.0 <sup>c</sup>	1	2	4
<i>E. faecalis</i>	2.5 <sup>d</sup>	2.5 <sup>b</sup>	1.0	16	32
<i>E. faecium</i> <sup>1</sup>	0.15 <sup>b</sup>	0.62 <sup>a</sup>	4.1	1	8
<i>E. faecium</i> <sup>2</sup>	5 <sup>e</sup>	5.0 <sup>c</sup>	1.0	8	32
<i>S. maltophilia</i>	0.15 <sup>b</sup>	0.62 <sup>a</sup>	4.1	16	32
<i>P. aeruginosa</i> <sup>1</sup>	10 <sup>f</sup>	10 <sup>d</sup>	1.0	32	64
<i>P. aeruginosa</i> <sup>2</sup>	10 <sup>f</sup>	10 <sup>d</sup>	1.0	32	128
<i>S. liquefaciens</i>	0.07 <sup>a</sup>	0.62 <sup>a</sup>	8.9	1	2
Valor de P	0.00001	0.00001			

## 9. DISCUSIÓN.

La evaluación de la actividad antibacteriana del AER mediante el método de difusión en disco, la CMI y CMB permitió determinar su efectividad frente a diversas cepas bacterianas. Los resultados del método de difusión en disco evidenciaron que *E. coli* y *S. aureus* fueron sensibles al AER, con halos de inhibición promedio de 11.5 mm y 13.5 mm, respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas entre ellas ( $P = 0.253$ ).

Estos hallazgos son consistentes con estudios previos que han demostrado la eficacia del AER contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Cueva et al., 2010). Estos resultados sugieren que el AER posee un potencial antibacteriano similar contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, lo que podría estar relacionado con la presencia de metabolitos secundarios activos de amplio espectro dentro del AER (Andrews, 2001; Tian et al., 2020).

Al respecto existen reportes de que el AER presenta actividad antibacteriana atribuida a la presencia de diversos metabolitos secundarios, principalmente compuestos fenólicos y terpenoides. Entre los más relevantes se encuentran el 1,8-cineol, el alcanfor, el  $\alpha$ -pineno y el borneol, los cuales han demostrado efectos inhibitorios contra diversas bacterias patógenas mediante la alteración de la permeabilidad de la membrana celular y la interrupción de procesos metabólicos esenciales (Bozin, 2007; Numpaque, 2011).

Además, el ácido rosmarínico y los flavonoides generan estrés oxidativo en las células bacterianas, lo que contribuye a la inactivación de sus funciones vitales (Nieto et al., 2021). En cuanto a la determinación de la CMI y la CMB, se observó una variabilidad en la sensibilidad de las cepas evaluadas. *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*<sup>2</sup> presentaron valores idénticos de CMI y CMB (2.5 y 5 mg/mL, respectivamente), con una relación CMB/CMI de 1.0, lo que indica un efecto bactericida directo.

Por otro lado, *Enterococcus faecium*<sup>1</sup> y *Stenotrophomonas maltophilia* mostraron valores de CMI de 0.15 mg/mL y CMB de 0.62 mg/mL, resultando en una relación CMB/CMI de 4.1, lo que sugiere un efecto bacteriostático. Estos hallazgos sugieren que la acción del AER varía dependiendo de la cepa, probablemente debido a diferencias en la estructura de la pared

celular o en los mecanismos de resistencia bacteriana ya que son cepas aisladas de casos clínicos con diferentes perfiles de resistencia (Wiegand, 2008).

En el caso de *Pseudomonas aeruginosa* (cepas 1 y 2), los valores de CMI y CMB fueron elevados (10 mg/mL), con una relación CMB/CMI de 1.0, indicando un efecto bactericida. Sin embargo, estos valores sugieren una menor sensibilidad al AER en comparación con otras bacterias evaluadas. Por otra parte (Murbach Teles Andrade, 2013) nos revela en su estudio que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* fue eficaz contra *P. aeruginosa* con una MIC de 8,29 mg / mL.

Lo que nos da un panorama en esta bacteria y la posibilidad del tratamiento para ella a través de los aceites esenciales. Por su parte, *Serratia liquefaciens* presentó la mayor relación CMB/CMI (8.9), lo que sugiere una menor eficacia bactericida del extracto frente a esta cepa en particular. *Escherichia coli* mostró una CMI de 1.25 mg/mL y una CMB de 5 mg/mL, con una relación CMB/CMI de 4.0, lo que indica un efecto bacteriostático (CLSI, 2021)

Es importante destacar que, aunque las bacterias Gram negativas suelen ser más resistentes a los aceites esenciales debido a la estructura de su pared celular, el AER ha demostrado eficacia contra cepas como *E. coli*, lo que coincide con los resultados obtenidos en el estudio de Araya y colaboradores en 2015 (Araya et al., 2015) al igual que los resultados obtenidos de Murbach Teles Andrade y colaboradores en 2013 (Murbach Teles Andrade, 2013).

Los resultados fueron estadísticamente significativos ( $P = 0.00001$ ), lo que confirma diferencias entre las cepas evaluadas y su respuesta al AER. Al comparar estos valores con los obtenidos para kanamicina, se observa que algunas cepas mostraron una mayor sensibilidad al antibiótico convencional en comparación con el AER, aunque en algunos casos, como *E. faecium*<sup>1</sup> y *S. liquefaciens*, los valores de CMI fueron similares para ambos agentes.

Estos resultados refuerzan la importancia de continuar evaluando extractos naturales como posibles alternativas terapéuticas frente a patógenos resistentes a los antimicrobianos convencionales (López-Rojas et al., 2013). Finalmente, Cueva et al. (2010) reportaron que el AER exhibió actividad bactericida contra *S. aureus* con una CMI de 1024 ppm, mientras que para *E. coli* la CMI fue de 1024 ppm, indicando una notable actividad antibacteriana del AER

contra estas cepas, aun y cuando la metodología que usaron los autores antes mencionados coincide en con la actividad antibacteriana contra las cepas de *E. coli* y *S. aureus*. Aunado a lo anterior, existen reportes que han mostrado que el AER presenta actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium* y *Shigella sonnei*, con CMI de 1024 ppm, lo que sugiere un amplio espectro de acción del AER (Cueva et al., 2010).

## 10.CONCLUSIÓN.

El aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) presentó actividad antibacteriana contra las cepas evaluadas, con variaciones en sus concentración inhibitoria y bactericida, por lo que el aceite esencial de romero podría representar una alternativa natural efectiva contra bacterias asociadas a mastitis resistentes a antimicrobianos convencionales, sin embargo, se requiere de estudios adicionales que identifique el o los metabolito que le confiere la actividad antibacteriana y que garanticen su evaluación en modelos *in vivo*.

## 11.REFERENCIAS.

- Aber, M., Schroeder, S., Gözl, L., Sulser, A., Santa Rosa, T., Puchalski, K., & Langland, J. (2021). Actividad antimicrobiana de las sustancias volátiles de los aceites esenciales. *Medicina complementaria y terapias de BMC*, 21, 124. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03285-3>.
- Ali, A., Chua, B. L., & Chow, Y. H. (2019). An insight into the extraction and fractionation technologies of the essential oils and bioactive compounds in *Rosmarinus officinalis* L.: Past, present and future. *Trends in Analytical Chemistry*, 188, 338-351. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.040>.
- Álvarez Macías, A., Cesín Vargas, J., Santos Chávez, V., & Cárcamo Mallen, R. (2024). Características y perspectivas del sistema productivo de lácteos en México. un análisis coyuntural. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, 16. Obtenido de <https://sociedadesruralesojs.xoc.uam.mx/index.php/srpma/article/view/506>.
- Amber, R., Adnan, M., Tariq, A., Khan, S. N., Mussarat, S., Hashem, A., Abd\_Allah, E. F. (2018). Antibacterial activity of selected medicinal plants of northwest Pakistan traditionally used against mastitis in livestock. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1), 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.02.008>.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 5-16. [https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5).
- Araya, J., González, M., & Ulate, W. (2015). Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de plantas medicinales contra bacterias patógenas. *Odovtos - International Journal of Dental Sciences*, 35(1), 32-40. <https://www.scielo.sa.cr/pdf/odov/n35/1659-0775-odov-35-32.pdf>.
- Banerjee, S., Batabyal, K., Joardar, S., Isore, D., Dey, S., Samanta, I., . . . Murmu, S. (2017). Detección y caracterización de *Pseudomonas aeruginosa* patógena en casos de mastitis subclínica bovina en Bengala Occidental, India. *Veterinary World*, 10(7), 742. doi: 10.14202/vetworld.2017.738-742. <https://www.veterinaryworld.org/Vol.10/July-2017/4.html>.
- Banjaw, D. T. (2024). Rosemary Recent Classification, Plant Characteristics, Economic Parts, Marketing, Uses, Chemical Composition, and Cultivation. *International Journal of*

Scientific Research and Engineering Development. ISSN : 2581-7175. Obtenido de <https://www.researchgate.net/scientific-contributions/Lema-2271921471>

- Basheer, A. I. (2018). Effect of alcoholic extract of *Rosmarinus against* some type of enterobacteriaceae. Tikrit Journal of Pure Science, 23, 18-21. <https://doi.org/10.25130/tjps.v23i7.689>.
- Begrem, S. J.-L. (2021). Genomic diversity of *Serratia proteamaculans* and *Serratia liquefaciens* predominant in seafood products and spoilage potential analyses. International Journal of Food Microbiology, 354. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109326>.
- Bonestroo, J., cae, N., Hogeveen, H., Emanuelson, U., Klaas, I., & van der Voort, M. (2023). Los costos de la mastitis crónica: un estudio de simulación de una granja con sistema de ordeño automático. Medicine Veterinary Preventive, 210. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105799>.
- Borges, R. S., Sánchez, B. L., Matias, A. C., Keita, H., & Tavares, J. C. (2018). *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. Journal of Ethnopharmacology, 29-45. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.09.038>.
- Bozin, B., Mimica-Dukić, N., Simin, N., & Anackov, G. (2007). Characterization of the volatile composition and antimicrobial activity of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., *Salvia officinalis* L., and *Lavandula angustifolia* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(19), 7879-7885. <https://doi.org/10.1021/jf0715323>.
- Brooke, J. S. (2021). Advances in the Microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*. Clinical Microbiology Reviews, 34(3). <https://doi.org/10.1128/cmr.00030-19>.
- Cheng, W. N., & Han, S. G. (May de 2020). Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments. AJAS, 11, 1699-1713. doi:10.5713/ajas.20.0156. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32777908/>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2021). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Document M100. 31st edition. Obtenido de [https://clsi.org/media/z2uhcbmv/m100ed31\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/z2uhcbmv/m100ed31_sample.pdf)

- CLSI. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Obtenido de <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1617174>.
- Cuervo Andrade, J. L. (2017). Obtención de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis* L.). *Universidad Nacional de Colombia*. Obtenido de [https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/77909/PDF%20Repositorio%20UN%2008062020\\_Cartilla%20Aceite%20Romero.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/77909/PDF%20Repositorio%20UN%2008062020_Cartilla%20Aceite%20Romero.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Cueva, C., Sánchez-Patiño, C. A., & Vargas, C. I. (2010). Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 39(2), 32-40. [https://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-40042010000200006&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-40042010000200006&script=sci_arttext).
- Djihane B., Wafa N., Elkhamssa S., Haro Juan Pedro, D., Esteban M. A., Mohamed M. Ebrahimi, E., Haghjou, M., Nematollahi, A., & Goudarzian, F. (2020). Effects of *Rosemary essential* oil on growth performance and hematological parameters of young great sturgeon (*Huso huso*). *Aquaculture*, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734909>
- Flores Villa, E., Sáenz Galindo, A., Castañeda Facio, A., & Narro Céspedes, R. I. (2020). (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.266>.
- Flores-Villa, E., Sáenz-Galindo, A., Castañeda-Facio, A., & Narro-Céspedes, R. (2021). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): its origin, importance and generalities of its secondary metabolites. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.266>
- Friman, M. J.-S. (2019). Descripción de dos brotes de mastitis asociados a *Serratia marcescens* en granjas lecheras finlandesas y revisión de la literatura. *Acta Vet Scand*, 61(54). <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0488-7>

- Gallegos-Daniel, C., Taddei-Bringas, C., & González-Córdova, A. (2023). Panorama de la industria láctea en México. *Estudios sociales. Revista de alimentación contemporánea y desarrollo regional*, 33(61). <https://doi.org/10.24836/es.v33i61.1251>
- Gao, X., Chunling, A., Zehui, Z., Shaoxue, L., Xu, C., Zhao, Y. J., Mingchun, L. (2019). Aislamientos enterocócicos de mastitis subclínicas y clínicas: resistencia antimicrobiana y distribución de casetes de genes integrones. *Patogenia microbiana*, 129, 82-87. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.031>
- García-Solache, M., & Rice, L. (2019). El enterococo: un modelo de adaptabilidad a su entorno. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(2). <https://doi:10.1128/CMR.00058-18>.
- González-Alamilla, E. G.-C.-C.-J.-C.-R.-B.-P. (2019). componentes químicos de *Salix babylonica* L. y su actividad antibacteriana contra bacterias animales Grampositivas y Gramnegativas. *Moléculas*, 24(16). <https://doi.org/10.3390/molecules24162992>
- Goulart, D. B. (2022). Mastitis por *Escherichia coli* en vacas lecheras: etiología, diagnóstico y desafíos del tratamiento. *Frontiersin*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.928346>
- Hashem, Y., Abdelrahman, K., & Aziz, R. (2021). Correlaciones fenotipo-genotipo y distribución de factores de virulencia clave en *Enterococcus faecalis* aislado de pacientes con infecciones del tracto urinario. *Infeccion y resistencia de farmacos*, 14, 1713—1723. <https://doi.org/10.2147/IDR.S305167>
- He, Z., Zhao, C., He, Y., Liu, Z., Fan, G., Zhu, K., Hu, X. (2023). La *Stenotrophomonas maltophilia* enterogénica migra a la glándula mamaria para inducir mastitis activando la vía calcio-ROS-AMPK-mTOR-autofagia. *J Anim Sci Biotechnol*, 157. <https://doi.org/10.1186/s40104-023-00952-y>.
- Imane, N. I., Fouzia, H., Azzahra, L. F., Ahmed, E., Ismail, G., Idrissa, D., Nouredine, B. (2022). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of some essential oils against multidrug resistant bacteria. *European Journal of Integrative Medicine*, 35. doi: <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101074>
- INEGI. (2010). Compendio de información geográfica municipal . INEGI. obtenido de [https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/13/13069.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/13/13069.pdf)

- INEGI. (29 de MAYO de 2023). ENCUESTA NACIONAL DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA. Obtenido de <https://inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2024/ENIFARM/ENIFARM2023.pdf>
- Jin Kim, H., Young Youn, H., Jeong Kang, H., Jin-San, L., Yong-Seok, J., Kwang-Young, C., & Kun-Ho, S. (2022). Prevalencia y características de virulencia de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* en leche bovina con mastitis en comparación con leche cruda bovina normal en Corea del Sur. *Animales*, 12(11), 1407. <https://doi.org/10.3390/ani12111407>
- Kovacević, Z., Radinović, M., Čabarkapa, I., Kladar, N., & Božin, B. (2021). Agentes naturales contra patógenos de la mastitis. Optimización del Tratamiento Antimicrobiano Veterinario en Animales de Compañía y de Consumo, 10(2), 205. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020205>
- LICONSA S.A. de C.V. (13 de Mayo de 2024). Consumo de leche en México. Gobierno de México. Obtenido de <https://www.gob.mx/liconsa/articulos/consumo-de-leche-en-mexico>
- Liu, J. L. (2024). Prevalencia y características moleculares de enterococos aislados de casos clínicos de mastitis bovina en Ningxia. *Infección y resistencia a fármacos*, 2121–2129. <https://doi.org/10.2147/IDR.S461587>
- López-Rojas, R., Cebrero-Cangueiro, T., & Pachón, J. (2013). In vitro and in vivo activity of antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41(3), 291-295. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.11.005>
- Maity, S., & Ambatipudi, K. (Enero de 2021). La disbiosis microbiana mamaria conduce a la zoonosis de la mastitis: una perspectiva de Una Salud. *FEMS Microbiology Ecology*, 97(1). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa241>
- Mimoune, N., R. S., Benadjel, O., Khelef, D., & Kaidi., R. (2021). Alternative treatment of bovine mastitis. *Veterinarska Stanica*, 52(6). <https://doi.org/10.46419/vs.52.6.9>
- Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Velázquez-Ordoñez, V., Delgadillo-Ruiz, L., & Zaragoza Bastida, A. (2023). Bovine mastitis, a worldwide

- impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. *Veterinary and Animal Science*. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100306>
- MSD. (31 de Agosto de 2022). Salud Animal. Mastitis podría afectar el consumo de leche en México. Obtenido de <https://www.msd-salud-animal.mx/2022/08/31/mastitis-bovina-podria-afectar-el-consumo-de-leche-en-mexico/>
  - Murbach Teles Andrade, B. N. (2013). Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. *Revista de investigación de aceites esenciales*, 26(1), 34–40. <https://doi.org/10.1080/10412905.2013.860409>
  - Nieto, G., Espinosa-Martos, I., Rodríguez-López, J., & Garrido, M. D. (2021). Antimicrobial activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its applications in food industry. *Foods*, 10(9), 2129. <https://doi.org/10.3390/foods10092129>
  - Numpaque, M. A., Oviedo, L. A., Gil, J. H., García, C. M., & Durango, D. L. (2011). Antifungal and antibacterial activity of rosemary and peppermint essential oils. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(6), 986-993. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000140>
  - Ocak, F., & Turkyilmaz, S. (2023). Investigation of genetic relatedness, antimicrobial resistance, biofilm formation, biofilm-related virulence genes and integron-related genes of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates obtained from bovine milk samples with mastitis: Characteristics of Sten. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 74(3), 5979–5992. <https://doi:10.12681/jhvms.30641>
  - Olivares-Pérez, J., Kholi, A. E., Rojas-Hernández, S., Elghandour, M. M., Mohamed Salem, A. Z., Zaragoza Bastida, A., Alonso-Fresán, M. (2015). Prevalence of bovine subclinical mastitis, its etiology and diagnosis of antibiotic resistance of dairy farms in four municipalities of a tropical region of Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 47(8), 1497–1504. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0890-8>
  - OMS. (2021). Resistencia a los antimicrobianos. Organización mundial de la salud. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
  - OPS. (2021). Resistencia a los antimicrobianos. Organización panamericana de la salud. Obtenido de <https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos>

- Palma, E., Tilocca, B., & Roncada, P. (2020). Resistencia a los antimicrobianos en la medicina veterinaria: una visión general. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares*, 21(6), 1914. <https://doi.org/10.3390/ijms21061914>
- Ramos-Hernández, E. A.-Z.-R.-G.-M.-L. (2024). Oportunidades de mejora en la supervisión de procesos de destilación por arrastre de vapor. *Endencias en Energías Renovables y Sustentabilidad(TERYS)*, 3(1), 190-195. <https://doi.org/10.56845/terys.v3i1.259>
- Rana, E. F. (2022). Antimicrobianos terapéuticos de uso frecuente y sus patrones de resistencia en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en vacas lactantes afectadas por mastitis. *Revista internacional de ciencias y medicina veterinaria*, 10(1), 1-10. <https://doi.org/10.1080/23144599.2022.2038494>
- Rangel-López, L., Zaragoza-Bastida, A., Valladares-Carranza, B., Peláez-Acero, A., Sosa-Gutiérrez, C. G., Hetta, H. F., Rivero-Perez, N. (2020). In Vitro Antibacterial Potential of *Salix babylonica* Extract against Bacteria that Affect *Oncorhynchus mykiss* and *Oreochromis* spp. *Animals*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/ani10081340>
- Răpunțean , S., & Răpunțeano, G. (2021). *Stenotrophomonas maltophilia*, un patógeno emergente con resistencia a múltiples antibióticos. *Revista Rumana de Medicina Veterinaria y Farmacología*, 6(32), 260-271. Obtenido de <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20220233367>
- Sattar Bag, A., Arif, M., Riaz, S., Rahman Khan, S., Islam, S., Afrin Punom, S., Hassan, J. (2022). Resistencia a los antimicrobianos, perfiles de virulencia y significado para la salud pública del *Enterococcus faecalis* aislado de la mastitis clínica del ganado en Bangladesh. *BioMed Research International*(1), 8. <https://doi.org/10.1155/2022/8101866>
- Schauer, B., Wald, R., Urbantke, V., Lončarić, I., & Baumgartner, M. (2021). Tracing Mastitis Pathogens—Epidemiological Investigations of a *Pseudomonas aeruginosa* Mastitis Outbreak in an Austrian Dairy Herd. *Animals*, 11(2), 279. <https://doi.org/10.3390/ani11020279>
- Sharun, K., Dhama, K., Tiwari, R., Gugjoo, M. I., Patel, S., Pathak, M., Chaicumpa, W. (2021). Avances en los enfoques terapéuticos y de manejo de la mastitis: una revisión

- exhaustiva. *Veterinary Quarterly*, 41(1), 107-136.  
<https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>
- SIAP. (15 de Abril de 2024). Escenario mensual de productos agroalimentarios. Leche de bovino. Secretaria de agricultura y desarrollo rural. Obtenido de [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/921666/Leche\\_de\\_Bovino\\_Abril.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/921666/Leche_de_Bovino_Abril.pdf)
  - Tian, F., Li, J., Fan, X., & Liu, X. (2020). Antibacterial mechanisms of plant-derived bioactive compounds against *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(22), 9251-9262. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10887-0>
  - Turkyilmaz, S., & Ocak, F. (2023). Estudio comparativo de las propiedades genotípicas de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de mastitis subclínica en Turquía. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 74(1), 5387–5402. <https://doi.org/10.12681/jhvms.29590>
  - Valmorbidia, M. K., Carneiro, D. C., Prior, K. C., Griebeler, E., Troncarelli, M. Z., & Dezen, D. (2017). Etiology and in vitro antimicrobial susceptibility profile of strains isolated from bovine mastitis in dairy herds from the midwest region of Santa Catarina state, Brazil. *Acta Veterinaria Brasilica*, 219-225. <https://doi.org/10.21708/avb.2017.11.4.7266>
  - Vázquez Rodríguez, E. (Noviembre de 2015). ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRACTOS. 316. Madrid.
  - Wei, Y. P. (2024). *Enterococcus faecium* : evolución, adaptación, patogénesis y terapias emergentes. *Nat Rev Microbiol*, 705–721. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01058-6>
  - Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
  - Zaragoza-Bastida, A. (2020). Antibacterial resistance, a public health problem. *Journal of the Selva Andina Animal Science*, 7(1), 1-2. Obtenido de <https://scholar.google.com/scholar?cluster=12446564003013617734&hl=en&oi=scholar>
  - Zoral, M., Ishikawa, Y., Ohshima, T., Futami, K., Endo, M., Maita, M., & Katagiri, T. (2018). Oxidological effects and pharmacokinetics of rosemary (*Rosmarinus officinalis*)

extract in common carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture, 955-960.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.048>.