



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

“DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE TRES  
EXTRACTOS NATURALES: *Caléndula officinalis*, *Echinacea*  
*purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, (SOLOS Y  
COMBINADOS) EN BACTERIAS AISLADAS DE CASOS DE  
MASTITIS BOVINA.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

YOLANDA PEREZ AVENDAÑO

ASESORES: MVZ. GERARDO CRUZ JIMENEZ.  
MVZ. JOSE ANTONIO LICEA VEGA.  
M. en C. SOFIA GONZALEZ GALLARDO.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS  
 SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
 PRESENTE

DEPARTAMENTO DE

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
 Jefe del Departamento de Exámenes  
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la Tesis:

Determinación del efecto inhibitorio de tres extractos naturales: Caléndula officinalis, Echinacea purpurea e Hippocratea excelsa, (solos y combinados) en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina.

que presenta la pasante: Yolanda Pérez Avendaño

con número de cuenta: 40402893-4 para obtener el título de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Septiembre de 2008

PRESIDENTE MVZ. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

SECRETARIO QFB. Brígida del Carmen Camacho E.

PRIMER SUPLENTE QFB. Guadalupe Hernández Torres

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Jonathan Pablo Paredes Juárez

ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO A:

Mis Padres:

**Domitila Avendaño Cruz y Esteban Pérez Pérez.**

A quienes jamás encontraré la forma de agradecer el cariño, comprensión y apoyo, brindados en las derrotas y logros obtenidos, haciendo de este un triunfo más suyo que mío, por la forma en que lo hemos compartido y espero que comprendan que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos e inspirados en ustedes.

Gracias mamita por todo tu amor y cuidados, gracias por seguir conmigo en ese lugar secreto de mi pensamiento y de mi corazón, porque para un genuino sentimiento de amor, no existe distancia, tiempo ni geografía. El amor es puente al infinito y hace escala justo en el corazón de Dios.

Gracias papá por estar siempre a mi lado y no dejarnos solas nunca a mis hermanitas y a mi, aún en los momentos más difíciles. Gracias por todo tu amor y protección.

Mis hermanas:

Daisy y Blanca

Gracias niñas por todo su cariño, apoyo y compañía  
Ustedes son uno de los mejores regalos en mi vida. Nunca olviden sus sueños siempre luchen por que sean una realidad.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme el privilegio de formar parte de esta Institución y adquirir una formación integral, con conocimientos sólidos y principios éticos.

Al Profesor Gerardo Cruz Jiménez por su tiempo, apoyo, amistad y dedicación.

A mis amigos: Norma, Carlos Abel, Por hacer de mi estancia en la Universidad una de las mejores etapas de mi vida y compartir conmigo momentos inolvidables. A Alejandro: por tu confianza y amistad, que me has brindado desde que nos conocimos. A Juan Manuel: por tu cariño y apoyo incondicional.

A JT: por todo lo que hemos vivido juntos, por tu amor, eres ya una parte fundamental en mi vida. Gracias por todo.



## INDICE GENERAL

	PAG
Índice general.....	3
Índice de figuras.....	10
Índice de tablas.....	13
Índice de gráficas.....	17
Lista de abreviaturas.....	19
Resumen.....	20
1. Introducción.....	23
1.1 Anatomía y fisiología de la glándula mamaria.....	26
1.2 Inmunología de la glándula mamaria.....	29
1.2.1 Factores que disminuyen la resistencia de la ubre.....	32
1.3 Definición de mastitis bovina.....	33
1.4 Clasificación de mastitis bovina.....	34
1.5 Etiología de la mastitis bovina.....	35
1.6 Mastitis causada por Estafilococos.....	38
1.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	38
1.6.2 Características generales.....	39
1.6.3 Factores de patogenicidad.....	40
1.6.4 Identificación.....	42
1.6.5 <i>Staphylococcus aureus</i> como causante de mastitis.....	42



1.7	Mastitis causada por Estreptococos.....	44
1.7.1	<i>Streptococcus uberis</i> .....	44
1.7.2	Características generales.....	44
1.7.3	Factores de patogenicidad.....	45
1.7.4	Identificación.....	45
1.7.5	<i>Streptococcus uberis</i> como causante de mastitis.....	45
1.8	Mastitis causadas por Enterococos.....	46
1.8.1	<i>Enterococcus faecalis</i> .....	46
1.8.2	Características generales.....	46
1.8.3	Factores de patogenicidad.....	47
1.8.4	Identificación.....	48
1.8.5	<i>Enterococcus faecalis</i> como causante de mastitis.....	49
1.9	Mastitis causadas por Enterobacterias.....	50
1.9.1	<i>Escherichia coli</i> .....	50
1.9.2	Características generales.....	50
1.9.3	Identificación.....	51
1.9.4	<i>Escherichia coli</i> como causante de mastitis.....	52
1.10	Patogenia: desarrollo de la mastitis.....	53
1.11	Transmisión de la mastitis.....	57
1.12	Detección de la mastitis en rebaños.....	58
1.12.1	Recuento de células somáticas.....	58
1.12.2	Cultivo de la leche.....	59
1.13	Detección de mastitis en vacas individuales.	60



1.13.1	Examen físico de la ubre.....	60
1.13.2	Aspecto de la leche.....	60
1.13.3	La prueba de California de mastitis.....	61
1.13.4	Cultivo bacteriano.....	63
1.13.5	Prueba de Nagasa.....	63
1.13.6	Pruebas automatizadas de conductividad...	64
1.14	Tratamiento de la mastitis bovina.....	64
1.15	Caléndula.....	67
1.15.1	Nombre científico.....	67
1.15.2	Descripción botánica.....	67
1.15.3	Hábitat.....	68
1.15.4	Parte utilizada.....	68
1.15.5	Composición química.....	68
1.15.6	Acciones farmacológicas.....	69
1.16	Cancerina.....	70
1.16.1	Nombre científico.....	70
1.16.2	Descripción botánica.....	70
1.16.3	Hábitat.....	71
1.16.4	Parte utilizada.....	71
1.16.5	Composición química.....	71
1.16.6	Acciones farmacológicas.....	72
1.17	Equinacea.....	72
1.17.1	Nombre científico.....	72
1.17.2	Descripción botánica.....	72
1.17.3	Hábitat.....	73
1.17.4	Parte utilizada.....	73





1.17.5	Composición química.....	74
1.17.6	Acciones farmacológicas.....	75
1.18	Microscopio electrónico.....	76
1.19	Justificación.....	78
1.20	Hipótesis.....	84
2.	Objetivo General.....	84
2.1	Objetivos particulares.....	85
3.	Materiales y métodos.....	86
3.1	Obtención de muestras de leche de vacas con mastitis.....	86
3.2	Aislamiento de patógenos bacterianos.....	87
3.3	Identificación de grupos específicos de agentes patógenos de mastitis.....	88
3.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	88
3.3.2	<i>Streptococcus uberis</i> .....	89
3.3.3	<i>Streptococcus faecalis</i> .....	89
3.3.4	<i>Escherichia coli</i> .....	91
3.4	Preparación de la solución Stock de trabajo de <i>Caléndula officinalis</i> .....	90
3.5	Preparación de la solución Stock de trabajo de <i>Echinacea purpúrea</i> .....	92
3.6	Preparación de la solución Stock de trabajo de <i>Hippocratea excelsa</i> .....	92



3.7	Determinación de la concentración de las soluciones stock de trabajo.....	93
3.8	Prueba de esterilidad para las tres soluciones de trabajo.....	94
3.9	Preparación del ensayo en microplaca para el extracto de <i>Echinacea purpúrea</i> .....	94
3.9.1	Preparación de material.....	94
3.9.2	Ensayo en microplaca.....	95
3.9.3	Lectura del ensayo en microplaca e interpretación de resultados.....	99
3.9.4	Determinación de la CMI.....	100
3.10	Determinación del efecto bacteriostático y/o bactericida de los 3 extractos.....	101
3.10.1	Preparación de material.....	101
3.10.2	Determinación del efecto bacteriostático/bactericida.....	102
3.10.3	Interpretación de los resultados para determinar efecto bactericida bacteriostático.....	103
3.11	Microscopia electrónica.....	105
3.11.1	Preparación de material.....	105
3.11.2	Preparación de las bacterias.....	105
3.11.3	Preparación de rejillas con membrana fomvar.....	108
3.11.4	Técnica de tinción negativa.....	108
3.12	Diagrama general de trabajo.....	110



4. Resultados.....	111
4.1 Aislamiento e identificación de bacterias....	111
4.2 Evaluación del efecto inhibitorio de los extractos.....	113
4.2.1 Extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> .....	113
4.2.2 Extracto de <i>Caléndula officinalis</i> .....	116
4.2.3 Extracto de <i>Echinacea purpúrea</i> .....	119
4.2.4 Extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> y <i>Caléndula officinalis</i> .....	122
4.2.5 Extracto de <i>Caléndula officinalis</i> y <i>Echinacea purpúrea</i> .....	125
4.2.6 Extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> y <i>Echinacea purpúrea</i> .....	128
4.2.7 Extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> , <i>Caléndula officinalis</i> y <i>Echinacea purpúrea</i> .....	132
4.3 Resultados de CMI.....	138
4.4 Efecto bacteriostático y/o bactericida.....	140
4.5 Observaciones obtenidas en microscopio electrónico.....	142
4.5.1 <i>Escherichia coli</i> tratada con extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> .....	142
4.5.2 <i>Staphylococcus aureus</i> tratado con extracto de <i>Echinacea purpúrea</i> .....	143
4.5.3 <i>Streptococcus uberis</i> tratado con extracto de <i>Caléndula officinalis</i> .....	144
4.5.4 <i>Streptococcus faecalis</i> tratado con la mezcla de extractos: <i>Hippocratea excelsa</i> y	



---

---

<i>Caléndula officinalis</i> .....	146
5. Discusión de resultados.....	148
6. Conclusiones.....	166
7. Sugerencias.....	167
8. Apéndices.....	168
8.1    Material, equipo y reactivos.....	168
8.2    Preparación de reactivos.....	171
9. Referencias.....	172



## INDICE DE FIGURAS

	PAG.
Figura (1): Esquema de la anatomía de la ubre.....	27
Figura (2): Primera línea de defensa, de la ubre, contra invasiones bacterianas.....	30
Figura (3): Por cada caso de mastitis clínica existen 20 a 40 casos de subclínica.....	34
Figura (4): Fuentes de microorganismos causantes de mastitis.....	36
Figura (5): Estructura de la pared celular estafilocócica.....	39
Figura (6): Vaca con infección crónica presenta, ubres deformes.....	55
Figura (7): Cambios principales en el tejido mamario afectado por la mastitis.....	57
Figura (8): Tres de las principales rutas de transmisión bacteriana durante el ordeño.....	58
Figura (9): Prueba de California.....	63
Figura (10): Aparato para medir la conductividad eléctrica de la leche.....	64
Figura (11): Administración de una infusión intramamaria.....	66
Figura (12): Flor de <i>Caléndula officinalis</i> .....	67
Figura (13): Bejuco leñoso de <i>Hippocratea excelsa</i> .....	71
Figura (14): Flor de <i>Echinacea purpúrea</i> .....	73
Figura (15): Isobutilamidas identificadas en la raíz de <i>Echinacea purpúrea</i> .....	75



Figura (16):	Microscopio electrónico de transmisión.....	77
Figura (17):	Microplaca con diluciones de extracto a evaluar evidenciando actividad bacteriana con el reactivo MTT.....	100
Figura (18):	Método de Mosmann adicionando reactivo de MTT a cada pozo de la técnica de dilución en microplaca.....	101
Figura (19):	Esquema que muestra la técnica de tinción negativa.....	109
Figura (20):	Resultados para <i>Streptococcus uberis</i> y <i>Streptococcus faecalis</i> con tres diferentes combinaciones de extractos utilizando el método de Mosmann y dilución en microplaca.....	137
Figura (21):	Resultados para <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus uberis</i> con el extracto de <i>Caléndula officinalis</i> ; lectura con MTT dilución en microplaca.....	137
Figura (22):	Fotografías de <i>Escherichia coli</i> obtenidas con microscopio electrónico.....	142
Figura (23):	Fotografías de <i>Staphylococcus aureus</i> obtenidas con microscopio electrónico.....	144
Figura (24):	Fotografías de <i>Streptococcus uberis</i> obtenidas con microscopio electrónico.....	145
Figura (25):	Fotografías de <i>Streptococcus faecalis</i> obtenidas con microscopio electrónico.....	147
Figura (26):	Fundamento del método de Mosmann:	



---

reducción de la sal de tetrazolium a formazán..... 154



## INDICE DE TABLAS

	PAG.
Tabla (1): Cambios en la composición de la leche ocasionados por la mastitis.....	34
Tabla (2): Tipo de microorganismos causantes de mastitis.....	38
Tabla (3): Factores de virulencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	41
Tabla (4): Características de identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	42
Tabla (5): Características de identificación de <i>Streptococcus uberis</i> .....	45
Tabla (6): Factores de virulencia de <i>Enterococcus faecalis</i> ...	48
Tabla (7): Características de identificación de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	49
Tabla (8): Características de identificación de <i>Escherichia coli</i> .....	51
Tabla (9): Relación entre conteo de células somáticas (CCS) medido en la leche del tanque a granel, pérdida de la producción y prevalencia de las mastitis subclínicas.....	59
Tabla (10): Reacciones de la prueba de California para la mastitis y recuentos equivalentes de células somáticas en la leche.....	62
Tabla (11): Pruebas de identificación de <i>Staphylococcus</i>	





	<i>aureus</i> .....	88
Tabla (12):	Pruebas de identificación de <i>Streptococcus uberis</i> .....	89
Tabla (13):	Pruebas de identificación de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	90
Tabla (14):	Pruebas de identificación de <i>Escherichia coli</i> .....	91
Tabla (15):	Tabla que muestra las bacterias aisladas e identificadas de las muestras de leche provenientes de casos de mastitis bovina.....	111
Tabla (16):	Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> .....	114
Tabla (17):	Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> .....	115
Tabla (18):	Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Caléndula officinalis</i> .....	117
Tabla (19):	Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Caléndula officinalis</i> .....	118
Tabla (20):	Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Echinacea purpúrea</i> .....	120
Tabla (21):	Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Echinacea purpúrea</i> .....	121



Tabla (22):	Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> - <i>Caléndula officinalis</i> .....	123
Tabla (23):	Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> - <i>Caléndula officinalis</i> .....	124
Tabla (24):	Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Caléndula officinalis</i> - <i>Echinacea purpúrea</i> .....	126
Tabla (25):	Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Caléndula officinalis</i> - <i>Echinacea purpúrea</i> .....	127
Tabla (26):	Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> - <i>Echinacea purpúrea</i> .....	130
Tabla (27):	Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> - <i>Echinacea purpúrea</i> .....	131
Tabla (28):	Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> - <i>Caléndula officinalis</i> - <i>Echinacea purpúrea</i> .....	134



Tabla (29):	Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> - <i>Caléndula officinalis</i> - <i>Echinacea purpúrea</i> .....	135
Tabla (30):	Resultados de CMI de los extractos solos y combinados <i>Caléndula officinalis</i> , <i>Echinacea purpúrea</i> e <i>Hippocratea excelsa</i> , de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus uberis</i> y <i>Streptococcus faecalis</i> .....	139
Tabla (31):	Actividad bactericida o bacteriostática de los tres extractos solos y combinados.....	141



## INDICE DE GRAFICAS

	PAG.
Gráfica (1): Porcentaje de aislamiento de bacterias aisladas de casos de mastitis bovina.....	112
Gráfica (2): Ensayo del extracto de <i>Hippocratea excelsa</i> con las 4 diferentes bacterias y sus respectivos controles.....	116
Gráfica (3): Ensayo del extracto de <i>Caléndula officinalis</i> con las 4 diferentes bacterias y sus respectivos controles (+).....	119
Gráfica (4): Ensayo del extracto de <i>Echinacea purpúrea</i> con las 4 diferentes bacterias y sus respectivos controles (+).....	122
Gráfica (5): Ensayo de la combinación de <i>Hippocratea excelsa</i> y <i>Caléndula officinalis</i> con las 4 diferentes bacterias y sus respectivos controles..	125
Gráfica (6): Ensayo de la combinación de <i>Caléndula officinalis</i> y <i>Echinacea purpúrea</i> con las 4 diferentes bacterias y sus respectivos controles..	128
Gráfica (7): Ensayo de la combinación de <i>Hippocratea excelsa</i> y <i>Echinacea purpúrea</i> con las diferentes bacterias y sus respectivos controles..	132



Gráfica (8):	Ensayo de la combinación de <i>Hippocratea excelsa</i> , <i>Caléndula officinalis</i> y <i>Echinacea purpúrea</i> con las 4 diferentes bacterias y sus respectivos controles (+).....	136
Gráfica (9):	CMI de los extractos de <i>Caléndula officinalis</i> , <i>Echinacea purpúrea</i> e <i>Hippocratea excelsa</i> , solos y combinados frente a bacterias aisladas de casos de mastitis.....	140



## LISTA DE ABREVIATURAS

CMI	Concentración Mínima Inhibitoria.
STH	Hormona somatotropina.
SCC	Recuento de Células Somáticas.
MET	Microscopia Electrónica de Transmisión.
BHI	Infusión Cerebro Corazón (Medio de cultivo)
SSF	Solución Salina Fisiológica
SSFE	Solución Salina Fisiológica Estéril.
PBS	Solución de Buffer de Fosfatos.
DMSO	Dimetil Sulfoxido
NaCl	Cloruro de Sodio.
AS	Agar sangre
AMC	Agar Mac Conkey
EMB	Eosina Azul de Metileno (Medio de cultivo)
AFT	Acido Fosfotúngstico.
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (Sal de Tetrazolium).
mg	Miligramos
µg	Microgramos
ml	Mililitros
µl	Microlitros
nm	Nanómetros



## RESUMEN

El objetivo de este trabajo es determinar el efecto inhibitorio del extracto de: *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, (solos y combinados) en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina utilizando el método de Mosmann y la microscopia electrónica. Las bacterias utilizadas son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis*, las cuales fueron aisladas de muestras de leche procedentes de vacas con mastitis de la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo. *Streptococcus agalactiae* es una bacteria importante en mastitis bovina aunque no fue aislada en este trabajo creemos que es importante en un futuro evaluar su sensibilidad con estos extractos. El interés en el estudio de plantas medicinales como fuente de compuestos farmacológicos activos ha aumentado por todo el mundo y hay una necesidad de estudiar las características de la flora medicinal para validar su uso en la Medicina Tradicional y que esto permita a la Industria Farmacéutica el desarrollo de nuevos productos más efectivos y menos peligrosos así como diferentes formas de administración. Se realizó el aislamiento e identificación de las bacterias de las muestras de leche procedentes de vacas con mastitis. Los extractos se prepararon colocando 15g de cada planta (*Caléndula officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpúrea*) en un litro de etanol al 70%, se esterilizaron por filtración con membrana de celulosa de 0.22 $\mu$ m, posteriormente se realiza una prueba de esterilidad sembrando 100 $\mu$ l de cada extracto en agar BHI y sangre, obteniendo resultados negativos de crecimiento microbiano, se evaporaron hasta sequedad en el horno a temperatura de 50°C y



evitando sobrepasar de 55°C. Se recolectó, pesó y conservó en frascos ámbar la materia seca obtenida de cada extracto en condiciones de esterilidad. Con la materia seca obtenida se prepararon las soluciones stock a concentración de 40µg/µl. Para realizar los ensayos en microplaca se emplearon diluciones dobles y se aplicó el Método de Mosmann ensayando las bacterias aisladas e identificadas con los extractos de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* solos y combinados para determinar la CMI de estos sobre las bacterias. Se determinó el efecto bacteriostático y/o bactericida mediante una prueba cualitativa y finalmente se realizaron observaciones en el microscopio electrónico de transmisión para evidenciar el posible daño de los extractos sobre las células bacterianas evaluadas. Los extractos de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, presentan un efecto inhibitorio en las 4 bacterias utilizadas, principalmente en *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis*, al probar los extractos combinados los resultados mejoran notablemente ya que las bacterias presentan inhibición a concentraciones de extracto menores que cuando se trabajan solos (Ver Tabla 30 y Gráfica 9). El efecto causado por *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* es bacteriostático y las observaciones en el microscopio electrónico de transmisión permitieron determinar que el efecto de los extractos sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis* es a nivel de pared celular por la formación de protoplastos. En *Escherichia coli* al ser una bacteria gram negativa se da la formación de esferoplastos y lisis de algunas bacterias. El daño para *Streptococcus uberis* causado por *Caléndula officinalis* no se considera que sea a nivel de pared





celular ya que no se evidenció alteraciones en esta pero al ser una bacteria altamente sensible al extracto en el método de dilución en microplaca se considera que el daño puede estar a nivel de síntesis de proteínas o ácidos nucleicos. Tanto *Streptococcus uberis* como *Streptococcus faecalis* presentaron un alto nivel de sensibilidad que se puede observar en las CMI de los tres extractos solos y combinados en estas bacterias. Mientras que *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* si presentaron sensibilidad con los extractos solos y esta susceptibilidad aumenta cuando se manejan las combinaciones de las plantas. Los extractos etanólicos al 70% de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* combinados están siendo ya probados en vacas con mastitis en la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo, se espera obtener resultados satisfactorios.



## 1. INTRODUCCIÓN

La mastitis es una inflamación de los cuarterones de la ubre, debe haber sido una de las primeras enfermedades observadas en los animales explotados cuando el ganado vacuno fue domesticado hace unos 5000 años y desde aquella época habrá sido un problema siempre presente para quienes crían y ordeñan vacas lecheras. Desde 1800 se ha producido una corriente constante de publicaciones en la literatura agrícola y veterinaria sobre sus causas y control. La investigación científica que siguió a la demostración de Pasteur de la teoría de que los gérmenes provocaban enfermedades en 1860 y en 1900 quedó establecido que la mayoría de las mastitis era el resultado de infección microbiana y que eran varios patógenos comunes los que provocaban la mastitis y en consecuencia no era una enfermedad única. Aunque la mastitis clínica era detectada fácilmente por los ganaderos durante el ordeño la infección subclínica era mucho más común y causaba mayores pérdidas financieras. Los intentos que se habían realizado para tratar y controlar la mastitis habían fracasado, el progreso había sido escaso o nulo para reducir los niveles de infección. En realidad era probablemente imposible en este momento concebir un control porque no se disponía de medios para eliminar las infecciones que no fuesen la eliminación de las vacas con ubres claramente enfermas. Posteriormente en 1945 se produjo un notable avance con la introducción de la penicilina para la terapia de la mastitis. Por fin era posible eliminar de los cuarterones infectados las infecciones más comunes que provocaban la mastitis. Esto fue un



avance importante en el control de la enfermedad aunque pronto se demostró que esta terapia no era suficiente. (3, 52, 56)

A fines de los años 60 y comienzos de los 70 la resistencia a los agentes antimicrobianos emergió en *Staphylococcus aureus* (actualmente uno de los principales patógenos causantes de las mastitis clínicas) y posteriormente en una gran variedad de gram negativos. Estos eventos llevaron a que los médicos humanos y veterinarios tomaran conciencia del peligro de realizar terapias empíricas. Posteriormente los temores sobre brotes de organismos multirresistentes fueron aplacados, con la esperanza de que la fabricación de nuevos agentes antimicrobianos resultaran efectivos contra estos organismos pero también apareció resistencia a dichos compuestos. (68)

La limitada efectividad de la terapia antibiótica contra la mastitis y el riesgo de residuos en la leche renovaron el interés en los tratamientos alternativos, siendo uno de ellos la herbolaria, la cual parece ser uno de los sistemas terapéuticos usado incluso por ancestros primates no humanos; debido a la abundancia y diversidad de la flora medicinal, las plantas han motivado numerosas y diversas investigaciones, sin embargo su aplicación empírica lleva implícito un profundo saber. (17, 51) En este trabajo se evalúan las propiedades antibacterianas de las plantas: *Caléndula officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpúrea*, contra cuatro bacterias aisladas de casos de mastitis bovina.



Las virtudes medicinales y colorantes de *Caléndula officinalis* fueron conocidas desde la antigüedad, en especial por los árabes e hindúes, posteriormente por los griegos. Los romanos la denominaron *solsequium* que significa "seguidora del sol". Algunos autores sitúan su origen en México, donde los antiguos aztecas atribuían a ella propiedades espirituales, mágicas y medicinales. Fueron los primeros exploradores españoles los que trasladaron sus semillas a España donde se procuró su cultivo, especialmente en los jardines de los monasterios, y de allí al resto de países de la cuenca mediterránea. El Códice de la Cruz-Badiano (Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis) fechado en 1552 es el primer documento escrito conocido que hace referencia a esta planta. En 1578 el botánico Dodoens se refiere a ella "*Tiene unas flores agradables, de color amarillo brillante, las cuales se cierran a la caída del sol...*" También Nicholas Culpeper (1660-1738) famoso herborista inglés la recomienda para "*fortalecer el corazón*" y escribe sobre ella "*Simplemente mire sus flores y su vista mejorará y usted verá cumplida su felicidad*". A su vez el naturalista Linneo (1707-1778) hace referencia a la periodicidad en la abertura de sus flores. En la edad media fue muy empleada para el tratamiento de máculas dérmicas. En la guerra civil norteamericana como en la Primera Guerra Mundial se han empleado ungüentos y pomadas a base de caléndula como desinflamatorio y antiséptico de heridas. <sup>(2, 30)</sup>

La *Echinacea purpúrea* fue utilizada por los nativos norteamericanos para tratar y prevenir enfermedades de tipo infeccioso y tumoral, así también para contrarrestar el efecto tóxico de las mordeduras de



serpiente. En el siglo XIX se adoptó la planta como remedio frente a cuadros gripales y resfriados. <sup>(2, 21)</sup>

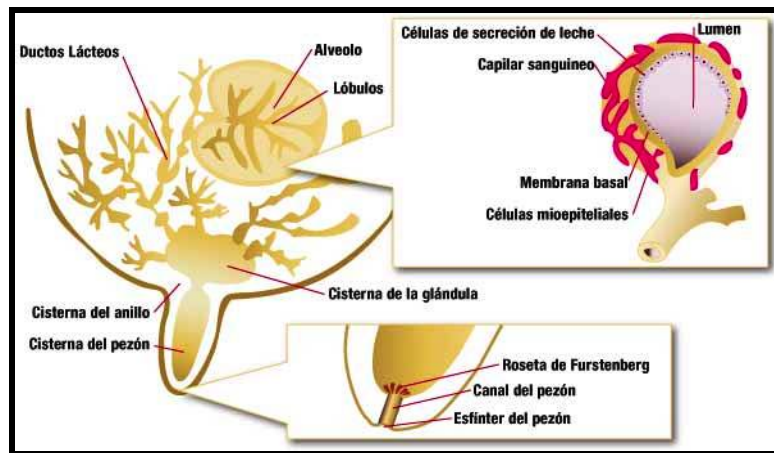
La *Hippocratea excelsa* originaria de México y América Central se comenzó a utilizar en la medicina tradicional para tratar úlceras pépticas, dolencias de la piel, enfermedades del riñón y los desordenes de la menstruación, también presenta características de pesticida que son valoradas por granjeros y rancheros. <sup>(42)</sup>

### 1.1 ANATOMIA Y FISILOGIA DE LA GLÁNDULA MAMARIA

La ubre es un gran cuerpo glandular, el cual sirve para la nutrición del becerro y consta de cuatro cuartos, cada cuarto representa una unidad y consta del cuerpo glandular y el pezón. La ubre esta formada por un sistema de conductos, compuestos por la cisterna del pezón, la cisterna de la glándula, los canales lácteos y los alvéolos. Funcionalmente se diferencia la parte alveolar (porción glandular) del conjunto del alveolo y de la porción cisternal de la cisterna general, así como de los conductos lácteos (Figura 1). En los alvéolos es donde se produce la leche. La pared de un alveolo consta de la membrana basal, en donde se unen, en forma de canasta, las células mioepiteliales contráctiles con las células epiteliales secretoras (células glandulares lácteas). Antes de la ordeña se encuentra una gran parte de la leche (60%) en la porción alveolar de la ubre. Esa leche puede únicamente ser liberada con ayuda de la hormona oxitocina que es producida en el lóbulo posterior de la hipófisis. El pezón ayuda en la eyección de la leche. El pezón debe tener de 6 a 8cm de largo y un diámetro de 2.5 a 3 cm. La musculatura del pezón

representa un sistema que enlaza las fibras musculares que corren en diversas direcciones. En la punta del pezón las fibras musculares se ordenan en forma circular para formar un músculo obturador. El canal del pezón (conducto galactóforo) representa la unión de la cisterna del pezón con el ambiente externo. Este mide de 6 a 10mm de largo. La luz del canal del pezón es de aproximadamente 0.4 a 0.8 mm. Con el envejecimiento de la vaca aumenta la amplitud del conducto galactóforo. Este conducto se encuentra recubierto con epitelio poliestratificado liso. (3,56)

FIGURA (1): Esquema de la anatomía de la ubre



Tomado de (61)

La lactación se mantiene a través de la regulación hormonal. La hormona somatotropina (STH) es la hormona galactopoyética más importante en la vaca. Mediante la inyección de esta hormona puede ser aumentado claramente el rendimiento lácteo de la vaca. Otras hormonas que también son importantes para la secreción de la



leche son las hormonas esteroides, estrógenos, progesterona, prolactina, glucoesteroides y la oxitocina.

Con el término eyección de la leche se entiende la salida activa, es decir, la conducción de la leche alveolar de la porción alveolar a la porción cisternal de la ubre. Esta se inicia mediante la contracción del mioepitelio que rodea al alveolo. La eyección de la leche es un proceso de expulsión, que se puede también denominar “disparo” de la leche. Mediante la eyección de la leche puede ser extraída la leche del alveolo. La eyección de la leche es el resultado de un reflejo involuntario neurohormonal, el cual es conocido como el reflejo de eyección de la leche y que abarca los siguientes procesos:

- 1.- Estimulación de los receptores en la pared del pezón mediante: succión, masaje o estímulo de la ordeña y la transformación del estímulo en un impulso excitatorio.
- 2.- Transmisión de la excitación a las vías aferentes nerviosas y al hipotálamo.
- 3.- Liberación de la hormona oxitocina, la cual se forma en el núcleo paraventricular y supraóptico y por transporte axonal se almacena en la hipófisis posterior y de ahí se libera en la sangre.
- 4.- Transporte de la oxitocina de la sangre al mioepitelio de los alvéolos.
- 5.- Contracción de las células mioepiteliales por efecto de la oxitocina con los receptores oxitocinérgicos.



6.- La leche alveolar con esto es presionada de la parte alveolar a la porción cisternal alcanzando una presión intramamaria de 1-4 kPa. (3, 52, 56)





## 1.2 INMUNOLOGIA DE LA GLANDULA MAMARIA

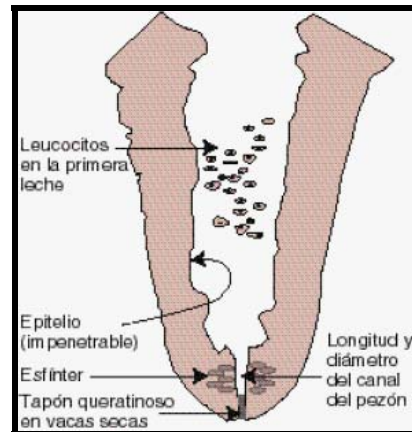
La glándula mamaria posee una serie de mecanismos de defensa que le proveen resistencia contra la invasión bacteriana. Estos mecanismos pueden dividirse en dos categorías:

**INMUNIDAD INNATA O INESPECÍFICA:** la cual es de activación rápida en el momento de la infección pero no aumenta ante múltiples exposiciones al mismo agente infeccioso, esta inmunidad está representada por la barrera física del pezón, macrófagos, polimorfonucleares, células NK y los productos solubles. <sup>(52, 56)</sup>

**INMUNIDAD ADQUIRIDA O ESPECÍFICA:** reconoce los agentes infecciosos y es mediada por anticuerpos, macrófagos y linfocitos, debido a la capacidad de memoria de ciertos linfocitos, esta inmunidad se ve aumentada con la repetición de los estímulos por parte del patógeno.

1.- Defensas anatómicas: el esfínter del pezón es la primera línea de defensa de la glándula mamaria contra los patógenos (Figura 2). Está constituido por músculos que mantienen cerrado el pase a los microorganismos a través del canal del pezón entre los ordeños. <sup>(52, 69)</sup>

**FIGURA (2):** Primera línea de defensa, de la ubre, contra invasiones bacterianas.



Tomado de (69)

2.- Defensas celulares: células de la línea blanca como macrófagos y polimorfonucleares (básicamente neutrófilos) que aportan su función fagocitaria y linfocitos B y T, con función de inmunidad humoral y celular, están presentes en la leche de la glándula mamaria en su estado normal. Los recuentos celulares en ubres sanas son bastante bajos, inferiores a las 100.000 células somáticas/ml, pudiendo llegar en el proceso inflamatorio al millón o más de células/ml. Los neutrófilos proveen la primera línea celular de defensa de la glándula mamaria. Estas células tienen la propiedad de migrar desde la sangre a través del endotelio y el epitelio mamario y llegar a la leche, en respuesta a mediadores tales como las citocinas, prostaglandinas y el complemento. Llegados al sitio de infección, los neutrófilos hacen uso de su poder bactericida a través de la cadena respiratoria de la célula, produciendo radicales oxigenados e hidroxilados, eliminando las bacterias por intermedio de la acción de los iones superóxido, hipoclorito y peróxido de hidrógeno. Durante la fagocitosis la bacteria



está expuesta a numerosos reactivos, oxígeno dependientes, como la peroxidasa, lisozima, enzimas hidrolíticas y lactoferrinas. Sumado a su acción fagocitaria, los neutrófilos producen una batería de péptidos antibacterianos, las defensinas, que son capaces de eliminar bacterias.

3.- Productos solubles: los productos solubles se pueden dividir en innatos y específicos. Las inmunoglobulinas son el factor soluble de la inmunidad específica o humoral. Estas proteínas son producidas por los linfocitos B activados por un antígeno, los cuales proliferan y se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Los anticuerpos en la leche son secretados localmente o llegan a la misma a través de la sangre. Cuatro clases de inmunoglobulinas están presentes en la leche, pudiendo participar en la defensa contra las bacterias: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgA e IgM.

La ubre posee así mismo, componentes bacteriostáticos no específicos. Estos incluyen lactoferrina, complemento, lisozima y el sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxido de hidrógeno. La lactoferrina es una proteína producida por las células epiteliales y los leucocitos, que en presencia de bicarbonato secuestra los iones hierro presentes en la leche. Esta propiedad la hace un agente bacteriostático que evita el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli* y estafilococos que requieren del hierro para su multiplicación.

El complemento comprende una serie de proteínas que al actuar junto con las inmunoglobulinas poseen acción lítica sobre las bacterias patógenas. La lisozima es una proteína de acción bactericida, presente en la leche, que actúa dividiendo los peptidoglicanos de la



pared celular de las bacterias grampositivas, así como también los lipopolisacáridos de la pared externa de las bacterias gramnegativas. La enzima lactoperoxidasa en presencia de tiocianato y peróxido de hidrógeno tiene un efecto bacteriostático. <sup>(52, 56, 59)</sup>

### 1.2.1 FACTORES QUE DISMINUYEN LA RESISTENCIA NATURAL DE LA UBRE:

**Daños en los pezones:** Si el canal del pezón es lesionado, literalmente se abre la puerta a la invasión de patógenos.

- **Elevada presencia de microorganismos:** Con este término queremos decir que hay una gran cantidad de bacterias en el sitio (además de otros microorganismos). Las concentraciones ambientales elevadas de bacterias hacen que el mecanismo de defensa de la ubre se debilite.
- **Deficiencias en la alimentación:** Debido a las deficiencias en la alimentación, las vacas débiles son presa fácil de una infección en la ubre.
- **Factores estresantes:** Cualquier tipo de estrés puede ser dañino a la larga y lesionar el sistema inmune de la vaca. Algunos factores estresantes son por ejemplo: sobrecupo de vacas en el establo, cambiar frecuentemente el personal, deficiencias en el manejo de las pezuñas.
- **Otras Enfermedades:** Cuando se presentan diferentes enfermedades, que no dañan directamente a la ubre, se puede debilitar el mecanismo de defensa contra patógenos de la mastitis. <sup>(56)</sup>



### 1.3 DEFINICION DE MASTITIS BOVINA

La mastitis es una reacción inflamatoria de los tejidos secretores o conductores de la leche en la glándula mamaria, como respuesta a una infección bacteriana o lesión traumática. El término deriva de griego *mastos*; ubre e *itis*; inflamación. <sup>(52)</sup>

El propósito del proceso inflamatorio es eliminar o neutralizar a los microorganismos invasores y asistir en la reparación de tejidos dañados y de esta forma restablecer la función normal de la glándula. Este proceso se caracteriza por diversos cambios físicos y químicos en la leche y por alteraciones patológicas en el tejido glandular (Tabla 1). Los cambios más importantes que se producen en la leche incluyen la modificación del color, la presencia de coágulos y un gran número de leucocitos. Este incremento leucocitario se debe, en la mayoría de los casos a una reacción tisular frente a la lesión, y está precedido de cambios en la leche que son consecuencia directa del daño tisular. <sup>(45, 52)</sup>

**TABLA (1).** Cambios en la composición de la leche ocasionados por la mastitis.

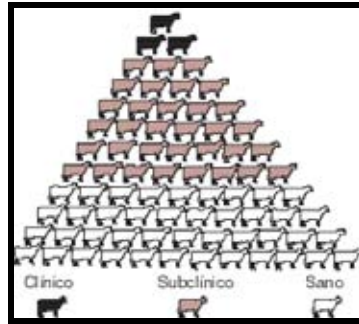
PARAMETRO	CAMBIO	CAUSA
Lactosa	Disminución	Disminuye la síntesis
Grasa	Disminución	
Caseína	Disminución	
Proteínas del suero	Aumento	Pasan de la sangre
Cloruro	Aumento	
Sodio	Aumento	
pH	Aumento	Paso de sustancias

Tomado de (56)

#### 1.4 CLASIFICACIÓN DE LA MASTITIS BOVINA

Existe una gran variación en las formas de presentación de la mastitis. Una clasificación generalmente aceptada de los diferentes tipos de mastitis se basa en el grado de severidad de los síntomas y en su duración. <sup>(52)</sup>Por cada caso clínico de mastitis existen 20 a 40 casos de mastitis subclínica (Figura 3). <sup>(69)</sup>

**FIGURA (3):** Por cada caso de mastitis clínica existen 20 a 40 casos de subclínica.



Tomado de (69).

##### ▪ MASTITIS CLINICA

Es cuando se presenta con signos y síntomas observables como hinchazón de uno o más cuartos en la ubre, calor y dolor al contacto y cambios macroscópicos en la leche como coágulos, descamaciones, suero descolorido y algunas veces sangre. La sola presencia de cambios macroscópicos en la leche sin la observación de signos en la ubre también se define como mastitis clínica. La severidad puede variar entre una mastitis clínica leve, hasta una mastitis clínica hiperaguda, en la cual se presenta sintomatología sistémica, como aumento de la temperatura corporal, deshidratación, inapetencia y malestar general que en algunos casos puede ser fatal. <sup>(45, 52, 56, 59)</sup>



## ▪ MASTITIS SUBCLINICA

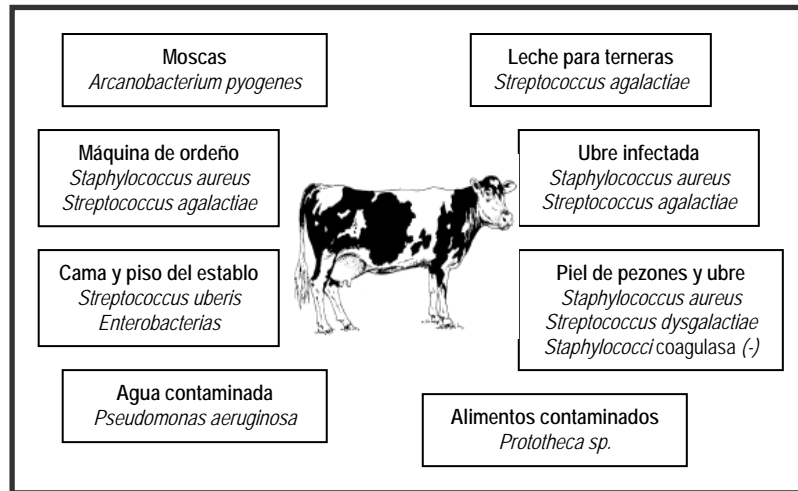
No presenta signos o síntomas observables y por lo general el animal, la ubre y la leche aparentan ser normales, ya que hay inflamación de la ubre sin síntomas externos reconocibles, a pesar de ello los microorganismos y células blancas de la leche (células somáticas) que combaten las infecciones se encuentran elevados en gran número en la leche. Este tipo de mastitis es prolongada o crónica. (45, 52, 56, 59)

### 1.5 ETIOLOGIA

La mastitis puede tener su origen en traumatismos o en una alteración fisiológica aunque la enfermedad con importancia económica es siempre el resultado de una infección microbiana. No existe una flora intramamaria normal; si los microorganismos se establecen en el interior de la ubre constituyen una infección. (3)

Los agentes causantes de la mastitis bovina son microorganismos que habitan en la ubre de la vaca y sus alrededores (Figura 4). Más de 100 microorganismos fueron implicados como causantes de infección intramamaria, siendo las más importantes bacterias grampositivas como *Staphylococcus* y *Streptococcus* y gramnegativas pertenecientes a las enterobacterias.

De acuerdo con su epidemiología pueden dividirse en tres grupos: Contagiosos, ambientales y oportunistas. (45, 52, 56)

**FIGURA (4).** Fuentes de microorganismos causantes de mastitis.

Tomado de (52)

**▪ MICROORGANISMOS CONTAGIOSOS**

La fuente de microorganismos contagiosos es la ubre de la vaca afectada, diseminándose a partir de esta hacia otras vacas. El lugar donde se produce el contagio es la sala de ordeño, siendo agentes causales de mastitis subclínica, aunque también pueden causar mastitis de tipo clínico. Estos microorganismos colonizan y crecen en la piel de la ubre y dentro del canal del pezón (Tabla 2). (45, 52, 56)

**▪ MICROORGANISMOS AMBIENTALES**

Viven en los alrededores de la vaca ya que la fuente de estos microorganismos es el entorno, por ejemplo; cama, estiércol, agua contaminada y restos de comida. Estos microorganismos acceden a la





ubre en los intervalos entre los ordeños. La infección causada por estos microorganismos es de corta duración siendo principalmente mastitis de tipo clínico (Tabla 2). (45, 52, 56)

#### ▪ MICROORGANISMOS OPORTUNISTAS

Se encuentran en la piel de la ubre y pezones, pertenecen a este grupo los *Staphylococci* coagulasa negativos, que adquirieron importancia a raíz del descenso en la prevalencia de microorganismos tales como *Staphylococcus aureus* o *Streptococcus agalactia* (Tabla 2). (45, 52, 56)

**TABLA (2):** Tipo de microorganismos causantes de mastitis

TIPO DE MICROORGANISMOS		
Contagiosos	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactia</i> <i>Streptococcus dysgalactie</i> <i>Micoplasma sp</i> <i>Corynebacterium bovis</i>	
Ambientales	<i>Streptococcus no-agalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactie</i> <i>Streptococcus uberis</i>
	Enterobacterias	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>
	Otros	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Prototheca zopfii</i> Especies de <i>Candida</i>
Oportunistas	<i>Staphylococci</i> coagulosa negativos	

Tomado de (52)



## 1.6 MASTITIS CAUSADA POR ESTAFILOCOCOS

La mastitis causada por bacterias del género *Staphylococcus* es de distribución mundial. A nivel de mastitis subclínica son los agentes más importantes mientras que participan también como causantes de mastitis clínica. <sup>(52)</sup>

### 1.6.1 *Staphylococcus aureus*

*Staphy* = racimo de uvas    *coccus* = grano o vaya    *aureus* = dorado o amarillo

### 1.6.2 CARACTERISTICAS GENERALES

Bacterias Gram (+)

Forma esférica de 1mm de diámetro. Se agrupan en racimos de uvas

No presentan motilidad

Aerobios y anaerobios facultativos

Utilizan carbohidratos por vía fermentativa

En medios sólidos forman colonias redondas, lisas, prominentes, brillantes. Comúnmente sus colonias son de color gris o amarillo dorado intenso.

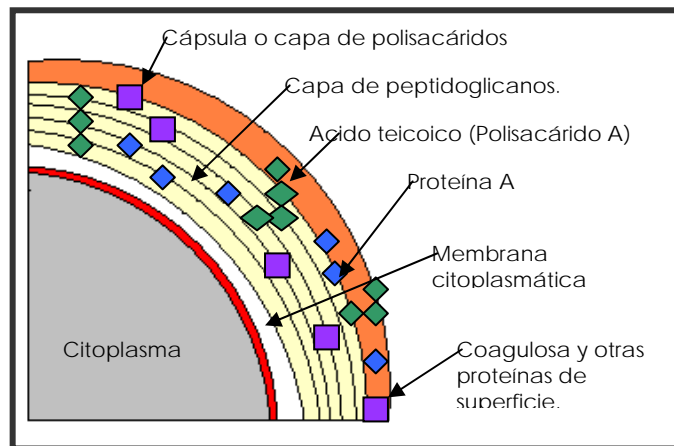
Pocas cepas producen una cápsula o capa mucoide (Figura 5).

Crecen en medios simples como agar y caldo nutritivo.

Crecen satisfactoriamente en Gelosa sangre, gelosa chocolate y BHI.

Resisten NaCl al 9% <sup>(7, 55)</sup>

FIGURA (5): Estructura de la pared celular estafilocócica.



Tomado de (38)

### 1.6.3 FACTORES DE PATOGENICIDAD

Péptidoglucano.

Representa la mitad de la pared celular en peso, está formado por capas de cadenas de glucanos construidas con 10 o 12 subunidades alternantes de ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. La capa de péptidoglucano se compone de numerosas capas entrecruzadas lo que confiere una mayor rigidez a la pared celular. El péptidoglucano posee una actividad de endotoxina ya que estimula la producción de pirógenos endógenos, la activación del complemento, la formación de IL-1 por parte de los monolitos y la agregación de los leucocitos PMN, este proceso origina la formación de abscesos (Tabla 3).<sup>(38)</sup>



### Ácidos teicoicos.

Son polímeros fosfatados específicos de especie que se unen de manera covalente a residuos de ácido N-acetilmurámico de la capa de péptidoglucano o a través de la unión lipofílica a la membrana citoplásmica (ácidos lipoteicoicos). El ácido teicoico de ribitol con residuos de N-acetilglucosamina (Polisacárido A) se encuentra presente en *S. aureus*. Los ácidos teicoicos median en la unión de los estafilococos en las superficies mucosas a través de su unión específica a la fibronectina (Tabla 3).<sup>(38)</sup>

TABLA (3): Factores de virulencia de *Staphylococcus aureus*

FACTORES DE VIRULENCIA DE <i>Staphylococcus aureus</i>	
Factores de virulencia	Efectos biológicos
Péptidoglucano	Proporciona estabilidad osmótica, estimula la producción de pirógenos endógenos, quimioatrayente leucocitario (formación de abscesos)
Ácido teicoico	Regula la concentración catiónica de la membrana celular, se une a la fibronectina.
Proteína A	Inhibe la eliminación mediada por anticuerpos al unirse a los receptores Fc de IgG <sub>1</sub> , IgG <sub>2</sub> e IgG <sub>4</sub> , quimioatrayente leucocitario, anticomplemento.
Membrana citoplásmica	Barrera osmótica, regula el transporte hacia el interior y el exterior de la célula, localización de enzimas biosintéticas y respiratorias.
Citotoxinas $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ , $\gamma$ y leucocidina	Tóxicas para muchas células incluyendo leucocitos, eritrocitos, macrófagos, plaquetas y fibroblastos.
Toxinas exfoliativas	Proteasas séricas que rompen los puentes intercelulares del estrato granuloso de la epidermis.
Enterotoxinas AE, GI	Superantígenos; estimulan la proliferación de los linfocitos T y la liberación de citocinas, estimulan la liberación de mediadores inflamatorios en los mastocitos, aumentando el peristaltismo intestinal y la pérdida de líquidos.
Coagulasa	Convierte el fibrinógeno en fibrina.
Hialuronidasa	Hidroliza los ácidos hialurónicos en el tejido conectivo, facilitando la diseminación de los estafilococos en los tejidos.
Fibrinolisisina	Disuelve los coágulos de fibrina.
Penicilasa	Hidroliza las penicilinas.

Tomado de (38)



#### 1.6.4 IDENTIFICACIÓN

Las principales características para la identificación de *Staphylococcus aureus* se muestran en la Tabla 4.

**TABLA (4):** Características de identificación de *Staphylococcus aureus*

Característica	Resultado
Motilidad	-
Catalasa	+
OF	F
Oxidasa	-
Coagulasa	+
Fermentación de manitol	+
Fermentación de glucosa	+

Tomado de (55)

#### 1.6.5 *Staphylococcus aureus* COMO CAUSANTE DE MASTITIS.

Es a nivel mundial el agente patógeno contagioso más importante asociado con la glándula mamaria, que causa la mastitis, debido a que responde mal a la terapia antibiótica, es la más persistente de las infecciones, frecuentemente dura varios meses o incluso años, ya que la infección tiende a producir cicatrices que resultan en sacos de infección encerrados en la ubre que son difíciles de alcanzar por los antibióticos, tales sacos pueden romperse y abrirse a otras partes de la glándula más tarde. La mastitis causada por *Staphylococcus aureus* más común es la crónica, por lo general subclínica que puede convertirse en aguda en algunas etapas de la lactación, como el posparto para revertirse a crónica durante la mayor parte de la lactancia.



La fuente principal de infección es la ubre afectada, transmitiéndose básicamente a través de; la máquina de ordeño, manos del ordeñador o paños para las ubres aunque también se han dado contagios de terneras que ingerían leche contaminada con la bacteria. (3, 52, 56)

Las principales ubicaciones primarias de las bacterias son los cuarterones infectados, aunque las bacterias colonizan fácilmente lesiones cutáneas sobre el pezón y en el orificio del conducto del pezón. Los signos de este tipo de mastitis varían según la enfermedad causada. En el caso de la mastitis subclínica son muy inespecíficos, con el tiempo este tipo de mastitis se convierte en crónica, detectándose mediante palpación debido a la fibrosis causada. (3)

La mastitis clínica si es observable por la alteración visible de la leche y signos clásicos de inflamación en la ubre. *Staphylococcus aureus* puede ser causante también de mastitis hiperaguda, la cual rebasa los límites locales de la ubre proporcionando síntomas generales, con fiebre e inapetencia llegando en algunos casos a causar la mastitis gangrenosa. (52)

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* pueden ser erradicadas de los rebaños individuales pero representan un elevado costo para el establecimiento. (52)



## 1.7 MASTITIS CAUSADAS POR ESTREPTOCOCOS

Los estreptococos son agentes de gran importancia como causantes de mastitis estos pueden dividirse en dos grupos, sobre la base de su epidemiología. El primero constituido por los estreptococos contagiosos, que se transmiten de vaca en vaca como *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactie*. El segundo grupo abarca los agentes ambientales en los cuales la fuente de contaminación son el entorno de la vaca como *Streptococcus dysgalactie* y *Streptococcus uberis*. (45, 52, 56)

### 1.7.1 *Streptococcus uberis*

#### 1.7.2 CARACTERISTICAS GENERALES

Bacterias Gram (+)

Forma esférica u ovoide

Dispuestos en pares o cadenas de longitud variable.

Aerobios y anaerobios facultativos.

Metabolismo fermentativo.

Algunos elaboran polisacárido capsular.

Son en cuanto a nutrimentos microorganismos exigentes.

Crecen satisfactoriamente en agar sangre.

Algunos presentan actividad hemolítica. (7, 38, 55)

#### 1.7.3 FACTORES DE PATOGENICIDAD





Recubierto en la mitad de los casos por una cápsula de ácido hialurónico.

No se puede agrupar en ningún grupo antigénico por su amplia variedad de reacciones, el 30 % son del grupo E, pero hay otros que reaccionan con sueros grupo C, D, G, P o U. <sup>(13)</sup>

#### 1.7.4 IDENTIFICACION

Las principales características para la identificación de *Streptococcus uberis* se muestran en la Tabla 5.

**TABLA (5):** Características de identificación de *Streptococcus uberis*.

Característica	Resultado
Motilidad	-
Catalasa	-
OF	F
Oxidasa	-
Hidrólisis de esculina	+
Inulina	+
Crecimiento a 10 °C	-

Tomado de (13)

#### 1.7.5 *Streptococcus uberis* COMO CAUSANTE DE MASTITIS

Después de los coliformes esta bacteria es la de mayor importancia entre los agentes ambientales causantes de mastitis, ya que se le puede encontrar en la cama de la vaca, así mismo se aísla en labios, patas y piel de la ubre. Los factores de virulencia de este microorganismo son similares al resto de los estreptococos, sumándose la presencia de cápsula no antigénica de ácido hialurónico, que dificulta la fagocitosis, siendo el porcentaje de curación menor que



para los otros estreptococos, *Streptococcus uberis* no suele colonizar la piel lesionada del pezón. (3, 13, 52)

La mastitis ocasionada por *Streptococcus uberis* puede originarse tanto en lugares donde la vaca descansa, como en la sala de ordeño, así *S. uberis* se contagia por todas partes con facilidad y durante toda la vida productiva de la vaca. Cerca del 60% de las infecciones se presentan de forma subclínica pero la mayoría de ellas evolucionan a formas clínicas o bien permanecen como mastitis subclínicas. La forma más común es una mastitis aguda clínica sin alteración del estado general de la vaca. (13)

## 1.8 MASTITIS CAUSADAS POR ENTEROCOCOS

### 1.8.1 *Enterococcus faecalis*

### 1.8.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Se clasificaron previamente como estreptococos del grupo D debido a que poseen el antígeno de la pared celular del grupo D, un ácido teicoico con glicerol que se asocia a la membrana citoplasmática. En el año de 1984 los enterococos se clasificaron en el nuevo género *Enterococcus*.

Bacterias Gram (+).

Forma esférica.

Se disponen en parejas o en cadenas cortas.

Anaerobios facultativos.

Temperatura óptima de crecimiento de 35°C.

Toleran NaCl al 6.5% y sales biliares al 40%. (38, 28)



### 1.8.3 FACTORES DE PATOGENICIDAD.

Son microorganismos comensales que no fabrican ninguna toxina potente ni otro factor de virulencia definido (Tabla 6). En consecuencia por lo general se considera que poseen una limitada capacidad patógena. <sup>(38)</sup>

**TABLA (6):** Factores de virulencia de *Enterococcus faecalis*.

Factor de virulencia	Efecto biológico
Adhesinas de superficie	
Sustancia de agregación	Proteína de aspecto veloso de la membrana citoplásmica que facilita el intercambio de plásmido y la unión a las células epiteliales.
Proteína enterocócica de superficie	Adhesina de unión a colágeno
Adhesinas hidrocarbonadas	Mediadoras en la unión con las células del huésped.
Factores secretados	
Citolisina	Bacteriocina proteica que inhibe el crecimiento de las bacterias grampositivas, favorece la colonización y produce daño tisular local.
Feromona	Quimioatrayente para los neutrófilos que puede regular la función inflamatoria.
Gelatinasa	Hidroliza gelatina, colágeno, hemoglobina y otros péptidos pequeños.
Resistencia a antibióticos	
Plásmidos y genes cromosómicos	Resistente a aminoglucósidos, $\beta$ -lactámicos y vancomicina.

Tomado de (38)



### 1.8.4 IDENTIFICACION

Las principales características para la identificación de *Enterococcus faecalis* se muestran en la Tabla 7.

**TABLA (7):** Características de identificación de *Enterococcus faecalis*.

Característica	Resultado
Motilidad	-
Catalasa	-
OF	F
Oxidasa	-
Bilis esculina	+
NaCl 6.5%	+
Manitol	+
Lactosa	+
Almidón	-
Desarrollo a 10°C	+
Desarrollo a 45°C	+

Tomado de (7)

### 1.8.5 *Enterococcus faecalis* COMO CAUSANTE DE MASTITIS.

Los *Enterococcus* o *Streptococcus faecalis* pueden causar mastitis en forma oportunista, son de tratamiento difícil por su resistencia a los antibióticos. Debido a que los enterococos tienen como hábitat natural el tracto gastrointestinal de los mamíferos, de ahí pueden ser evacuados en los corrales y cuando hay un animal con inmunodepresión podrán colonizar la ubre. Son de incidencia esporádica como agentes etiológicos de mastitis. (52, 56)



## 1.9 MASTITIS CAUSADAS POR ENTEROBACTERIAS.

Varias enterobacterias causan mastitis, los coliformes ambientales incluyen las bacterias gram negativas como *Escherichia coli*, especies de *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y especies de *Pseudomonas*.

(45)

### 1.9.1 *Escherichia coli*

### 1.9.2 CARACTERISTICAS GENERALES.

Bacterias Gram (-)

Forma de bacilos

Anaerobios facultativos.

Fermentan la glucosa.

Crecen en medios simples, diferenciales, selectivos y enriquecidos.

Forma colonias lisas, circulares, convexas con bordes bien diferenciados.

En el medio EMB forma colonias verdes con brillo metálico por utilización de la lactosa.

Metabolismo fermentativo. <sup>(28)</sup>



### 1.9.3 IDENTIFICACION

Las principales características para la identificación de *Escherichia coli* se muestran en la Tabla 8.

**TABLA (8):** Características de identificación de *Escherichia coli*.

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
Catalasa	+	Arginina dihidrolasa	+/-
Oxidasa	-	Fenilalanina desaminasa	-
Motilidad	+	Lisina descarboxilasa	+
OF	F	Acido de la glucosa	+
Indol	+	Hidrólisis de gelatina	-
Rojo de metilo	+	Fermentación de arabinosa	+
Voges Proskauer	-	Fermentación de maltosa	+
Citratos	-	Fermentación de manitol	+
Reducción de nitratos	+	Fermentación de xilosa	+
Malonatos	+	Producción de gas	+
Hidrólisis de urea	-	Hidrólisis de esculina	-

Tomado de (28)



#### 1.9.4 *Escherichia coli* COMO CAUSANTE DE MASTITIS.

La mastitis causada por *Escherichia coli* es una de las más interesantes debido a la variedad de síntomas locales y generales y a los diversos tratamientos que tiene esta manifestación clínica de la glándula mamaria. La exposición de la ubre a los agentes ambientales como *Escherichia coli* ocurre en especial entre los ordeños, es decir, fuera de la sala de ordeño; ya que las bacterias coliformes son habitantes normales del suelo e intestino de las vacas, se acumulan y multiplican en la materia fecal y en la cama. Los coliformes pueden causar mastitis solamente si las partículas contaminadas del medio ambiente entran en contacto con la ubre. <sup>(52, 59)</sup>

Desde el punto de vista clínico, la enfermedad puede presentar una amplia gama de gravedad, pudiendo ser fatal, aguda, recurrente clínica y hasta llegar a ser subclínica. La enfermedad es más común en las primeras etapas de la lactación desde el parto hasta los primeros tres meses de la misma. *Escherichia coli* y otros coliformes infectan la glándula mamaria a través del canal del pezón. Las dosis infectivas son relativamente bajas, estando en el rango de las 50 UFC. La proliferación rápida de microorganismos es una condición esencial en la aparición de la enfermedad y se correlaciona con la magnitud de los signos clínicos. <sup>(52)</sup>

Las infecciones pueden llegar a ser clínicas en un día o dos y a menos que se conviertan en sobreagudas la infección es eliminada rápidamente durante el proceso inflamatorio. Una proporción de los animales que padecen la enfermedad sobreaguda mueren por endotoxemia o quedan tan debilitados que tienen que ser eliminados aunque hayan recibido terapia con antibióticos y otros fármacos para



mantenimiento. Las infecciones por coliformes raras veces se presentan en el periodo seco y no colonizan la piel de los pezones. <sup>(3)</sup>

Las bacterias gram negativas en este caso los coliformes elaboran una endotoxina a partir de los lipopolisacáridos (LPS) que es una parte de la membrana bacteriana y es producida durante la multiplicación y es liberada con la muerte de las bacterias. Esta endotoxina causa después de su liberación una serie de eventos que finalizan en la sepsis y el shock séptico. El efecto de los LPS es mediado por agentes inflamatorios como TNF, IL-1, IL-6, IL-8, eicosanoides y el factor XII (Hageman). Estos mediadores de la inflamación son los responsables por la respuesta sistémica que se observa en el animal así como por los signos locales de la ubre. <sup>(52)</sup>





### 1.10 PATOGENIA: DESARROLLO DE LA MASTITIS.

La velocidad, el carácter y la intensidad de los síntomas clínicos así como la duración y terminación de la inflamación de la ubre esta determinada por:

- La patogenicidad y virulencia del agente causal.
- Los mecanismos de defensa de la vaca.
- El nivel funcional de la glándula mamaria.
- Y eventualmente la efectividad de un tratamiento. <sup>(56)</sup>

La infección de las glándulas mamarias ocurre siempre a través del canal del pezón y parece que la secuencia natural, en la primera impresión, es el desarrollo de inflamación, después de la infección. Sin embargo la evolución de la mastitis es más compleja que esto y se puede explicar satisfactoriamente según las tres fases; invasión, infección e inflamación. <sup>(45)</sup>

La INVASION representa la fase en la que los microorganismos patógenos se desplazan desde el exterior del pezón a la leche, dentro del canal del pezón. El pezón en sí es la primera línea de defensa contra la penetración de las bacterias dentro de la ubre. Normalmente, el esfínter cierra el canal del pezón fuertemente cuando la vaca no es ordeñada. La invasión del pezón se presenta generalmente durante el ordeño. Los microorganismos presentes en la leche o en la punta del pezón son impulsados dentro del canal del pezón y de la cisterna cuando existe la entrada indeseable de aire en la unidad de ordeño. Luego del ordeño, el canal del pezón permanece dilatado por una o dos horas e inclusive, el canal del pezón dañado puede permanecer parcialmente o permanentemente abierto. Los microorganismos del ambiente (materia fecal, cama, etc.) o aquellos que se encuentran en lesiones de la piel en la punta del



pezón, pueden invadir fácilmente y abrir total o parcialmente el canal.  
(10, 45)

La INFECCIÓN es la fase en que los agentes patógenos se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario. Después de la invasión los microorganismos pueden localizarse en el canal del pezón y desde aquí puede ocurrir una serie de multiplicaciones y extensiones en el tejido mamario produciéndose la infección de este tejido. La multiplicación de algunos microorganismos puede causar la liberación de endotoxinas como en la mastitis por coliformes, que causa efectos sistémicos graves con consecuencias inflamatorias mínimas. (45)

La infección es seguida de la INFLAMACIÓN, fase en la que se produce la mastitis clínica, con distintos grados de anomalías de la ubre y efectos sistémicos variables, de leves a intensos; entonces se pueden producir anomalías importantes y subclínicas en la leche. Las anomalías de la ubre incluyen una hinchazón notable (Figura 6), un aumento de la temperatura y, en las fases agudas y fulminantes, gangrena y, a veces, formación de abscesos y atrofia de las glándulas en las fases crónicas. Los efectos sistémicos se deben a los mediadores de la inflamación. Los cambios más importantes en la leche comprenden una disminución de la producción, la presencia de productos de la inflamación y cambios marcados en la composición de la leche. (45, 52)



**FIGURA (6):** Vaca con infección crónica presenta, ubres deformes.

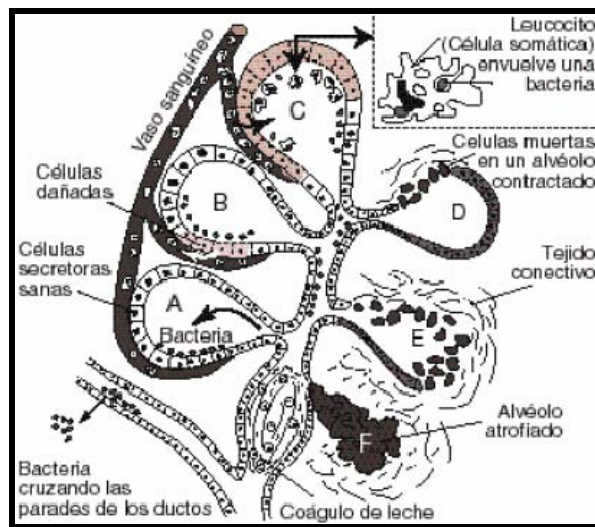


Tomado de (63)

La anomalía subclínica más importante que se produce en la leche es el aumento del recuento de las células somáticas, que es la medida más común de calidad de la leche y de la salud de la ubre. Las células somáticas de la leche son de varios tipos, incluyendo neutrófilos, macrófagos, linfocitos y un porcentaje pequeño de células epiteliales. Algunas bacterias liberan subproductos metabólicos, enterotoxinas o componentes de la pared celular, al colonizar y multiplicarse en la glándula mamaria. Estos factores bacterianos, directa o indirectamente, actúan como quimioatrayentes de los leucocitos. Si las células somáticas se desplazan rápidamente desde la corriente sanguínea y son capaces de eliminar los estímulos inflamatorios (bacterias), cesa la movilización de los leucocitos y las células somáticas recuperan sus valores normales. Si las bacterias son capaces de sobrevivir a esta respuesta inmediata del huésped, la inflamación continúa provocando la migración de las células somáticas entre las células secretoras mamarias adyacentes, hacia la luz de los alvéolos. La diapédesis prolongada de los leucocitos causa la lesión del tejido mamario, provocando una disminución de la producción láctea (Figura 7). Los neutrófilos son el tipo celular

predominante en los tejidos y las secreciones mamarias durante la inflamación, pueden constituir más del 90% de los leucocitos totales de las glándulas mamarias. Cuando llegan al lugar de la infección, fagocitan y destruyen a los microorganismos patógenos, los neutrófilos ejercen su efecto bactericida por medio de la explosión respiratoria que produce radicales hidroxilo y de oxígeno, componentes importantes del mecanismo destructor dependiente de oxígeno. (3, 45, 52)

**FIGURA (7):** Cambios principales en el tejido mamario afectado por la mastitis.

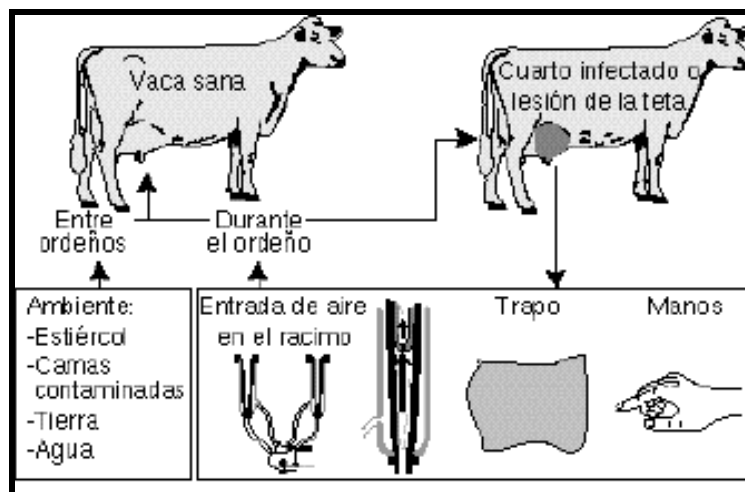


Tomado de (69)

### 1.11 TRANSMISIÓN DE LA MASTITIS.

En un intento por controlar los diferentes tipos de infecciones, es importante considerar la fuente y formas de transmisión de la enfermedad. Los organismos que causan la mastitis viven en diferentes ambientes como: materia fecal, cama, piel, etc. (Figura 8). La limpieza general de las vacas y su alojamiento, como también buenos procedimientos de manejo (especialmente ordeño) son formas efectivas de controlar la difusión de la mastitis. <sup>(59)</sup>

**FIGURA (8):** Tres de las principales rutas de transmisión bacteriana durante el ordeño.



Tomado de (59)



## 1.12 DETECCIÓN DE LA MASTITIS EN REBAÑOS.

### 1.12.1 RECUENTO DE CELULAS SOMÁTICAS (SCC).

Más del 98% de las células somáticas que se encuentran en la leche provienen de las células blancas que ingresan a la misma en respuesta a la invasión bacteriana de la ubre. El SCC de la leche del tanque colectivo que se recoge en la granja o en el almacén de procesamiento de leche, se ha convertido en la prueba más importante empleada universalmente como indicador de la salud de la ubre, para medir la calidad de la leche (Tabla 9). El conteo de células somáticas de una muestra compuesta no revela el tipo de infección, ni la identidad de las vacas infectadas, los recuentos son útiles principalmente para crear conciencia en los granjeros de la existencia de un problema de mastitis en el rebaño de manera que cuando el recuento de células somáticas en el tanque colectivo exceda los límites permitidos está indicado realizar una investigación adicional mediante otras técnicas. <sup>(45, 57)</sup>

**TABLA (9):** Relación entre conteo de células somáticas (SCC) medido en la leche del tanque a granel, pérdida de la producción y prevalencia de las mastitis subclínicas en el rebaño.

Conteo de células somáticas/ml	Cuartos infectados	Pérdida de producción en %	Mastitis subclínica
< 200 000	6%	0 – 5	Cerca de cero
200 000 – 500 000	16%	6 – 9	Pocos casos
500 000 – 1 000 000	32%	10 – 18	Diseminada
> 1 000 000	48%	19 – 29	Epidémica

Tomado de (57)



### **1.12.2 CULTIVO DE LA LECHE.**

Las bacterias presentes en las muestras de leche del tanque colectivo pueden proceder, de ubres infectadas, de la superficie de los pezones y las ubres o de diversas fuentes ambientales. El cultivo de una muestra de leche del tanque colectivo puede ser un método eficaz para analizar los rebaños lecheros en cuanto a la presencia de los principales microorganismos patógenos de la mastitis. <sup>(45)</sup>

Con más frecuencia una mezcla de diferentes tipos de bacterias es encontrada, pero algunas veces, una especie de bacteria puede predominar. Si los conteos bacterianos se encuentran elevados (>50 000 bacterias/ml), un cultivo puede proveer claves para la fuente o fuentes de contaminación. Rebaños bien manejados poseen conteos bacterianos de menos de 1000 bacterias/ml. <sup>(57)</sup>

### **1.13 DETECCION DE MASTITIS EN VACAS INDIVIDUALES.**

#### **1.13.1 EXAMEN FISICO DE LA UBRE.**

Los signos de mastitis aguda incluyen cuartos inflamados, con temperatura elevada y dolor al tacto. Los cambios en el tamaño y la presencia de tejido cicatrizal pueden ser detectados más fácilmente luego del ordeño, cuando la ubre se encuentra vacía. <sup>(49, 57)</sup>

#### **1.13.2 ASPECTO DE LA LECHE.**

La observación de los primeros chorros de leche permite la detección de leche anormal que debe de ser retirada del consumo. La leche anormal puede mostrar decoloración (aguado), descamaciones, o



coágulos. Se debe tener la precaución, al remover esta leche de la ubre, de no salpicar esta leche contaminada en las patas, cola o ubre del animal. Además, el operador no debe de colectar estos primeros chorros de leche en la palma de su mano debido al riesgo de transferir bacterias de un cuarto a otro y de una vaca a otra. En los establos donde la leche se ordeña en el mismo lugar donde se alojan las vacas, la primera leche es volcada en una taza especial o plato. En los echaderos de ordeño, puede ser volcada directamente al piso para ser lavada inmediatamente luego de ser evaluada. (3, 57)

### 1.13.3 LA PRUEBA DE CALIFORNIA DE MASTITIS.

Para esta prueba, la leche de cada cuarto se mezcla con una solución detergente, el alquilauril sulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina. A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación.

La leche de los cuartos infectados forma un gel; la consistencia del gel es evaluada en forma visual (Figura 9). Esta reacción se relaciona en general con el número de células somáticas en la leche, y una reacción positiva indica mastitis (Tabla 10). (5, 10, 45)



**TABLA (10):** Reacciones de la prueba de California para la mastitis y recuentos equivalentes de células somáticas en la leche.

Resultado de la prueba	Reacción observada	Recuento equivalente de células somáticas en la leche
Negativo	La mezcla permanece líquida sin viscosidad ni formación de gel.	0 – 200 000 células/ml.
Trazas	Se observa una ligera formación viscosa. Esta reacción se aprecia mejor cuando se mueve la paleta de un lado a otro.	150 000 – 500 000 células / ml.
1 +	Aparece una clara formación viscosa, inmediatamente después de mezclar las soluciones, que puede desaparecer con el tiempo. Cuando se remueve con la paleta, el líquido no forma una masa periférica ni la superficie de la solución se vuelve convexa ni adquiere la forma de cúpula.	400 000 – 1500 000 células / ml.
2 +	La clara formación viscosa se observa inmediatamente después de mezclar las soluciones. Cuando se agita la paleta, el líquido forma una masa periférica y queda expuesto el fondo del vaso.	800 000 – 5 000 000 células/ml.
3 +	La formación distintiva viscosa se produce inmediatamente después de mezclar las soluciones puede desaparecer con el tiempo. Cuando se mueve la paleta, la superficie de la solución se vuelve convexa o adquiere la forma de cúpula.	>5 000 000 células/ml.

Tomado de (45)

**FIGURA (9):** Prueba de California.

Tomado de (5)

#### 1.13.4 CULTIVO BACTERIANO.

Generalmente, esta prueba se desarrolla en vacas seleccionadas para las que los conteos de células somáticas de muestras compuestas revelan un problema persistente serio. Los cultivos de leche de una vaca individual identifican la especie bacteriana, por lo tanto es la forma más confiable para decidir un tratamiento óptimo con antibióticos para una vaca en particular. (5, 45, 57)

#### 1.13.5 PRUEBA DE NAGASA.

Se basa en la medición de una enzima asociada a las células (N-acetil-  $\beta$ -D-glucosaminidasa) en la leche, un nivel alto de esta enzima indica un recuento celular elevado. Esta prueba es adecuada para el manejo rápido de un gran número de muestras, por la facilidad de su automatización y se puede realizar con leche fresca y leer el mismo día. (45)



### 1.13.6 PRUEBAS AUTOMATIZADAS DE CONDUCTIVIDAD.

Es la prueba química que ha recibido más atención; está basada en el aumento de los iones de sodio y cloruro con el consiguiente incremento de la conductividad eléctrica que se produce en la leche con mastitis (Figura 10). Existe una relación directa entre la infección intramamaria en las vacas y la conductividad de la leche producida.

(10, 45)

**FIGURA (10):** Aparato para medir la conductividad eléctrica de la leche.



Tomado de (5)

### 1.14 TRATAMIENTO DE LA MASTITIS BOVINA.

En todo el mundo, el tratamiento antibiótico contra la mastitis sigue siendo el procedimiento más común y aceptado para la terapia de la mastitis clínica y subclínica, con la meta de reducir las enormes pérdidas ocasionadas por la enfermedad, debidas a la disminución en la producción de leche por los cuartos afectados, un menor precio diferencial debido a la baja calidad de la leche, los honorarios del veterinario, el desecho de la leche de vacas tratadas y la eliminación



prematura de vacas afectadas. La estrategia del tratamiento depende del grado de la mastitis si es fulminante, aguda, subaguda o subclínica y el estado sanitario del rebaño incluyendo los antecedentes de mastitis. <sup>(52)</sup>

- TRATAMIENTOS CON ANTIMICROBIANOS POR VIA PARENTERAL.

El objetivo en el uso parenteral de un medicamento debe ser; alcanzar el tejido de la ubre y obtener una concentración efectiva sobre un periodo de tiempo lo suficientemente largo. Esta opción debe considerarse en todos los casos de mastitis en que existe una reacción sistémica notable. La reacción sistémica puede controlarse normalmente con dosis estándar de antimicrobianos, pero apenas se consigue la curación de las glándulas afectadas debido a la difusión relativamente deficiente de los antimicrobianos desde la sangre a la leche. Se recomienda también cuando la glándula está muy hinchada y las infusiones intramamarias no pueden difundirse a todas las partes del tejido glandular. La leche de las vacas tratadas debe retirarse del tanque colectivo durante el periodo de tiempo fijado para el antimicrobiano después de la fecha del último tratamiento. <sup>(45, 56)</sup>

- TRATAMIENTO INTRAMAMARIO CON INFUSIONES DE ANTIMICROBIANOS EN LA UBRE (Figura 11).

Por su comodidad y eficacia, las infusiones de antimicrobianos en la ubre habitualmente se utilizan para el tratamiento de mastitis en vacas durante la lactación y como terapéutica en el periodo seco. El grado



de difusión en el tejido glándular es igual si se utiliza agua o pomada como vehículo de la infusión. Es necesario seguir una higiene estricta durante el tratamiento para evitar la introducción de bacterias, levaduras y hongos dentro de los cuarterones. <sup>(45)</sup>

**FIGURA (11):** Administración de una infusión intramamaria.



Tomado de (59)



## 1.15 CALENDULA

### 1.15.1 NOMBRE CIENTÍFICO: *Caléndula officinalis*.

### 1.15.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Planta aromática anual, que pertenece a la familia de las Asteráceas (Compuestas), caracterizada por presentar una altura cercana al medio metro, tallos rectos y ramificados; hojas lanceoladas, pilosas por ambas caras, de 5 a 15cm de largo y márgenes dentados; capítulo grande de 3 a 7cm de diámetro conformado por flores ligulares de color amarillo rojizo, brillantes y dispuestas en filas simples o dobles; y también por flores tubulares centrales (Figura 12). Las flores hacen su aparición durante gran parte del año. El fruto es un aquenio espinoso, curvado. (2, 30, 37)

**FIGURA (12):** Flor de *Caléndula officinalis*.



Tomada de (62)



### 1.15.3 HABITAT.

La caléndula es originaria de la región mediterránea y se encuentra ampliamente distribuida en todo el mundo como planta ornamental. Por lo general es cultivada en zonas de clima templado, hay escasos ejemplares silvestres y toleran todo tipo de suelos. <sup>(2, 37)</sup>

### 1.15.4 PARTE UTILIZADA.

La droga vegetal está constituida por las inflorescencias o capítulos enteros. También se utilizan los flósculos aislados y en mucho menor medida se emplean las hojas. <sup>(2)</sup>

### 1.15.5 COMPOSICION QUIMICA.

Las flores de Caléndula presentan un amplio espectro de tipos de compuestos químicos, lo cual está en concordancia con la diversidad de acciones farmacológicas que presenta la planta.

**Saponósidos:** Derivados del ácido oleánico, calendulósidos A, B, C, D, F, G y H.

**Carotenoides:** Calendulina,  $\beta$ -caroteno, licopeno, neolicocina, rubixantina, violaxantina, citroxantina, crisantemoxantina, flavoxantina, auroxantina, luteína.

**Flavonoides:** Constituidos principalmente por derivados del quercetol (quercetin-3-O-glucósido) y del isorramnetol.

**Alcoholes triterpénicos pentacíclicos:** Arnidiol, faradiol,  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina, ácido faradiol-3-mirístico, lupol, taraxasterol, ácido faradiol-3-palmitico, calenduladiol.

**Polisacáridos:** Ramno-arabino-galactano y dos arabinogalactanos.



**Otros:** Acido málico, mucílago, resina, goma, taninos, poliacetilenos, esteroides. (2, 30)

#### 1.15.6 ACCIONES FARMACOLOGICAS.

**Anti-inflamatoria:** Debido a la inhibición de la lipooxigenasa (flavonoides) y a sus antioxidantes y captadores de radicales libres (flavonoides y triterpenos).

**Antiséptica y Cicatrizante:** Al potenciar la epitelización y regeneración de la piel dañada, estimulando la síntesis de glucoproteínas, nucleoproteínas y colágeno durante el periodo de regeneración tisular.

**Acción antibacteriana y antifúngico.**

**Antiespasmódica:** Combate los espasmos, las contracciones o convulsiones.

**Acción emenagogo:** Como regulador del período menstrual y calmante de los dolores propios.

**Emoliente:** Suaviza, tonifica e hidrata la piel, cada vez son más los productos cosméticos que incluyen la Caléndula entre sus componentes.

**Callicida:** Provoca la desaparición de verrugas víricas de la piel, debido a su contenido en ácido acetil-salicílico.

**Colerética:** Estimulante de la actividad hepática, especialmente de la secreción biliar. Tomada en infusión resulta indicada en casos de congestión o insuficiencia hepática.

**Antiulcerosa:** Cicatriza úlceras de estómago y duodeno. También resulta eficaz en gastritis, gastroenteritis y vómitos. (2, 25, 30, 37)



## 1.16 CANCERINA

1.16.1 NOMBRE CIENTIFICO: *Hippocratea excelsa*.

### 1.16.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

La cancerina está constituida por la corteza de la raíz desecada de la especie *Hippocratea excelsa*, la corteza de raíz tiene un color café rojizo o rosáceo con abundantes manchas grisáceas y textura ligeramente fibrosa. <sup>(17)</sup>

Se trata de un bejuco leñoso, delgado, de hasta 17m de altura. Su tallo es de 10cm de diámetro con ramas pecioladas, la corteza es de color café rojizo, sus hojas miden de 6 a 12cm, son oblongo elípticas, pecioladas, redondeadas en el ápice (Figura 13). Sus flores son blancas de sépalos dentados, sus frutos son elípticos y capsulares de unos 6cm. <sup>(29)</sup>

**FIGURA (13):** Bejuco leñoso de *Hippocratea excelsa*.



Tomado de (29)



### 1.16.3 HABITAT.

Esta especie se restringe al bosque de hojas caducas tropical del sur de México y América Central, es muy abundante en la península de Yucatán. <sup>(29)</sup>

### 1.16.4 PARTE UTILIZADA.

Se emplea principalmente la corteza de la raíz, aunque también se ha reportado actividad antiartrítica donde la parte estudiada es toda la planta. <sup>(29)</sup>

### 1.16.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA.

**Compuestos triterpenoides:** Canofilol, canofilal, ácido canofilico, friedelina, celastrol, excelsina, pristimerina, tingenona.

**Alcaloides:** Hipocrateína I y II, emarginatina A, mayteína, hipocrateína III.

**Esteroles:** Principalmente  $\beta$ -sitosterol. <sup>(29)</sup>

### 1.16.6 ACCIONES FARMACOLÓGICAS.

**Anti-inflamatoria:** En ratas con granuloma provocado con algodón.

**Antiartrítico:** Probado en ratas. **Anticancerígeno:** En carcinoma epidérmico humano, carcinoma epidérmico nasofaríngeo.

**Antibacteriana.** <sup>(29)</sup>



## 1.17 EQUINACEA

### 1.17.1 NOMBRE CIENTIFICO: *Echinacea purpúrea*.

### 1.17.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Hierba perenne perteneciente a la familia de las Asteráceas (Compuestas) caracterizada por presentar una altura máxima cercana al medio metro, tallo delgado, vellos y hueco; hojas ásperas, lanceoladas o lineares, enteras, entre 7,5 y 20cm de largo, e inflorescencia solitaria sobre un pedúnculo Terminal conformado por flósculos radiales de 3cm de largo, color malva, blanco o púrpura (Figura 14). Hacen su aparición desde mediados de verano hasta principios de otoño. (2, 17)

**FIGURA (14):** Flor de *Echinacea purpúrea*.



Tomado de (71)



### 1.17.3 HABITAT.

Es originaria del centro y sur de Estados Unidos, crece en lugares secos, praderas y bosques en forma silvestre. Las flores que se cultivan en jardines pueden presentar tonalidad color malva (*E. angustifolia*), púrpura (*E. purpúrea*) y blancas (*E. pallida*).<sup>(2, 21)</sup>

### 1.17.4 PARTE UTILIZADA.

Toda la planta, las raíces fueron consideradas, por un tiempo la parte más activa de la planta, esta se recolectan en otoño, cuando la planta ha dado semillas. La *Echinacea* necesita entre 3 y 4 años de su siembra para que sus raíces sean lo suficientemente grandes como para aprovecharlas medicinalmente. De las partes aéreas también pueden obtenerse principios activos útiles, la droga vegetal presenta olor suave y aromático.<sup>(2)</sup>

### 1.17.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA.

**Alcamidas:** En la raíz fueron identificadas cerca de 20, representadas principalmente por *isobutilamidas* (Figura 15). Estas se pueden localizar también en las partes aéreas.

**Glucósidos del ácido fenilcarbónico:** Entre ellos destaca el equinacósido (0,3 a 1,3%), conformado por glucosa, rhamnosa, ácido cafeico y benzocatequin-etil-alcohol. El *equinacósido* es un éster que deriva del *ácido cafeico*.

**Resina** (1,9%): Conteniendo ácidos grasos (oleico, linolénico, cerotínico y palmítico) y fitoesteroles.

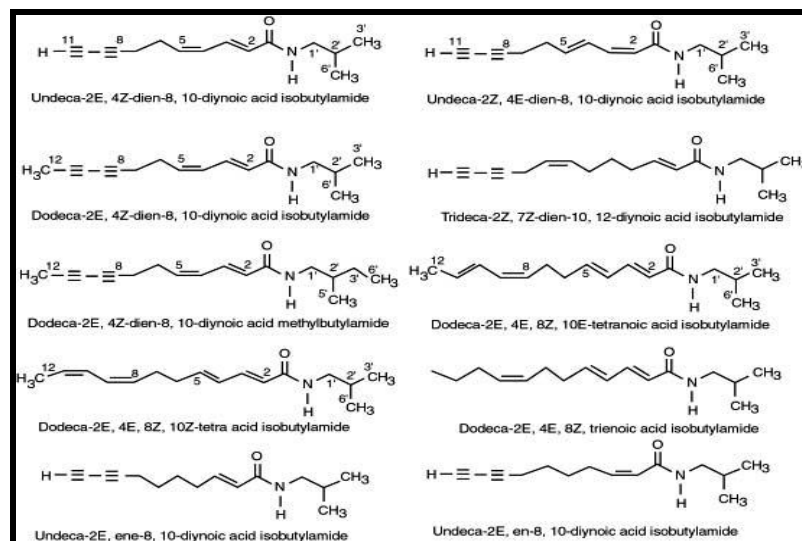


**Aceite esencial (0,05-1,5%):** Contenido en la parte aérea y compuesto por 1,8Zpentadecadieno (44%), 1-pentadeceno, humuleno, burneol, germacreno D, cariofileno, cariofileno epóxido, echinolona, etc.

**Mucopolisacáridos:** Son moléculas de alto peso molecular. Las hay de 45.000 PM (arabinorhamnogalactanos compuestos por arabinosa, xilosa y galactosa) y de 35.000 PM (heteroxilanos compuestos por rhamnosa, arabinosa, xilosa y galactosa).

**Otros:** Trazas de alcaloides pirrolizidínicos (tusilagina e isotusilagina), poliacetilenos, inulina (5-8%), betaína (0,8-1%), sales minerales, azúcares reducidos, flavonoides (rutina), triterpenos (1,9%), equipurósido A, y ácidos orgánicos (derivados del cafeoilético, verbascósido, ácido clorogénico e isoclorogénico).<sup>(2, 16)</sup>

**FIGURA (15):** Isobutilamidas identificadas en la raíz de *Echinacea purpúrea*.



Tomado de (21)



### 1.17.6 ACCIONES FARMACOLOGICAS.

**Inmunomoduladora-immunoestimulante:** los mucopolisacáridos de alto peso molecular situados en la raíz han demostrado poseer un efecto inmunoestimulante inespecífico demostrado a varios niveles; aumento en la producción de leucocitos y linfoquinas, aumento en la tasa de properdina, elevación de la producción de interferón, inhibición de la hialuronidasa y aumento de la capacidad de fagocitosis por parte de los macrófagos.

**Antiinflamatoria.**

**Antiparasitaria.** (2, 16)

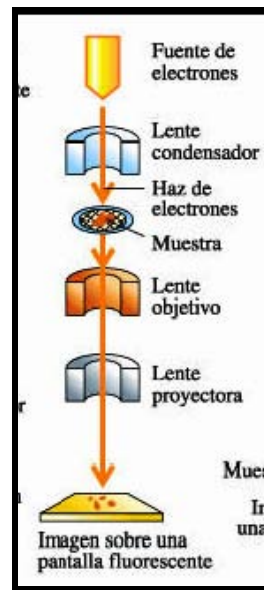
### 1.18 MICROSCOPIO ELECTRONICO.

La microscopía electrónica de transmisión (MET) es una herramienta de gran utilidad en microbiología, tanto para fines de diagnóstico como en la investigación de las relaciones entre los agentes patógenos y el huésped. (70)El microscopio electrónico de transmisión utiliza un haz de electrones para visualizar un objeto, debido a que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor a la de la luz pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas. Una parte de los electrones son transmitidos a través del objeto, formando una imagen aumentada de la muestra, este microscopio puede aumentar el tamaño del objeto hasta un millón de veces. Las partes principales de un microscopio electrónico son:

- Cañón de electrones: emite los electrones por la aplicación de alto voltaje.
- Lentes magnéticas: crean campos magnéticos que dirigen y enfocan el haz de electrones.

- Sistema de vacío: es una parte muy importante debido a que los electrones pueden ser desviados por las moléculas del aire, se debe hacer un vacío casi total en el interior de la columna del microscopio.
- Pantalla fluorescente: es de sulfuro de zinc es para visualizar la imagen aumentada.
- Placa fotográfica: muestra la imagen en el negativo para ser procesada en el cuarto oscuro y así obtener la foto de dicha imagen (Figura 16). <sup>(22, 66)</sup>

**FIGURA (16):** Microscopio electrónico de transmisión.



Tomado de (65)

Los estudios ultra estructurales de los microorganismos, tanto para diagnóstico como para investigación, se abordan utilizando dos de los métodos de procesamiento general para la MET:



- a) la tinción negativa: para la identificación de virus y de diferentes constituyentes bacterianos (como pili y flagelos).
- b) el procesamiento para la obtención de cortes ultra finos, (la localización intracelular de un agente vírico, como los detalles ultra estructurales de cualquier otro patógeno, puede aportar información relevante para su caracterización definitiva. <sup>(22, 70)</sup>





## 1.19. JUSTIFICACIÓN

El ganado vacuno de leche se cría y alimenta para producir grandes cantidades de leche. Con el estrés metabólico por el gran rendimiento, los efectos físicos del ordeño y la manipulación dos o tres veces al día no es extraño que la ubre y el pezón sufran una amplia variedad de enfermedades. La más relevante, la mastitis, tiene importancia económica en todo el mundo y se invierte mucho dinero en su prevención tratamiento y control. <sup>(49)</sup> La lucha contra la mastitis es un esfuerzo a largo plazo que debe ser persistente debido a que es imposible el prevenir completamente la transmisión de bacterias u otros organismos causantes de la enfermedad. En la actualidad se han reportado más de 100 microorganismos como causantes de infección intramamaria. La mayoría de las infecciones, incluidas las de importancia económica, son ocasionadas por especies de estafilococos, estreptococos y bacterias Gram-negativas. Las últimas son esencialmente coliformes. La mastitis continua siendo la enfermedad más prevalente y costosa de los bovinos lecheros en la mayor parte del mundo, ya que las vacas lecheras comparten su ambiente con microorganismos y es inevitable que algunos de ellos entren a la glándula mamaria y causen mastitis. <sup>(6, 49)</sup>

Las pérdidas causadas por mastitis se pueden clasificar como sigue:

1.- En los casos de mastitis clínica:

- Pérdida por baja producción del animal enfermo.
- Perdida de producción, por la duración de la eliminación del medicamento.
- Frecuentemente hay un perjuicio duradero en el rendimiento de la vaca.
- Costos de medicamentos y del Médico veterinario.



- Aumento en los costos de la mano de obra.

2. - En los casos de mastitis subclínica.

- Una considerable reducción en la producción diaria de leche.
- Cambios importantes en la composición de la leche.
- Se perjudica el valor higiénico de la leche.
- Los daños causados a través de la mastitis subclínica son mucho mayores, ya que esa forma de mastitis es unas 20 a 50 veces más frecuente que la mastitis clínica. <sup>(31)</sup>

La mastitis es considerada la enfermedad infecciosa más costosa de las vacas lecheras debido a que induce a una disminución en la producción del 4 al 30% de leche y baja su calidad, además de incrementar los costos del cuidado de la salud del hato y un desecho prematuro de animales. La mastitis bovina es muy persistente en el ganado lechero, usualmente es tratada o prevenida con antibióticos intramamarios; representando una carga económica muy alta a los productores de leche en todo el mundo. Las pérdidas mundiales, anuales debido a la mastitis, se han estimado en 35 billones de dólares americanos. <sup>(6)</sup>

#### PÉRDIDAS ECONÓMICAS OCASIONADAS POR LA MASTITIS BOVINA EN LA INDUSTRIA LECHERA EN MÉXICO.

La producción de leche de vaca en México tiene una tradición de más de 400 años; los españoles trajeron los primeros bovinos lecheros. A principios del siglo pasado se inició la importación de bovinos lecheros (Jersey, Holstein-Friesan) la que se consolidó en los años 40.



Entre los años de 1950 a 1970 se integró la Industria Lechera con la producción de las pasteurizadoras e industrializadoras de productos lácteos (quesos, yogurt, requesón, mantequilla). En México la presencia de la enfermedad arroja pérdidas económicas de aproximadamente \$2'500,000.00 pesos, pero esto representa sólo del 20 al 30% de las mastitis clínicas la otra parte que no presenta síntomas externos perceptibles que son las mastitis subclínicas representan entre el 70% y el 80%. Esta enfermedad es una infección que ocasiona grandes pérdidas a la ganadería productora de leche del país y afecta fundamentalmente al ganado bovino explotado en forma intensiva, tanto al que es ordeñado en forma manual así como el que es ordeñado en forma mecánica, esto es debido a las deficientes condiciones de manejo e higiene que se tiene establecida en la gran mayoría de las explotaciones lecheras. La mastitis en México es una enfermedad muy costosa para la industria, el promedio por vaca es de \$1,700.00 a \$2,000.00 anuales. En estudios realizados en hatos ubicados en el altiplano de México la prevalencia de mastitis subclínica ha sido calculada del 20.80% en Tizayuca, Hidalgo, y de un 81.10% en establos alrededor del Distrito Federal. Económicamente es de vital importancia para México y Michoacán que los ganaderos prevengan, manejen y controlen la mastitis bovina por los efectos negativos que en la producción de leche tienen; situación que se relaciona directamente con el hecho de que México en el 2001 ocupaba el 13o lugar a nivel mundial como productor de leche fluida con 9,500.7 millones de litros, mientras que Michoacán produjo 301 millones de litros de leche en el mismo año, colocándolo en el 9o lugar a nivel nacional. Actualmente, se puede apreciar que existe un incremento en la demanda de leche y la producción nacional sigue siendo insuficiente para cubrir la demanda total del lácteo, por lo que



se ha recurrido a las importaciones para complementar el abasto nacional. <sup>(6)</sup>

Además de los altos costos financieros, la mastitis tiene una gran importancia en el valor higiénico de la leche y de sus subproductos. No se debe de perder de vista el cuidado y preservación de la Salud Pública al consumirse leche y sus derivados; los cuales se debe de garantizar que sean de buena calidad, no contaminados y que provengan de hatos ganaderos libres de mastitis bovina u otras enfermedades infecciosas, cuyos agentes patógenos pueden afectar al humano, así mismo se debe evitar residuos de antibióticos o químicos en la leche por el tratamiento de la ubre. <sup>(6, 56)</sup>

A pesar de que la mayoría de los organismos que causan mastitis, en bajos números son relativamente inofensivos para el ser humano, o son habitantes normales del medio ambiente humano hay agentes patógenos causantes de enfermedades por el consumo de leche. Bacterias como *Staphylococcus aureus* que a nivel mundial es el agente patógeno más importante asociado con la glándula mamaria que causa la mastitis; el hombre puede infectarse mediante el consumo de leche que contiene *Staphylococcus aureus*, la cual ocasiona una intoxicación alimenticia debido a las enterotoxinas estables al calor y el síndrome de choque tóxico debido a la toxina TSS-1. La dosis infectiva es elevada se necesitan de  $10^6$  a  $10^7$  bacterias/ml para una producción efectiva de enterotoxinas, hasta el 20% de este agente causal puede producir enterotoxinas. <sup>(6, 38, 56)</sup>

Los antibióticos son una de las principales herramientas terapéuticas en el control y tratamiento de la mastitis así como de otras enfermedades infecciosas de origen bacteriano. Sin embargo con el transcurrir de los años, estos fármacos han inducido la aparición de



microorganismos patógenos resistentes. Además la resistencia microbiana en Medicina Veterinaria adquiere más relevancia si se considera que existen antecedentes epidemiológicos y clínicos que indican que las bacterias resistentes patógenas y no patógenas de procedencia animal, como también zoonóticas pueden llegar a la población humana por varias vías y que la presencia de residuos antimicrobianos en huevo, leche y eventualmente la carne pueden inducir a la aparición de resistencia en la flora de tracto gastrointestinal del hombre. Cualquier medicamento que se administra en un organismo animal, se elimina por diversas vías y durante algún tiempo; en el caso particular del ganado lechero, una de las vías principales de eliminación es la leche por lo tanto se debe tener presente que cuando se realizan terapia con antimicrobianos, se debe respetar los tiempos de eliminación, también llamados tiempos de descarte, los que pueden durar horas, días o semanas después de finalizada la terapia. <sup>(68)</sup> Debido a que el tratamiento con antibacterianos no resulta totalmente satisfactorio en todas las vacas con mastitis, con el incremento de la preocupación pública en todo lo relacionado, con la salubridad de los alimentos y reducir la incidencia de residuos en la leche, se han puesto en marcha efectivos programas alternativos como el tratamiento herbolario; el interés en el estudio de plantas medicinales como fuente de compuestos farmacológicos activos ha aumentado por todo el mundo. Se reconoce que en algunos países en vías de desarrollo, las plantas son la fuente medicinal principal para tratar enfermedades infecciosas. Sin embargo poco se sabe sobre la actividad antibacteriana y los efectos farmacológicos de estas plantas. Por lo tanto hay una necesidad de estudiar las características de la flora medicinal para validar su uso en la Medicina Tradicional y que esto permita a la industria farmacéutica el desarrollo de nuevos productos más efectivos así como nuevas



formas de administración y establecer un régimen apropiado de dosificación que permitan avanzar en la lucha contra la mastitis y otras enfermedades humanas y veterinarias. <sup>(1, 52)</sup> Otra forma posible de prevenir la mastitis podría incluir un tratamiento que no solo elimine a la bacteria causante, si no que optimice la capacidad protectora de la glándula mamaria ya que el papel del sistema de defensa del organismo del hospedero es el de eliminar las bacterias patógenas restantes y prevenir de esta manera la reinfección, plantas como *Caléndula officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpúrea* hoy representan una nueva alternativa para el desarrollo de fármacos antimastíticos más efectivos debido a sus múltiples acciones farmacológicas. <sup>(52)</sup>

## 1.20 HIPOTESIS

"Si los extractos vegetales de: *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* presentan una actividad antibacterial "in vitro" contra las bacterias a estudiar (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis*) entonces podemos proporcionar una alternativa confiable y eficaz para el tratamiento de la mastitis bovina"



## 2. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto inhibitorio del extracto de: *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, (solos y combinados) en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina utilizando el método de Mosmann y la microscopía electrónica.



## 2.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Preparar tres extractos de plantas (*Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*) a base de etanol al 70%.
  
- Determinar la actividad antibacterial de los extractos de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* (solos), por el método colorimétrico de Mosmann.
  
- Determinar la actividad antibacterial de los extractos de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* (combinados), por el método colorimétrico de Mosmann.
  
- Determinar la actividad bactericida y/o bacteriostática de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* (solos y combinados) en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis*, mediante una prueba cualitativa.
  
- Realizar observaciones en microscopio electrónico de las bacterias antes mencionadas en presencia y ausencia de los extractos para evidenciar el posible daño.





### 3. MATERIAL Y METODOS.

#### 3.1 OBTENCION DE MUESTRAS DE LECHE DE VACAS CON MASTITIS

El presente trabajo se realizó en el Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca Hidalgo, México, localizado en el kilómetro 57 de la carretera Federal No. 85, México-Pachuca. El estudio incluyó vacas, de la raza Holstein Friesian, que, tuvieron diagnóstico de mastitis de 5 hatos lecheros.

- PREPARACION DE LOS PEZONES

Antes de tomar las muestras los pezones deben de ser desinfectados. El lavado de los pezones se hace solamente si existe suciedad. En este caso se utilizara una solución desinfectante de cloro con 20 ppm o con yodo a concentración de 60 ppm. Enseguida se secura el pezón con una toalla desechable. Se desechan de 10 a 15 ml de leche de cada cuarto. Enseguida se limpia la punta del pezón y su orificio durante 10 a 15 segundos con una toalla desechable sumergida en alcohol, con esto ocurre la desinfección. Se utiliza una toalla para cada pezón.

- TOMA DE LA MUESTRA

Las manos deberán desinfectarse antes de tocar la ubre. El recipiente estéril debe colocarse de forma horizontal y debe evitarse la entrada de suciedad. La toma de muestra se hace con una presión mínima y



de ser posible con una sola presión del pezón. El envase de muestra debe ser llenado con dos tercios como máximo. <sup>(56)</sup>

- CONSERVACION Y MANEJO DE LAS MUESTRAS

Los recipientes con muestras fueron transportados en un contenedor adecuado hacia el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Izcalli Estado de México en el Edificio de Estudios de Postgrado e Investigación. Cuando hace mucho calor o existe retraso en el transporte las muestras deben ser colocadas en una hielera con agua y hielo.

El procesamiento deberá ser hecho inmediatamente después de su llegada al laboratorio. La temperatura de traslado será de 4 a 5°C. Deberá evitarse un almacenamiento de la muestra mayor de 24 horas. <sup>(56)</sup>

### 3.2 AISLAMIENTO DE PATOGENOS BACTERIANOS

Para lograr el aislamiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas se utilizaron los medios de agar sangre (AS) y agar Mac Conkey (AMC). Las muestras de leche fueron inoculadas mediante la técnica de siembra masiva con asa estéril, posteriormente los medios de cultivo se incubaron a 35 - 37°C, en condiciones aeróbicas, durante 24 – 48 horas. <sup>(56)</sup>



### 3.3 IDENTIFICACION DE GRUPOS ESPECIFICOS DE AGENTES PATOGENOS DE MASTITIS.

#### 3.3.1 *Staphylococcus aureus*.

- Produce en agar sangre colonias blanco-grisáceas y ocasionalmente doradas o amarillas, lisas, opacas y convexas.
- La  $\alpha$ -hemolisina produce una zona clara con una hemólisis completa, mientras que la  $\beta$ -hemolisina causa una zona clara delimitada con una hemólisis incompleta. Algunas cepas de *Staphylococcus aureus* no son hemolíticas o producen una zona muy estrecha de hemólisis completa, limitada.
- Debido a que fermenta el manitol se puede utilizar agar sales manitol para aislarlo de forma pura.
- Se realizaron diferentes pruebas para su identificación (Tabla 11). (7, 28, 55)

TABLA (11): Pruebas de identificación de *Staphylococcus aureus*.

Característica	Resultado
Tinción de Gram	+
Morfología	Cocos en racimos
Motilidad	-
Catalasa	+
OF	F
Oxidasa	-
Coagulasa	+
Fermentación de manitol	+
Fermentación de glucosa	+

Tomado de (55)



### 3.3.2 *Streptococcus uberis*.

- Crece satisfactoriamente en agar sangre donde forman colonias pequeñas, brillantes suaves.
- Algunos pueden presentar actividad hemolítica.
- Se realizaron diversas pruebas para su identificación (Tabla 12). (55, 56)

TABLA (12): Pruebas de identificación de *Streptococcus uberis*.

Característica	Resultado
Tinción de Gram	+
Morfología	Cocos en pares o cadenas
Motilidad	-
Catalasa	-
OF	F
Oxidasa	-
Hidrólisis de esculina	+
Inulina	+
Crecimiento a 10 °C	-

Tomado de (13)

### 3.3.3 *Enterococcus faecalis*.

- En agar sangre las colonias son pequeñas y brillantes.
- Presentan una reacción  $\beta$ -hemolítica.
- Se realizaron diversas pruebas para su identificación (Tabla 13). (28, 52, 55)

TABLA (13): Pruebas de identificación de *Enterococcus faecalis*.

Característica	Resultado
Tinción de Gram	+
Morfología	Cocos en parejas o cadenas cortas
Motilidad	-
Catalasa	-
OF	F
Oxidasa	-
Bilis esculina	+
NaCl 6.5%	+
Manitol	+
Lactosa	+
Desarrollo a 10°C	+
Desarrollo a 45°C	+

Tomado de (7)

#### 3.3.4 *Escherichia coli*.

- En agar sangre las colonias son grandes, convexas y mucoides.
- Debido a que utiliza la lactosa por vía fermentativa se puede emplear el medio EMB donde forma colonias verdes con brillo metálico.
- Son bacilos gram negativos.
- Se realizaron diferentes pruebas de identificación (Tabla 14). (7, 28, 55)

TABLA (14): Pruebas de identificación de *Escherichia coli*.

Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
Catalasa	+	Arginina dihidrolasa	+/-
Oxidasa	-	Fenilalanina desaminasa	-
Motilidad	+	Lisina descarboxilasa	+
OF	F	Acido de la glucosa	+
Indol	+	Hidrólisis de gelatina	-
Rojo de metilo	+	Hidrólisis de urea	-
Voges Proskauer	-	Malonatos	+
Citratos	-	Fermentación de manitol	+
Reducción de nitratos	+	Producción de gas	+

Tomado de (28)

### 3.4 PREPARACION DE SOLUCIÓN STOCK DE TRABAJO DE *Caléndula officinalis* (Diagrama 1).

- 1.- Preparar 1 litro de etanol al 75% en un frasco ámbar de boca ancha, colocar en el pétalos de *Caléndula officinalis* secos, mantener cerrado y en reposo el frasco durante 24 horas protegido de la luz, se mantiene a temperatura ambiente.
- 2.- Después de reposar 24 horas se retiran los pétalos de *Caléndula officinalis* y se desechan, el extracto etanólico obtenido se esteriliza por filtración empleando una membrana Millipore de 0.22µm, un filtro de bala y una bomba de vacío.
- 3.- El extracto de *Caléndula officinalis* ya estéril se coloca en el horno a 56°C para llevar a sequedad, manteniendo condiciones de esterilidad se recolecta la materia seca y se coloca en frascos ámbar estériles para su conservación.



4.- Pesar en una balanza analítica 1g de la materia seca y colocarla en un matraz aforado de 25ml, agregar 3ml de DMSO y agitar con un vortex para ayudar a disolver. Aforar a 25ml con Solución salina fisiológica estéril y esta es la solución de trabajo la cual presenta una concentración de 40mg/ml.

5.- A la solución de trabajo se le realiza una prueba de esterilidad en caso de presentar un agente contaminante se procede a esterilizar por filtración. La solución estéril se coloca y conserva en un frasco ámbar protegida de la luz y se mantiene a temperatura de refrigeración.

### **3.5 PREPARACION DE LA SOLUCION STOCK DE TRABAJO DE *Echinacea purpúrea* (Diagrama 1).**

1.- Se realiza el procedimiento mencionado anteriormente, ahora empleando *Echinacea purpúrea*.

### **3.6 PREPARACION DE LA SOLUCION STOCK DE TRABAJO DE *Hippocratea excelsa* (Diagrama1).**

1.- Se realiza el procedimiento mencionado para *Caléndula officinalis* pero ahora utilizando materia seca de *Hippocratea excelsa*.

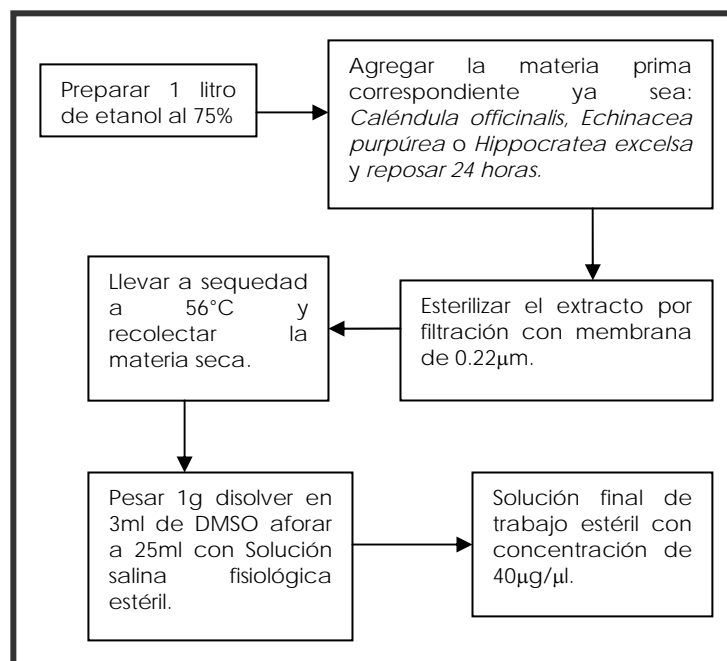


### 3.7 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE LAS SOLUCIONES STOCK DE TRABAJO.

$$\frac{1g}{25ml} = 0.04 \frac{g}{ml} \left( \frac{1000mg}{1g} \right) \left( \frac{1000\mu g}{1mg} \right) \left( \frac{1ml}{1000\mu l} \right) = 40 \frac{\mu g}{\mu l}$$

$$40 \frac{\mu g}{\mu l} = \left( \frac{1000\mu l}{1ml} \right) \left( \frac{1mg}{1000\mu g} \right) = 40 \frac{mg}{ml}$$

**DIAGRAMA (1):** Preparación de los extractos etanólicos y las soluciones de trabajo.







### 3.8 PRUEBA DE ESTERILIDAD PARA LAS TRES SOLUCIONES STOCK DE TRABAJO.

- Con una micropipeta con punta estéril tomar 100 l de la solución stock de *Caléndula officinalis* y colocarlos en una placa de agar BHI realizar con el asa bacteriológica un sembrado masivo. Incubar durante 24 horas a 35-36°C y observar si se presenta crecimiento.
- Realizar este procedimiento con las soluciones de *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpúrea*.
- Si alguno de las soluciones de trabajo presenta crecimiento microbiano se debe de esterilizar nuevamente por filtración con membrana millipore de 0.22µm mejorando las condiciones de trabajo.

### 3.9 PREPARACION DEL ENSAYO EN MICROPLACA CON EL EXTRACTO DE *Echinacea purpúrea*

#### 3.9.1 PREPARACION DE MATERIAL

- Sembrar las bacterias a utilizar en el ensayo en una placa de agar nutritivo como Infusión cerebro corazón (BHI) incubar en estufa bacteriológica a 36-37°C durante 24 horas.
- Preparar 100ml de Caldo Infusión cerebro corazón (BHI) distribuir en 12 tubos de ensaye con tapón de rosca aproximadamente 8ml en cada tubo. Esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión, 121°C durante 15 minutos.
- Preparar 60ml de Solución Salina al 8.5% y distribuir en 12 tubos de ensaye con tapón de rosca aproximadamente 5ml



en cada tubo. Esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión, 121°C durante 15 minutos.

- Esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión, 121°C durante 15 minutos material como puntas para micropipeta de 100µl. NOTA: Cuando se realiza el ensayo para una combinación de extractos esterilizar pipetas de 2 y 5ml, tubos de ensayo con tapón de rosca o frascos ámbar de 10ml.
- Se requiere tener una microplaca de 96 pozos estéril, micropipeta de 100µl, tubo 0.5 Mc Farland, agitador vortex, asa bacteriológica.
- Mantener condiciones de esterilidad con 2 mecheros fischer, superficie desinfectada con benzal, utilizar guantes estériles y cubrebocas.

### 3.9.2 ENSAYO EN MICROPLACA (Diagrama 2).

- La microplaca cuenta con 96 pozos con columnas del 1 al 9 donde cada columna corresponde a una dilución realizada y las filas de la A a la H, corresponden a una bacteria diferente.
- Colocar en los pozos de la columna 2 a la 9 en las 8 filas 100µl de SSF Estéril, con la micropipeta y puntas estériles, utilizando para cada fila un tubo diferente.
- Colocar en los pozos de la columna 1 y 2 en las 8 filas 100µl del extracto (solo o combinado) a probar.
- A partir de los pozos de la columna 2 y hasta la 9 realizar diluciones dobles del extracto obteniendo un volumen final de 100µl por pozo. NOTA: Los 100µl restantes en el pozo 9 se desechan.
- Tomar la placa de agar con la bacteria a probar #1 (*Escherichia coli*) con crecimiento de 24 horas inocular un



tubo con caldo BHI estéril y estandarizar a 0.5 con el nefelómetro de Mc Farland, mezclar bien con un agitador vortex.

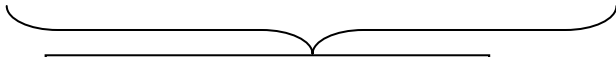
- Agregar a los pozos de la columna 1 a la 9 de la fila A 100µl de la bacteria #1 estandarizada a 0.5 de Mc Farland.
- Realizar los dos pasos anteriores para cada una de las bacterias a probar, una bacteria por fila.
- La columna de pozos numero 10 corresponde a un Control Positivo el cual contiene 100µl de SSF Estéril y 100µl de la bacteria a probar correspondiente a cada fila.
- La columna de pozos numero 11 corresponde a un Control Negativo el cual contiene 100µl de SSF Estéril y 100µl de Caldo BHI estéril.
- La columna de pozos numero 12 corresponde a un Blanco el cual contiene 100µl del extracto estéril a probar y 100µl de Caldo BHI estéril.
- Ya preparada la microplaca se coloca en un recipiente de plástico desinfectado con benzal con papel filtro humedecido con agua estéril, para prevenir desecación y se deja incubar en una estufa bacteriológica a una temperatura de 36-37 °C durante 24 horas.

**DIAGRAMA (2):** Preparación del ensayo de dilución en microplaca.

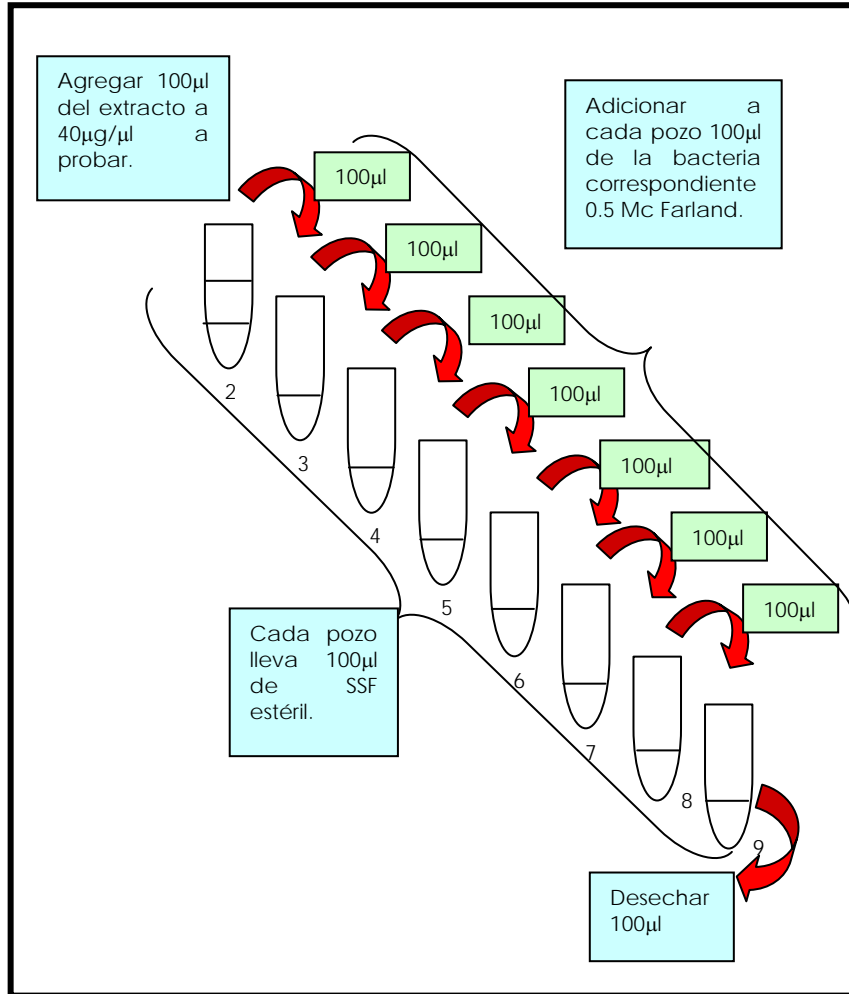
La siguiente tabla representa una microplaca la cual cuenta con 96 pozos con columnas del 1 al 9 donde cada columna corresponde a una dilución realizada y las filas de la A a la H, corresponden a una bacteria diferente. La columna 10 y 11 corresponden a un control positivo y uno negativo respectivamente y la columna 12 al blanco.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 Control +	11 Control -	12 Blanco
A	100µl extracto + 100µl de la bacteria a probar 0.5 Mc Farland									100µl SSF + 100µl de la bacteria a probar 0.5 Mc Farland	100µl SSF + 100µl de Caldo BHI	100µl extracto + 100µl de Caldo BHI
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												



Preparar diluciones como lo muestra el siguiente esquema.



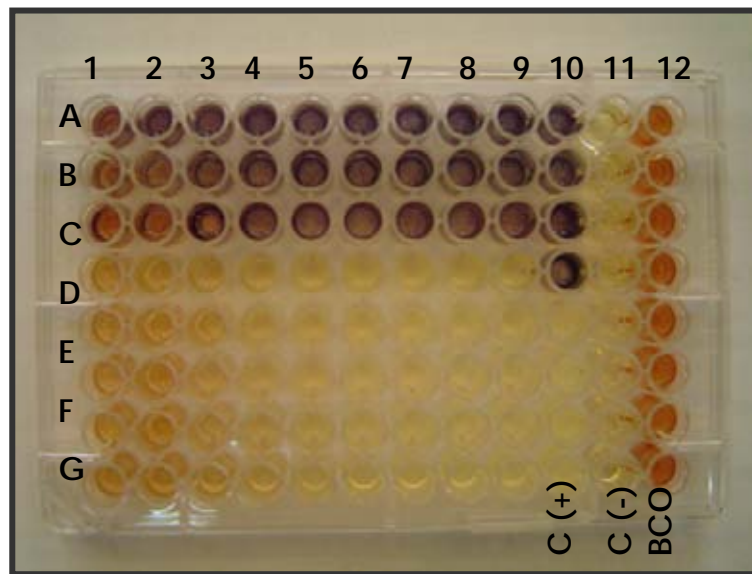


### 3.9.3 LECTURA DEL ENSAYO EN MICROPLACA E INTERPRETACION DE RESULTADOS.

- Después de 24 horas de incubación se observa la microplaca se realizan lecturas visuales.
- Se debe de observar total transparencia y ausencia de turbidez en las columnas de pozos que son Control Negativos y Blancos, mientras que en la columna que corresponde al Control Positivo debe de presentar turbidez abundante.
- Se comparan los pozos problema con los controles y el blanco y se determina si presentan turbidez o no. Si existe la presencia de turbidez y entre mas se asemejen al Control Positivo indican un crecimiento de la bacteria por lo cual el crecimiento de esta no se inhibe por el extracto que se esta probando. Los pozos que no presentan turbidez y entre más se asemejan al Control Negativo indican que no existe un crecimiento de la bacteria por lo cual el extracto si presenta un efecto inhibitorio del crecimiento del microorganismo.
- En esta prueba se puede realizar una lectura colorimétrica para lo cual se adiciona a todos los pozos de la microplaca 0.5µl de reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT) el cual presenta un color amarillo; si no hay presencia de bacterias viables en el pozo el MTT permanecerá de color amarillo, mientras que si hay bacterias viables el MTT va a virar a color violeta/morado (Figura 17). Esta técnica permite observar y determinar fácilmente que pozos de la microplaca presentan crecimiento y en que pozos este se ha inhibido por acción del extracto lo que permite determinar la CMI.



**FIGURA (17):** Microplaca con diluciones de extracto a evaluar evidenciando actividad bacteriana con el reactivo MTT.



### 3.9.4 DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).

La Concentración mínima inhibitoria (CMI) se determina en la lectura de resultados de la microplaca y se considera que es la mínima concentración del extracto que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de la cepa bacteriana, así como su viabilidad esto se evidencia por turbidez o colorimetría empleando el reactivo de MTT (Figura 18). Color morado púrpura indica desarrollo bacteriano y el color amarillo indica que no hay células bacterianas viables.



**FIGURA (18):** Método de Mosmann adicionando reactivo de MTT a cada pozo de la técnica de dilución en microplaca.



**3.10 DETERMINACION DEL EFECTO BACTERIOSTATICO/BACTERICIDA DE LOS TRES EXTRACTOS: *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, SOLOS Y COMBINADOS.**

**3.10.1 PREPARACION DE MATERIAL.**

- Preparar 80 cajas petri con agar BHI.
- Sembrar las 10 bacterias que se están utilizando; una bacteria por caja por dilución de colonias, incubar a 36-37°C en estufa bacteriológica. durante 24 horas.
- Esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión, 121°C durante 15 minutos, el siguiente material: 70 tubos de ensayo con tapón de rosca de 13x100, 20 pipetas graduadas de 1ml, 2ml, 5ml y 10ml.
- Preparar caldo BHI y distribuir en 10 tubos de ensayo con tapón de rosca aproximadamente 5ml por tubo, esterilizar en autoclave.





### 3.10.2 DETERMINACION DEL EFECTO BACTERICIDA BACTERIOSTATICO (Diagrama 3).

- Estandarizar cada una de las 10 bacterias a 0.5 Mc Farland en los tubos con caldo BHI.
- Colocar 1ml del extracto de *Caléndula officinalis* en 10 tubos de ensayo. Adicionar a cada tubo 1ml de cada una de las 10 bacterias; un tubo por bacteria. Realizar este mismo procedimiento para los extractos de *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*.
- Colocar 1ml de la mezcla de *Caléndula officinalis* y *Echinacea purpúrea* en 10 tubos de ensayo. Adicionar a cada tubo 1ml de cada una de las 10 bacterias; un tubo por bacteria. Realizar este procedimiento para cada una de las combinaciones restantes: *Echinacea purpúrea*-*Hippocratea excelsa*, *Caléndula officinalis*- *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpúrea* - *Hippocratea excelsa* - *Caléndula officinalis*.
- En 10 tubos de ensayo mantener 1ml de cada bacteria en caldo BHI a 0.5 Mc Farland como controles positivos.
- Los controles negativos son cada uno de los extractos solos y combinados con caldo BHI estéril.
- Incubar todos los tubos anteriores durante 24 horas a 36-37°C en estufa bacteriológica.
- Terminada la incubación sembrar en cada placa de agar BHI; dividir la caja en tres secciones, sembrar el control positivo el negativo y el problema. Esto se realiza para cada uno de los 70 tubos preparados 24 horas anteriormente.
- Incubar las placas de agar BHI durante 24 horas a 36-37°C en estufa bacteriológica.

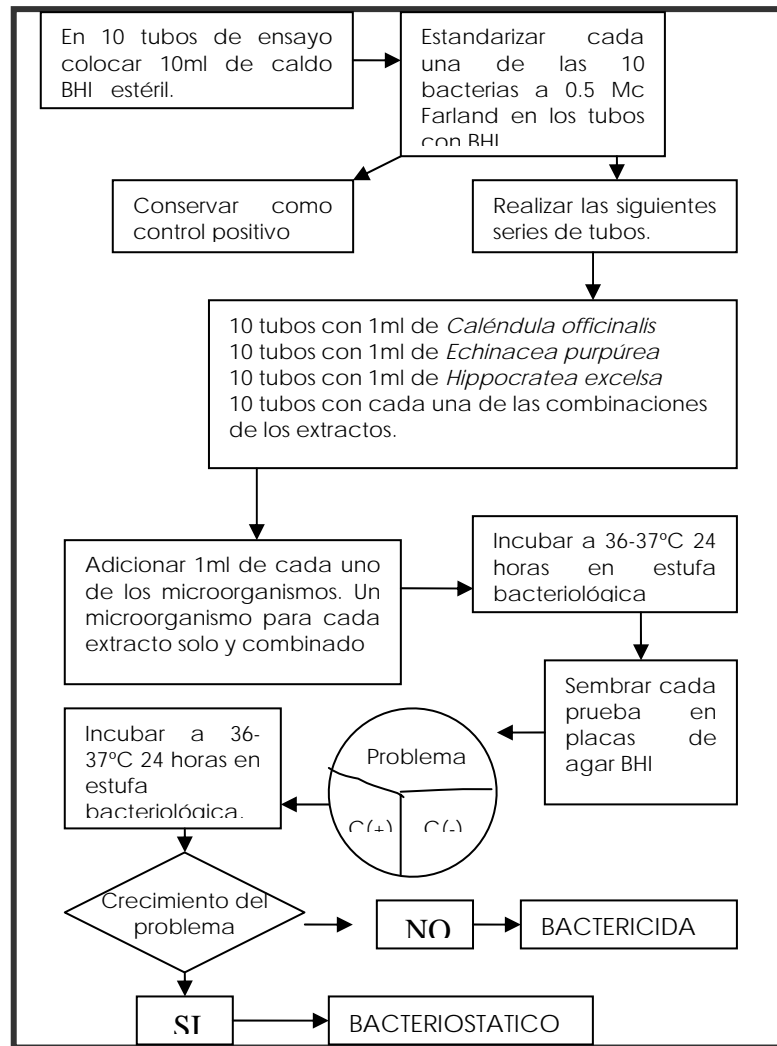


### **3.10.3 INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS PARA DETERMINAR EFECTO BACTERICIDA BACTERIOSTATICO (Diagrama 3).**

- Observar cada una de las placas verificar que los controles negativos no presenten crecimiento.
- Verificar que los controles positivos presenten un crecimiento óptimo.
- Si existe crecimiento en donde se sembró la muestra problema se determina que el efecto es bacteriostático.
- Si no existe crecimiento en donde se sembró la muestra problema se determina que el efecto es bactericida.



**DIAGRAMA (3):** Determinación del efecto bactericida y/o bacteriostático de cada uno de los extractos solos y combinados.





### 3.11 MICROSCOPIA ELECTRONICA.

#### 3.11.1 PREPARACION DE MATERIAL

- Sembrar en cajas de agar BHI las bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis*. Incubar en estufa bacteriológica durante 24 horas a 36°C.
- Preparar 40ml de caldo BHI distribuir en 4 tubos de ensayo con tapón de rosca; 10ml por tubo esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión, 121°C durante 15 minutos.
- Preparar 100ml de Solución Salina Fisiológica al 8.5%, esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión, 121°C durante 15 minutos.
- Esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión, 121°C durante 15 minutos, 8 tubos de ensaye con tapón de rosca de 13x100 y 20 pipetas graduadas de 5ml.

#### 3.11.2 PREPARACION DE LAS BACTERIAS PARA MICROSCOPIA ELECTRONICA (Diagrama 4).

- Estandarizar cada una de las cuatro bacterias con crecimiento de 24 horas en tubos con caldo BHI estéril a 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland.
- En tubos de ensayo estériles con tapón de rosca colocar:
  - 3ml de extracto de *Hippocratea excelsa* + 3ml de bacteria 0.5 Mc Farland *Escherichia coli*.
  - 3ml de extracto de *Echinacea purpúrea* + 3ml de bacteria 0.5 Mc Farland *Staphylococcus aureus*.



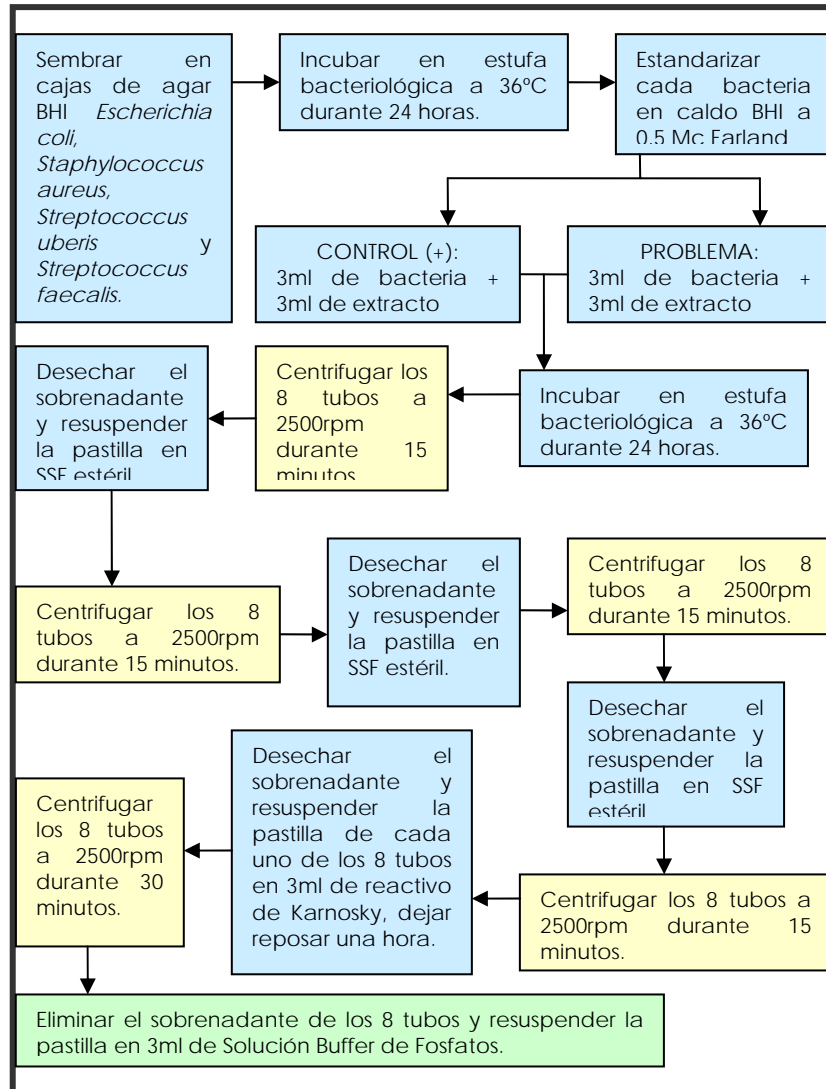
- 3ml de extracto de *Caléndula officinalis* + 3ml de bacteria 0.5 Mc Farland *Streptococcus uberis*.

- 3ml de la mezcla de extracto de *Caléndula officinalis*- *Hippocratea excelsa* + 3ml de bacteria 0.5 Mc Farland *Streptococcus faecalis*.

- Los controles positivos son en un tubo de ensayo estéril con tapón de rosca colocar 3ml de la bacteria en caldo BHI estandarizada a 0.5 del nefelómetro de Mc Farland y adicionar 3ml de SSF estéril. Esto para cada uno de los cuatro microorganismos utilizados en esta prueba.
- Todos los tubos preparados anteriormente se incuban durante 24 horas en estufa bacteriológica a 36°C.
- Después del tiempo de incubación centrifugar los 8 tubos a 2500rpm durante 15 minutos, desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 3ml de SSF estéril.
- Centrifugar a 2500rpm durante 15 minutos, desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 3ml de SSF estéril.
- Centrifugar a 2500rpm durante 15 minutos, desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 3ml de SSF estéril.
- Centrifugar a 2500rpm durante 15 minutos, desechar el sobrenadante y agregar a cada tubo 3ml del reactivo de Karnosky y dejar reposar durante una hora.
- Centrifugar a 2500rpm durante 30 minutos, posteriormente eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 3ml de Solución Buffer de Fosfatos.



DIAGRAMA (4): Proceso de preparación de bacterias para observar en microscopio electrónico.





### 3.11.3 PREPARACION DE REJILLAS CON MEMBRANA FOMVAR.

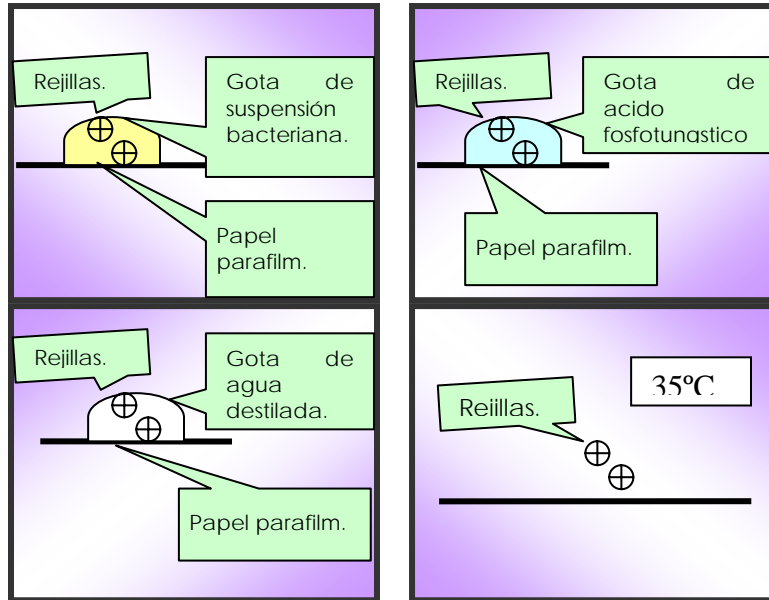
- Las rejillas deben ser lavadas con acetona y estar secas previamente.
- Se prepara una solución de fomvar al 0.1% en cloroformo, si se hacen con parlodión se prepara una solución con 0.1% de parlodión en acetato de amilo.
- Un vaso de precipitados bien limpio de capacidad mínima de un litro se llena de agua destilada, y se coloca una lámpara para que ilumine la superficie del agua.
- Un portaobjetos se impregna de fomvar y se deja en reposo hasta que se seque la película, después con ayuda de unas pinzas se cortan las cuatro orillas del portaobjetos y sobre el agua destilada se sumerge poco a poco hasta separar la película plástica y si la película plástica es de un color dorado-plateado es adecuada.
- Las rejillas son colocadas sobre la membrana y posteriormente se recogen con papel filtro. Las rejillas se deben secar perfectamente antes de volverse a usar.

### 3.11.4 TECNICA DE TINCION NEGATIVA (Figura 19).

- Una gota de suspensión bacteriana se deposita sobre un papel parafilm, y se colocan dos rejillas con membrana para que se adsorba la muestra durante un tiempo que varía entre 5 y 30 minutos.
- Se toman las rejillas y el exceso se absorbe con papel filtro y en seguida son teñidos con una gota de ácido fosfotúngstico (AFT solución al 1% con pH=7.2) durante un periodo que varía entre 5 y 30 minutos.

- Las rejillas son recogidas y se absorbe el exceso de colorante y son secadas a temperatura ambiente o en estufa a 35°C.
- Las muestras son observadas y fotografiadas en el microscopio electrónico de transmisión (JEOL JEM 100 S).

**FIGURA (19):** Esquema que muestra la técnica de tinción negativa.

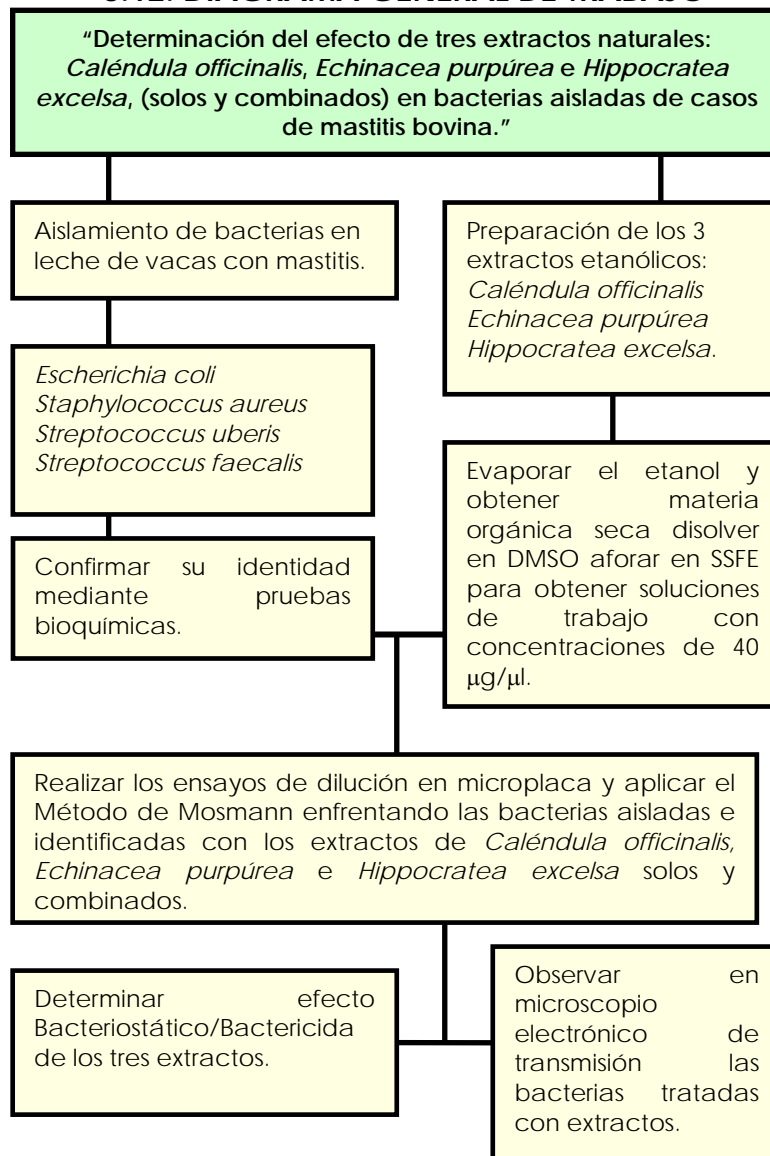


Tomado de (22)





### 3.12. DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO





## 4. RESULTADOS

### 4.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

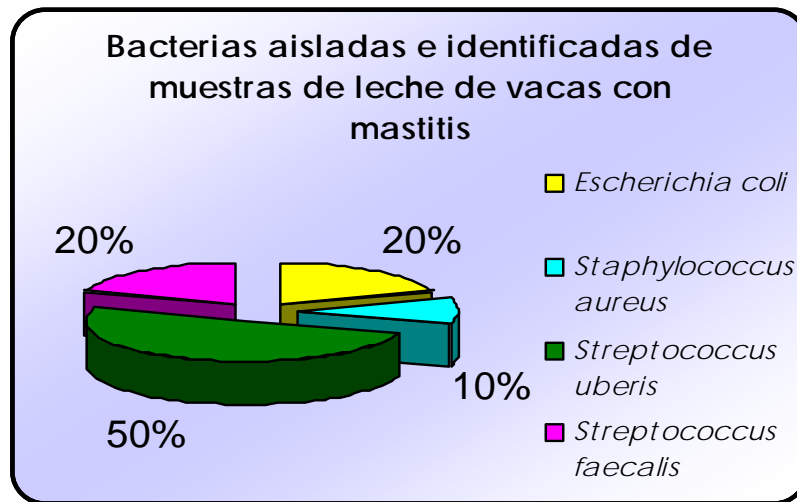
En el aislamiento e identificación de las bacterias se obtuvieron 10 cepas a las cuales se les realizaron pruebas bioquímicas primarias y secundarias que permitieron su identificación dando como resultado: 2 cepas de *Escherichia coli*, 1 cepa de *Staphylococcus aureus*, 5 cepas de *Streptococcus uberis* y 2 cepas de *Streptococcus faecalis* (Tabla 15 y Gráfica 1). Durante toda la experimentación se trabajó con las 10 diferentes cepas al final del trabajo experimental se observó que las bacterias del mismo género y especie presentaron el mismo comportamiento frente a los extractos, por lo cual los resultados se reportan por bacteria.

**TABLA (15):** Tabla que muestra las bacterias aisladas e identificadas de las muestras de leche provenientes de casos de mastitis bovina.

BACTERIA IDENTIFICADA	NO. DE CEPAS AISLADAS
<i>Escherichia coli</i>	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<i>Streptococcus uberis</i>	5
<i>Streptococcus faecalis</i>	2



**GRAFICA (1):** Porcentaje de aislamiento de bacterias aisladas de casos de mastitis bovina.



Se trabajó con las 10 bacterias aisladas e identificadas de acuerdo a su genero y especie presentaron el mismo comportamiento frente a los extractos, cada ensayo se realizó por triplicado, se obtuvieron promedios de cada lectura, de los controles positivos y negativos para obtener un resultado representativo para cada una de las 4 diferentes bacterias.



## 4.2 EVALUACION DEL EFECTO INHIBITORIO DE LOS EXTRACTOS SOLOS Y COMBINADOS SOBRE LAS BACTERIAS AISLADAS DE CASOS DE MASTITIS BOVINA.

### 4.2.1 EXTRACTO DE *Hippocratea excelsa* 40mg/ml.

El efecto del extracto de *Hippocratea excelsa* sobre las 4 bacterias se determinó por el método de dilución en microplaca, después de realizar este ensayo se agregó MTT y se realizó una lectura visual obteniendo resultados cualitativos, siendo la bacteria más sensible *Streptococcus faecalis* con una CMI de 15.6µg/100µl, después *Escherichia coli* con una CMI de 1000µg/100µl, seguida por *Streptococcus uberis* con una CMI de 2000µg/100µl y *Staphylococcus aureus* fue la más resistente al verse inhibida solo a 4000µg/100µl (Tabla 16). Posteriormente se realizaron lecturas en el espectrofotómetro a 560nm proporcionando resultados cuantitativos en valores de absorbancia, los cuales coinciden con los resultados cualitativos (Tabla 17). El extracto de *Hippocratea excelsa* presenta resultados de inhibición muy satisfactorios para *Streptococcus faecalis* ya que la cepa tratada se mantiene muy cerca del control negativo, es medianamente efectivo contra *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* y *Staphylococcus aureus* (Gráfica 2).



**TABLA (16):** Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Hippocratea excelsa*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
4000	-	-	-	-
2000	-	+/-	-	-
1000	-	+	+/-	-
500	+/-	+	+/-	-
250	+	+	+	-
125	+	+	+	-
62.5	+	+	+	-
31.2	+	+	+	-
15.6	+	+	+	-
Control (+)	+	+	+	+
Control (-)	-	-	-	-
Blanco	-	-	-	-

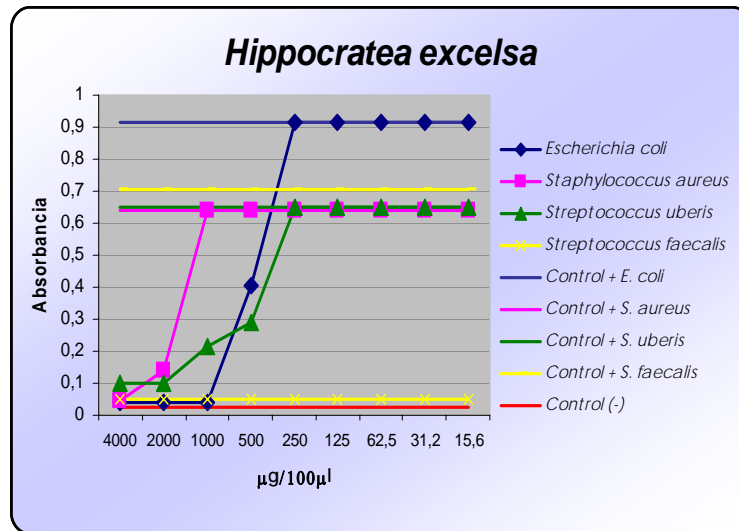
+ Desarrollo de la bacteria, - Inhibición de desarrollo de la bacteria.



**TABLA (17):** Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Hippocratea excelsa*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
4000	0.040	0.045	0.030	0.033
2000	0.040	0.141	0.030	0.033
1000	0.040	0.638	0.217	0.033
500	0.407	0.638	0.289	0.033
250	0.916	0.638	0.652	0.033
125	0.916	0.638	0.652	0.033
62.5	0.916	0.638	0.652	0.033
31.2	0.916	0.638	0.652	0.033
15.6	0.916	0.638	0.652	0.033
Control (+)	0.916	0.638	0.652	0.707
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025

GRAFICA (2): Ensayo del extracto de *Hippocratea excelsa* con las 4 diferentes bacterias y sus respectivos controles no tratados.



#### 4.2.2 EXTRACTO DE *Caléndula officinalis* 40mg/ml.

El efecto del extracto de *Caléndula officinalis* sobre las 4 bacterias se determinó por el método de dilución en microplaca, después de realizar este ensayo se agregó MTT y se realizó una lectura visual obteniendo resultados cualitativos, siendo las bacterias más sensibles *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus uberis*, ambos con una CMI de  $15.6\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , después *Staphylococcus aureus* con una CMI de  $1000\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  (Figura 21), *Escherichia coli* (Figura 21) fue la más resistente al verse inhibida solo a  $4000\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  (Tabla 18). Posteriormente se realizaron lecturas en el espectrofotómetro a 560nm proporcionando resultados cuantitativos en valores de absorbancia, los cuales coinciden con los resultados cualitativos (Tabla 19). El extracto de *Caléndula officinalis* presenta resultados de inhibición



muy satisfactorios para *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus uberis* ya que las cepas tratadas se mantienen muy cerca del control negativo, es medianamente efectivo contra *Staphylococcus aureus* y la bacteria con menor sensibilidad a este extracto fue *Escherichia coli*. (Gráfica 3).

**TABLA (18):** Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Caléndula officinalis*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
4000	-	-	-	-
2000	+/-	-	-	-
1000	+	-	-	-
500	+	+/-	-	-
250	+	+	-	-
125	+	+	-	-
62.5	+	+	-	-
31.2	+	+	-	-
15.6	+	+	-	-
Control (+)	+	+	+	+
Control (-)	-	-	-	-
Blanco	-	-	-	-

+ Desarrollo de la bacteria, - Inhibición de desarrollo de la bacteria.



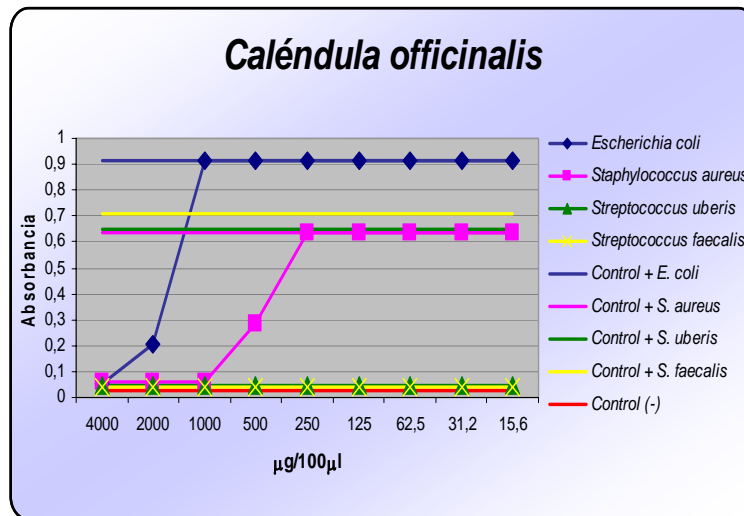


**TABLA (19):** Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Caléndula officinalis*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
4000	0.052	0.062	0.036	0.031
2000	0.203	0.062	0.036	0.031
1000	0.916	0.062	0.036	0.031
500	0.916	0.283	0.036	0.031
250	0.916	0.638	0.036	0.031
125	0.916	0.638	0.036	0.031
62.5	0.916	0.638	0.036	0.031
31.2	0.916	0.638	0.036	0.031
15.6	0.916	0.638	0.036	0.031
Control (+)	0.916	0.638	0.652	0.707
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025



GRAFICA (3): Ensayo del extracto de *Caléndula officinalis* con las 4 diferentes bacterias y sus respectivos controles no tratados.



#### 4.2.3 EXTRACTO DE *Echinacea purpúrea* 40mg/ml.

El efecto del extracto de *Echinacea purpúrea* sobre las 4 bacterias se determinó por el método de dilución en microplaca, después de realizar este ensayo se agregó MTT y se realizó una lectura visual obteniendo resultados cualitativos, siendo las bacterias más sensibles *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus uberis*, ambos con una CMI de  $15.6\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , después *Staphylococcus aureus* con una CMI de  $250\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , *Escherichia coli* fue la más resistente al verse inhibida solo a  $1000\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  (Tabla 20). Posteriormente se realizaron lecturas en el espectrofotómetro a  $560\text{nm}$  proporcionando resultados cuantitativos en valores de absorbancia, los cuales coinciden con los resultados cualitativos (Tabla 21). El extracto de *Echinacea purpúrea* presenta resultados de inhibición muy satisfactorios para *Streptococcus faecalis*



y *Streptococcus uberis* ya que las cepas tratadas se mantienen muy cerca del control negativo, es medianamente efectivo contra *Staphylococcus aureus* y la bacteria con menor sensibilidad a este extracto fue *Escherichia coli*. (Gráfica 4).

**TABLA (20):** Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Echinacea purpúrea*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
4000	-	-	-	-
2000	-	-	-	-
1000	-	-	-	-
500	+/-	-	-	-
250	+/-	-	-	-
125	+/-	+/-	-	-
62.5	+	+/-	-	-
31.2	+	+	-	-
15.6	+	+	-	-
Control (+)	+	+	+	+
Control (-)	-	-	-	-
Blanco	-	-	-	-

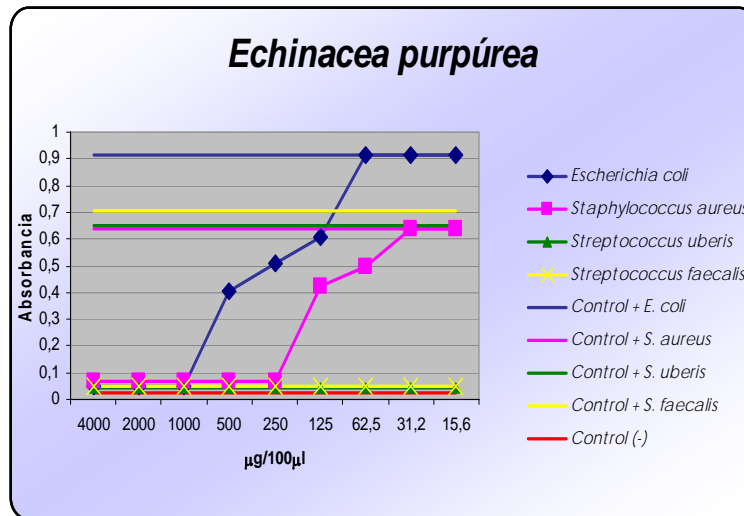
+ Desarrollo de la bacteria, - Inhibición de desarrollo de la bacteria.



**TABLA (21):** Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Echinacea purpúrea*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
4000	0.042	0.070	0.030	0.038
2000	0.042	0.070	0.030	0.038
1000	0.042	0.070	0.030	0.038
500	0.407	0.070	0.030	0.038
250	0.508	0.070	0.030	0.038
125	0.610	0.425	0.030	0.038
62.5	0.916	0.496	0.030	0.038
31.2	0.916	0.638	0.030	0.038
15.6	0.916	0.638	0.030	0.038
Control (+)	0.916	0.638	0.652	0.707
Control (-)	0.025	0.025	0.025	0.025

GRAFICA (4): Ensayo del extracto de *Echinacea purpúrea* con las 4 diferentes bacterias y sus respectivos controles no tratados.



#### 4.2.4 EXTRACTO DE *Hippocratea excelsa* - *Caléndula officinalis* 40mg/ml.

Después de evaluar el efecto inhibitorio de los extractos solos se procedió a realizar combinaciones. El efecto de la mezcla de los extractos de *Hippocratea excelsa* y *Caléndula officinalis* sobre las 4 bacterias estudiadas se determinó por el método de dilución en microplaca, después de realizar este ensayo se agregó MTT y se realizó una lectura visual obteniendo resultados cualitativos, siendo las bacterias más sensibles *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus uberis*, ambos con una CMI de  $7.8\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  (Figura 20), después *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con una CMI de  $500\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , (Tabla 22). Posteriormente se realizaron lecturas en el espectrofotómetro a 560nm proporcionando resultados cuantitativos en valores de absorbancia, los cuales coinciden con los resultados



cualitativos (Tabla 23). La mezcla de los extractos de *Hippocratea excelsa* y *Caléndula officinalis* presentan resultados de inhibición muy favorables para *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus uberis* ya que las cepas tratadas se mantienen muy cerca del control negativo, esta primera combinación es medianamente efectiva contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. (Gráfica 5).

**TABLA (22):** Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Hippocratea excelsa* - *Caléndula officinalis*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Hippocratea excelsa</i>	$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Caléndula officinalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
2000		-	-	-	-
1000		-	-	-	-
500		-	-	-	-
250		+/-	+/-	-	-
125		+	+	-	-
62.5		+	+	-	-
31.2		+	+	-	-
15.6		+	+	-	-
7.8		+	+	-	-
Control (+)		+	+	+	+
Control (-)		-	-	-	-
Blanco		-	-	-	-

+ Desarrollo de la bacteria, - Inhibición de desarrollo de la bacteria.

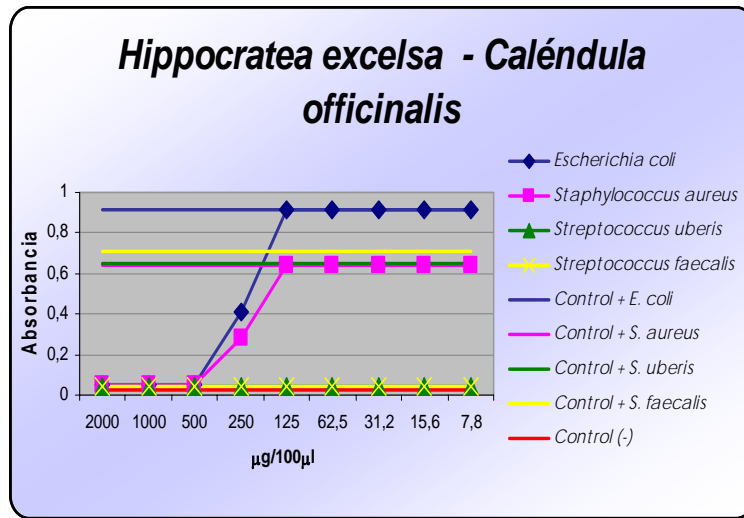


**TABLA (23):** Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Hippocratea excelsa* - *Caléndula officinalis*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Hippocratea excelsa</i>	$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Caléndula officinalis</i>	Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Streptococcus uberis	Streptococcus faecalis
2000		0.042	0.040	0.033	0.037
1000		0.042	0.040	0.033	0.037
500		0.042	0.040	0.033	0.037
250		0.407	0.283	0.033	0.037
125		0.916	0.638	0.033	0.037
62.5		0.916	0.638	0.033	0.037
31.2		0.916	0.638	0.033	0.037
15.6		0.916	0.638	0.033	0.037
7.8		0.916	0.638	0.033	0.037
Control (+)		0.916	0.638	0.652	0.707
Control (-)		0.025	0.025	0.025	0.025



**GRAFICA (5):** Ensayo de la combinación de *Hippocratea excelsa* y *Caléndula officinalis* con las 4 diferentes bacterias y sus respectivos controles no tratados.



#### 4.2.5 EXTRACTO DE *Caléndula officinalis* – *Echinacea purpúrea* 40mg/ml.

El efecto de la mezcla de los extractos de *Caléndula officinalis* y *Echinacea purpúrea* sobre las 4 bacterias se determinó por el método de dilución en microplaca, después de realizar este ensayo se agregó MTT y se realizó una lectura visual obteniendo resultados cualitativos, siendo las bacterias más sensibles *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus uberis*, ambos con una CMI de  $7.8\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  (Figura 20), después *Staphylococcus aureus* con una CMI de  $250\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  y finalmente *Escherichia coli* que presenta una CMI de  $500\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  (Tabla 24). Posteriormente se realizaron lecturas en el espectrofotómetro a 560nm proporcionando resultados cuantitativos en valores de absorbancia, los cuales coinciden con los resultados cualitativos (Tabla 25). La mezcla de los extractos de *Caléndula*





*officinalis* y *Echinacea purpúrea* presentan resultados de inhibición muy satisfactorios para *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus uberis* ya que las cepas tratadas se mantienen muy cerca del control negativo, la mezcla resulta medianamente efectiva contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. (Gráfica 6).

**TABLA (24):** Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Caléndula officinalis* - *Echinacea purpúrea*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Caléndula</i> <i>officinalis</i>	$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Echinacea</i> <i>purpúrea</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>uberis</i>	<i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i>
2000		-	-	-	-
1000		-	-	-	-
500		-	-	-	-
250		+/-	-	-	-
125		+/-	+/-	-	-
62.5		+	+/-	-	-
31.2		+	+	-	-
15.6		+	+	-	-
7.8		+	+	-	-
Control (+)		+	+	+	+
Control (-)		-	-	-	-
Blanco		-	-	-	-

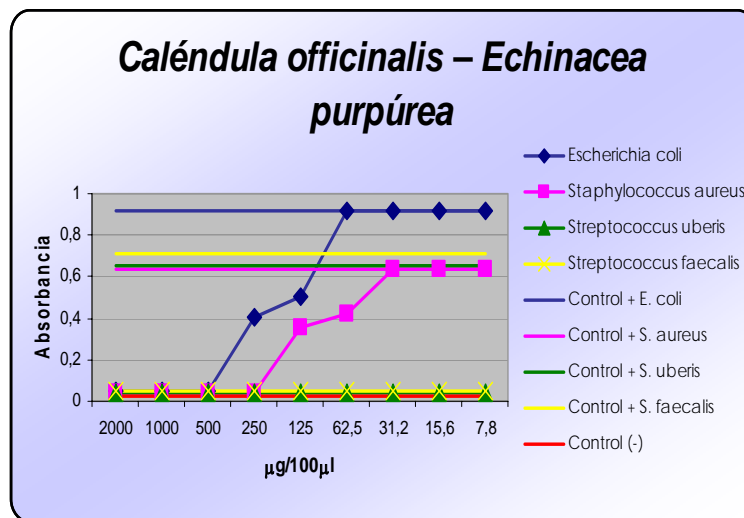
+ Desarrollo de la bacteria, - Inhibición de desarrollo de la bacteria.



**TABLA (25):** Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Caléndula officinalis* - *Echinacea purpúrea*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Caléndula officinalis</i>	$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Echinacea purpúrea</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
2000		0.038	0.042	0.032	0.038
1000		0.038	0.042	0.032	0.038
500		0.038	0.042	0.032	0.038
250		0.407	0.282	0.032	0.038
125		0.508	0.354	0.032	0.038
62.5		0.916	0.425	0.032	0.038
31.2		0.916	0.638	0.032	0.038
15.6		0.916	0.638	0.032	0.038
7.8		0.916	0.638	0.032	0.038
Control (+)		0.916	0.638	0.652	0.707
Control (-)		0.025	0.025	0.025	0.025

**GRAFICA (6):** Ensayo de la combinación de *Caléndula officinalis* y *Echinacea purpúrea* con las 4 diferentes bacterias y sus respectivos controles no tratados.



#### 4.2.6 EXTRACTO DE *Hippocratea excelsa* – *Echinacea purpúrea* 40mg/ml.

El efecto de la combinación de los extractos de *Echinacea purpúrea* con *Hippocratea excelsa* sobre las 4 bacterias estudiadas se determinó por el método de dilución en microplaca, después de realizar este ensayo se agregó MTT y se realizó una lectura visual obteniendo resultados cualitativos, siendo la bacteria más sensible *Streptococcus faecalis* con una CMI de  $7.8\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , después *Streptococcus uberis* con una CMI de  $62.5\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ , seguida por *Staphylococcus aureus* que presenta una CMI de  $125\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  y finalmente *Escherichia coli* con una CMI de  $250\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  (Tabla 26). Posteriormente se realizaron lecturas en el espectrofotómetro a 560nm proporcionando resultados cuantitativos en valores de absorbancia,



los cuales coinciden con los resultados cualitativos (Tabla 27). La mezcla de los extractos de *Echinacea purpúrea* con *Hippocratea excelsa* presentan resultados de inhibición favorables para *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus uberis* ya que las cepas tratadas se mantienen muy cerca del control negativo, esta combinación resulta medianamente efectiva contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. (Gráfica 7).



**TABLA (26):** Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Hippocratea excelsa*- *Echinacea purpúrea*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Hippocratea excelsa</i>	$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Echinacea purpúrea</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
2000		-	-	-	-
1000		-	-	-	-
500		-	-	-	-
250		-	-	-	-
125		+/-	-	-	-
62.5		+	+/-	-	-
31.2		+	+/-	+/-	-
15.6		+	+	+	-
7.8		+	+	+	-
Control (+)		+	+	+	+
Control (-)		-	-	-	-
Blanco		-	-	-	-

+ Desarrollo de la bacteria, - Inhibición de desarrollo de la bacteria.

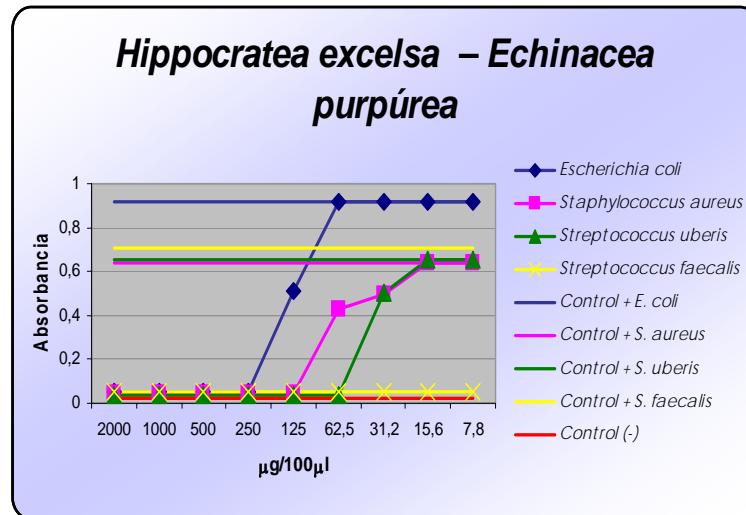


**TABLA (27):** Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Hippocratea excelsa*- *Echinacea purpúrea*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Hippocratea excelsa</i>	$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Echinacea purpúrea</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
2000		0.040	0.042	0.031	0.036
1000		0.040	0.042	0.031	0.036
500		0.040	0.042	0.031	0.036
250		0.040	0.042	0.031	0.036
125		0.508	0.042	0.031	0.036
62.5		0.916	0.042	0.031	0.036
31.2		0.916	0.496	0.507	0.036
15.6		0.916	0.638	0.652	0.036
7.8		0.916	0.638	0.652	0.036
Control (+)		0.916	0.638	0.652	0.707
Control (-)		0.025	0.025	0.025	0.025



GRAFICA (7): Ensayo de la combinación de *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpúrea* con las diferentes bacterias y sus respectivos controles no tratados.



#### 4.2.7 EXTRACTO DE *Hippocratea excelsa* – *Caléndula officinalis* - *Echinacea purpúrea* 40mg/ml.

Finalmente se realizó la combinación de los tres extractos: *Hippocratea excelsa*, *Caléndula officinalis* y *Echinacea purpúrea*, para determinar el efecto inhibitorio sobre las 4 bacterias estudiadas se empleó el método de dilución en microplaca, después de realizar este ensayo se agregó MTT y se realizó una lectura visual obteniendo resultados cualitativos, siendo las bacterias más sensibles *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus uberis*, ambos con una CMI de  $5.2\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  (Figura 20), después *Staphylococcus aureus* con una CMI de  $83.3\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  y finalmente *Escherichia coli* con una CMI de  $166.6\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  (Tabla 28). Posteriormente se realizaron lecturas en el espectrofotómetro a 560nm



proporcionando resultados cuantitativos en valores de absorbancia, los cuales coinciden con los resultados cualitativos (Tabla 29). La combinación de los tres extractos: *Hippocratea excelsa*, *Caléndula officinalis* y *Echinacea purpúrea* presentan resultados de inhibición favorables principalmente para *Streptococcus faecalis* y *Streptococcus uberis* ya que las cepas tratadas se mantienen muy cerca del control negativo, esta mezcla resulta medianamente efectiva contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. (Gráfica 8).





**TABLA (28):** Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Hippocratea excelsa*- *Caléndula officinalis* - *Echinacea purpúrea*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Caléndula</i> <i>officinalis</i>	$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Hippocratea</i> <i>excelsa</i>	$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Echinacea</i> <i>purpúrea</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>uberis</i>	<i>Streptococcus</i> <i>faecalis</i>
	1333		-	-	-	-
	666.5		-	-	-	-
	333.2		-	-	-	-
	166.6		-	-	-	-
	83.3		+/-	-	-	-
	41.6		+	+/-	-	-
	20.8		+	+	-	-
	10.4		+	+	-	-
	5.2		+	+	-	-
	Control (+)		+	+	+	+
	Control (-)		-	-	-	-
	Blanco		-	-	-	-

+ Desarrollo de la bacteria, - Inhibición de desarrollo de la bacteria.



**TABLA (29):** Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias tratadas con el extracto de *Hippocratea excelsa*- *Caléndula officinalis* - *Echinacea purpúrea*.

$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Caléndula officinalis</i>	$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Hippocratea excelsa</i>	$\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ <i>Echinacea purpúrea</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
	1333		0.052	0.056	0.038	0.035
	666.5		0.052	0.056	0.038	0.035
	333.2		0.052	0.056	0.038	0.035
	166.6		0.052	0.056	0.038	0.035
	83.3		0.508	0.056	0.038	0.035
	41.6		0.916	0.638	0.038	0.035
	20.8		0.916	0.638	0.038	0.035
	10.4		0.916	0.638	0.038	0.035
	5.2		0.916	0.638	0.038	0.035
	Control (+)		0.916	0.638	0.038	0.035
	Control (-)		0.025	0.025	0.025	0.025



**GRAFICA (8):** Ensayo de la combinación de *Hippocratea excelsa*, *Caléndula officinalis* y *Echinacea purpúrea* con las 4 diferentes bacterias y sus respectivos controles.

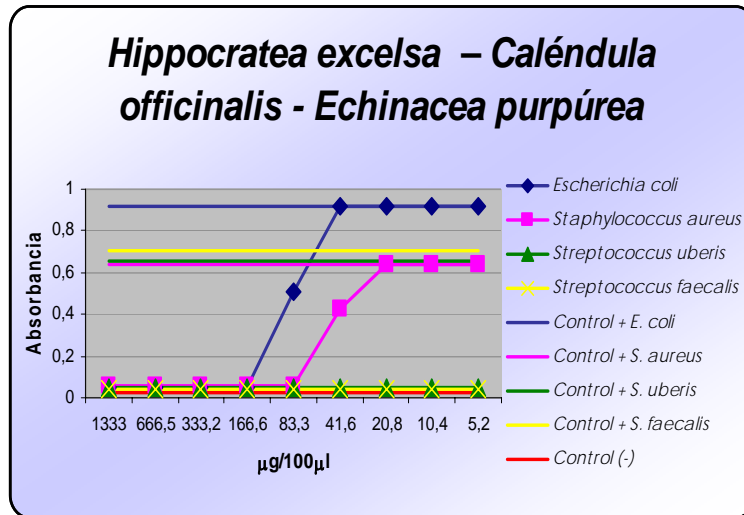




FIGURA (20): Resultados para *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis* con tres diferentes combinaciones de extractos utilizando el método de Mosmann y dilución en microplaca.

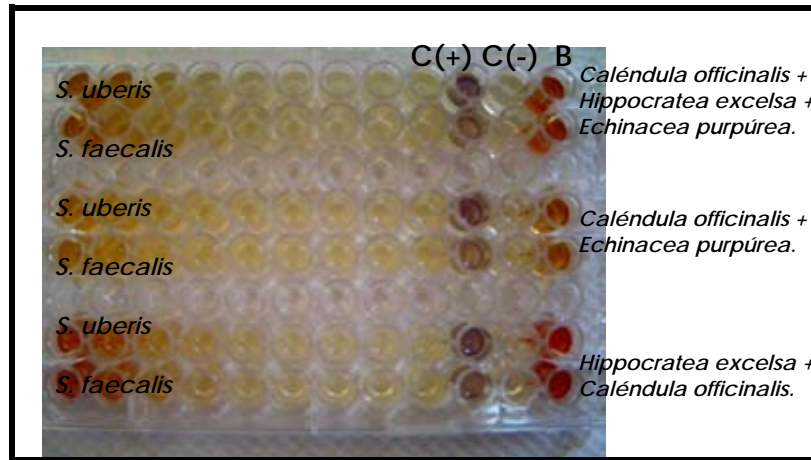
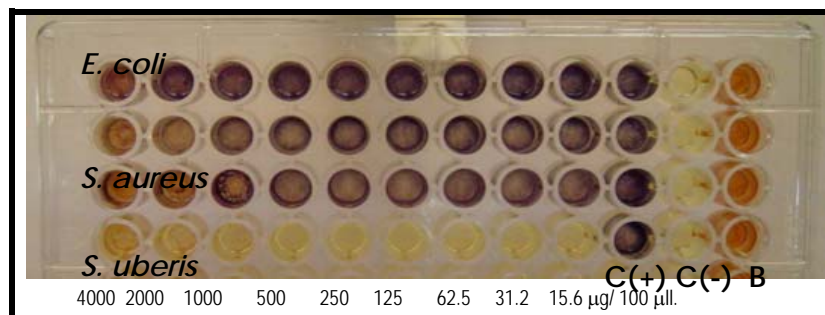


FIGURA (21): Resultados para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis* con el extracto de *Caléndula officinalis*; lectura con MTT dilución en microplaca.





**4.3 RESULTADOS DE CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) DE  
LOS EXTRACTOS DE: *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e  
*Hippocratea excelsa*, SOLOS Y COMBINADOS.**

La Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los tres extractos solos y combinados se determinó por dilución en microplaca y el método de Mosmann, los resultados obtenidos indican que las bacterias más sensibles a estos extractos son *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis*, mientras que *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* presentan baja sensibilidad (Tabla 30). Los resultados de CMI mejoran notablemente al evaluar a los extractos combinados (Gráfica 9).

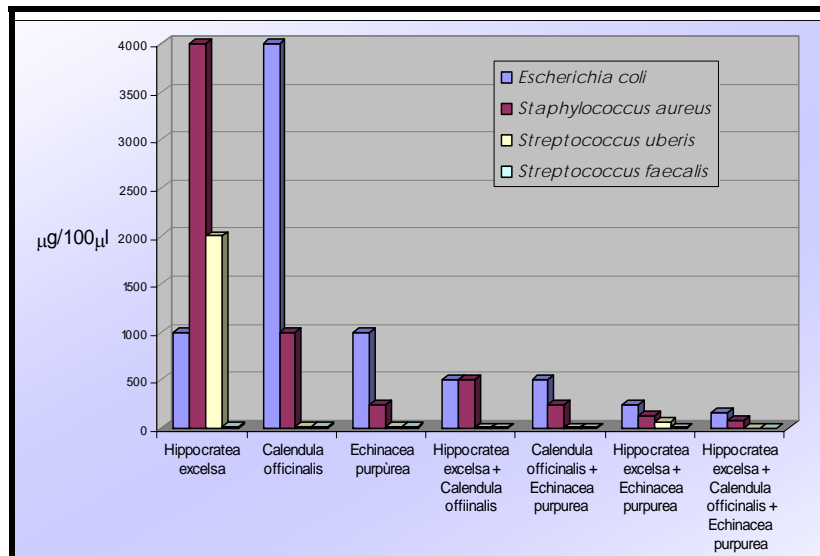


**TABLA (30):** Resultados de CMI de los extractos solos y combinados *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis*.

Bacteria	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Hippocratea excelsa</i>	1000 μg/100μl	4000 μg/100μl	2000 μg/100μl	15.6 μg/100μl
<i>Caléndula officinalis</i>	4000 μg/100μl	1000 μg/100μl	15.6 μg/100μl	15.6 μg/100μl
<i>Echinacea purpúrea</i>	1000 μg/100μl	250 μg/100μl	15.6 μg/100μl	15.6 μg/100μl
<i>Caléndula officinalis</i> y <i>Hippocratea excelsa</i>	500 μg/100μl	500 μg/100μl	7.8 μg/100μl	7.8 μg/100μl
<i>Caléndula officinalis</i> y <i>Echinacea purpúrea</i>	500 μg/100μl	250 μg/100μl	7.8 μg/100μl	7.8 μg/100μl
<i>Hippocratea excelsa</i> y <i>Echinacea purpúrea</i>	250 μg/100μl	125 μg/100μl	62.5 μg/100μl	7.8 μg/100μl
<i>Caléndula officinalis</i> , <i>Hippocratea excelsa</i> y <i>Echinacea purpúrea</i>	166.6 μg/100μl	83.3 μg/100μl	5.2 μg/100μl	5.2 μg/100μl



**GRAFICA (9):** CMI de los extractos de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, solos y combinados frente a bacterias aisladas de casos de mastitis.



#### 4.4 RESULTADOS DEL EFECTO BACTERIOSTÁTICO/BACTERICIDA DE LOS TRES EXTRACTOS: *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, SOLOS Y COMBINADOS.

Después de evaluar por medio de una prueba cualitativa si el efecto de los extractos de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, solos y combinados, es bacteriostático y/o bactericida, los resultados nos indican que el efecto que tienen sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis* es bacteriostático (Tabla 31).



TABLA (31): Actividad bactericida o bacteriostática de los tres extractos solos y combinados.

Bacteria Extracto	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Caléndula officinalis</i> .	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Hippocratea excelsa</i> .	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Echinacea purpúrea</i> .	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Caléndula officinalis</i> y <i>Hippocratea excelsa</i> .	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Caléndula officinalis</i> y <i>Echinacea purpúrea</i> .	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Hippocratea excelsa</i> y <i>Echinacea purpúrea</i> .	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático
<i>Caléndula officinalis</i> , <i>Hippocratea excelsa</i> y <i>Echinacea purpúrea</i> .	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático	Bacteriostático





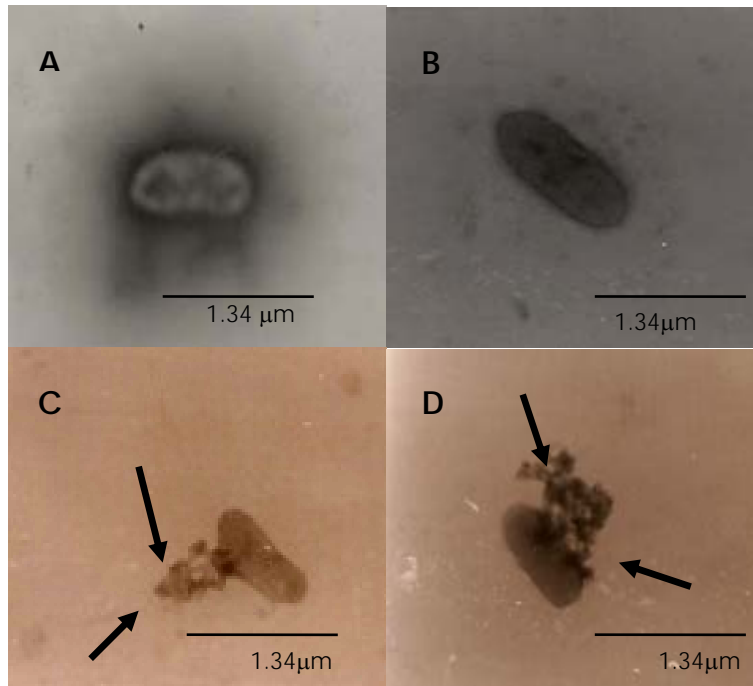
#### 4.5 OBSERVACIONES OBTENIDAS EN MICROSCOPIO ELECTRONICO.

##### 4.5.1 *Escherichia coli* tratada con extracto de *Hippocratea excelsa*.

Al realizar las observaciones en microscopio electrónico a 10 000 magnificaciones de *Escherichia coli* encontramos que las muestras no tratadas (Controles positivos) se observan con bordes bien definidos (Figura 22A y 22B). Mientras que las muestras de *Escherichia coli* tratadas con el extracto de *Hippocratea excelsa* (Figura 22C y 22D) se observa claramente la ruptura o lisis de la bacteria, liberando al medio su contenido, se cree que esta lisis es posterior a la formación de esferoplastos por ser una bacteria gram negativa, ocasionados por el extracto.



**FIGURA (22):** Microfotografías de *Escherichia coli* obtenidas a 10 000 magnificaciones, A y B pertenecen a una muestra control, no tratadas. Abajo C y D corresponden a una muestra tratada con extracto de *Hippocratea excelsa*.

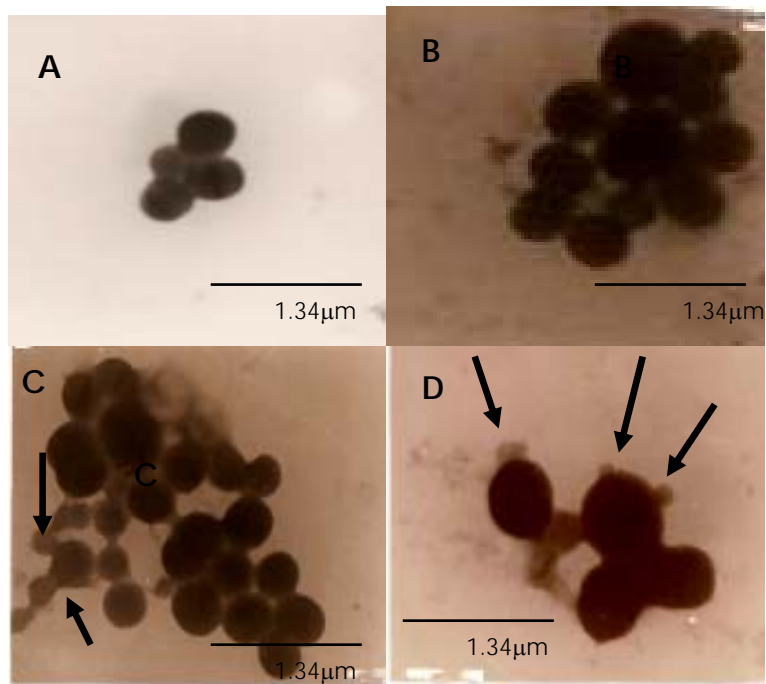




#### 4.5.2 *Staphylococcus aureus* tratado con extracto de *Echinacea purpúrea*.

Al realizar las observaciones en microscopio electrónico a 10 000 magnificaciones de *Staphylococcus aureus* encontramos que las muestras no tratadas (Controles positivos) se puede observar a las bacterias agrupadas en racimos donde los cocos tienen una morfología normal, bordes bien definidos y tamaño uniforme (Figura 23A y 23B). Las bacterias de *Staphylococcus aureus* tratadas con el extracto de *Echinacea purpúrea* (Figura 23C y 23D) se observan de diferentes tamaños, algunos muy pequeños y es notable la formación de protoplastos, estos preceden a la lisis de las bacterias gram positivas.

**FIGURA (23):** Microfotografías de *Staphylococcus aureus* a 10 000 magnificaciones, A y B pertenecen a una muestra control, no tratada. Abajo C y D corresponden a una muestra tratada con extracto de *Echinacea purpúrea*.

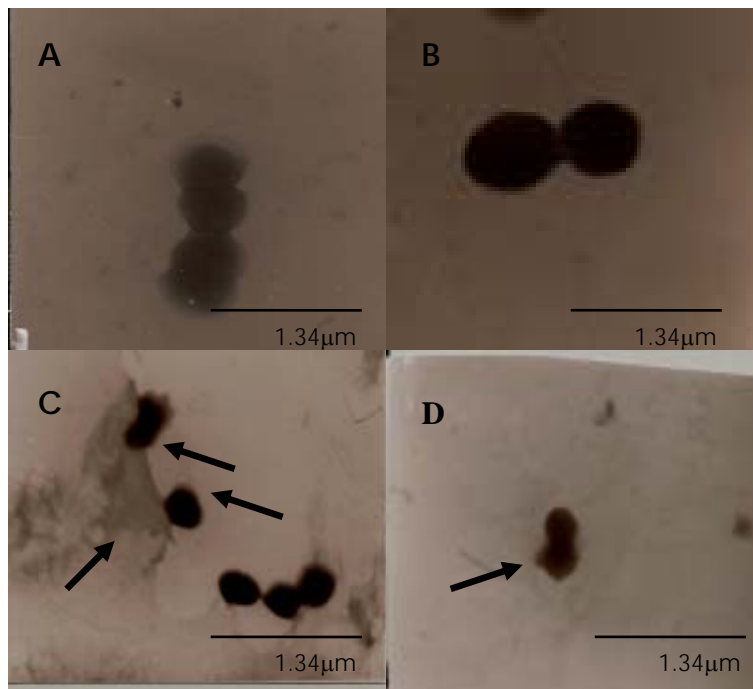




#### 4.5.3 *Streptococcus uberis* tratado con extracto de *Caléndula officinalis*.

Las Microfotografías obtenidas de microscopio electrónico a 10 000 magnificaciones de *Streptococcus uberis* nos permiten observar que las bacterias no tratadas (Controles positivos) se encuentran agrupadas en una cadena corta (Figura 24A) y en pares (Figura 24B), en ambas microfotografías se observa que presentan uniformidad en tamaño y forma además de presentar bordes bien delimitados. Las bacterias de *Streptococcus uberis* tratadas con el extracto de *Caléndula officinalis* se observan bacterias rodeados de material mucoide y de formas irregulares (Figura 24C) y se puede observar la formación de protoplastos (Figura 24D). Aunque en estas microfotografías el daño a nivel estructural no sea muy evidente, es importante mencionar que *Streptococcus uberis* fue una de las bacterias más sensibles a los tres extractos solos y combinados, por lo cual creemos que el principal efecto inhibitorio de *Caléndula officinalis* sobre *Streptococcus uberis* no sea a nivel de pared celular.

**FIGURA (24):** Microfotografías de *Streptococcus uberis* a 10 000 magnificaciones, A y B pertenecen a una muestra control, no tratadas. Abajo C y D corresponden a una muestra tratada con extracto de *Caléndula officinalis*.

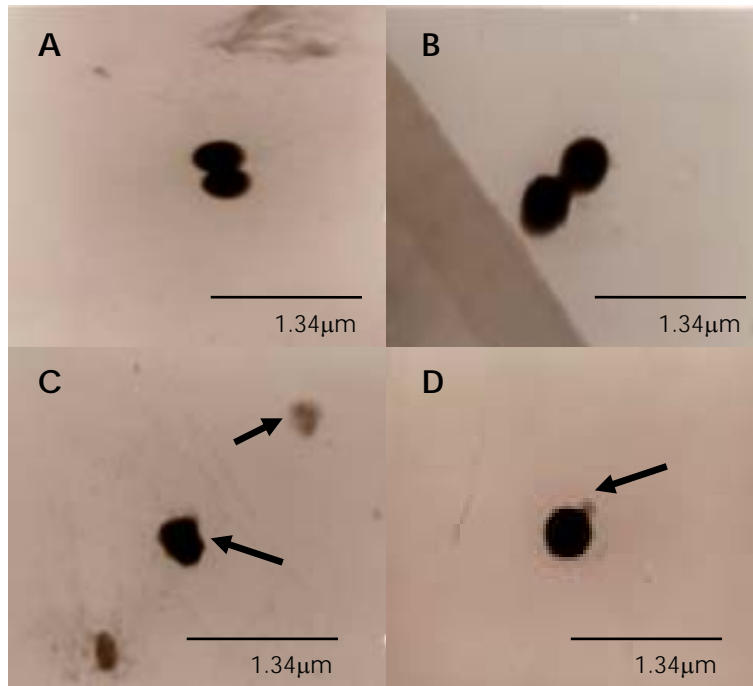




#### 4.5.4 *Streptococcus faecalis* tratado con la mezcla de extractos: *Hippocratea excelsa* y *Caléndula officinalis*.

Al realizar las observaciones en microscopio electrónico a 10 000 magnificaciones de *Streptococcus faecalis* encontramos que las muestras no tratadas (Controles positivos) permiten observar agrupaciones en pares con bordes bien delimitados y similitud en tamaño y forma (Figura 25A y 25B). En la muestra tratada con la mezcla de los extractos de *Hippocratea excelsa* y *Caléndula officinalis*, se observan bacterias de *Streptococcus faecalis* con claras irregularidades en forma y tamaño (Figura 25C), además se puede observar la evidente formación de protoplastos (Figura 25D).

**FIGURA (25):** Microfotografías de *Streptococcus faecalis* a 10 000 magnificaciones, A y B pertenecen a una muestra control no tratada. Abajo C y D corresponden a una muestra tratada con la mezcla de los extractos de *Hippocratea excelsa* y *Caléndula officinalis*.







## 5. DISCUSION DE RESULTADOS

La mastitis es la respuesta inflamatoria de la glándula mamaria normalmente causada por bacterias, es probablemente la más costosa de las enfermedades infecciosas que afecta a las vacas y otras especies lecheras ya que causa una gran cantidad de pérdidas económicas a nivel mundial y en especial en las regiones con una producción lechera intensiva. Su impacto es en la producción animal, calidad de la leche producida y salud pública. <sup>(5, 56)</sup>

La leche constituye un alimento de importancia universal, forma parte esencial de la dieta del hombre y debido a sus características fisicoquímicas representa un riesgo potencial para la población si esta se encuentra contaminada con agentes patógenos, sus toxinas o residuos de antimicrobianos si no se cumplen las normas higiénicas establecidas. <sup>(10, 56)</sup>

Los residuos de antimicrobianos en la leche generan alergias y multiresistencia bacteriana. La resistencia microbiana en medicina veterinaria adquiere aún más relevancia si se considera que las bacterias multiresistentes patógenas y no patógenas de procedencia animal pueden transferir su resistencia a bacterias nocivas y de flora normal de la población humana. <sup>(46, 68)</sup>

Es por eso que el interés en el estudio de plantas medicinales para tratar enfermedades infecciosas ha aumentado por todo el mundo como lo reporta Alanis et. al. en 2005 <sup>(1)</sup>. En México existe una gran diversidad vegetal y cultural lo que ha resultado en un amplio uso de plantas con cerca de 7000 especies útiles de un total de casi 22000 especies de plantas con flores <sup>(32)</sup>. Déciga en 2007 <sup>(39)</sup> menciona que de acuerdo al inventario del Instituto Nacional Indigenista (INI) en



México hay más de 3015 especies de plantas usadas en la Medicina Tradicional Mexicana pero muchas de estas especies no cuentan con la información química, toxicológica, farmacológica o clínica suficiente.

En el presente trabajo se aislaron e identificaron 10 bacterias de casos de mastitis bovina, de las cuales la cepa más representativa es *Streptococcus uberis* correspondiente al 50%, seguida de *Streptococcus faecalis* y *Escherichia coli* con un 20%, finalmente se encuentra a *Staphylococcus aureus* con un 10%. (Gráfica 1). Wolter en el año 2000 <sup>(56)</sup> menciona que *Staphylococcus aureus* se considera a nivel mundial el agente patógeno más importante asociado con la glándula mamaria que causa la mastitis, es un microorganismo contagioso que se encuentra normalmente en la superficie de la piel y puede colonizar rápidamente el canal del pezón, puede ser transmitido fácilmente de una vaca a otra <sup>(59, 69)</sup> esto contribuye al hecho de que la incidencia de mastitis por estas bacterias es alta en establecimientos lecheros reticentes a realizar medidas de control donde es común observar tasas de prevalencia de hasta el 50% como lo indica Saron en el año 2000 <sup>(52)</sup>. En este caso el hato lechero estudiado debido a que ha aplicado medidas de prevención y control para evitar infecciones por estos microorganismos presenta una tasa de prevalencia para *Staphylococcus aureus* del 10% , pero niveles elevados de mastitis clínica causada por agentes asociados al medio ambiente como *Streptococcus uberis* y *Escherichia coli*. <sup>(52, 56)</sup>

*Streptococcus uberis* y *Escherichia coli* son los microorganismos ambientales más importantes relacionados con casos de mastitis clínica, viven en los alrededores de la vaca como la cama, estiércol, sus patas y piel de ubre y pezón, lo cual explica que presenten la mayor prevalencia esto coincide con lo mencionado por Saron en el año 2000 <sup>(52)</sup>. Las mastitis causadas por *Streptococcus uberis* y sus



consecuencias cada día son más preocupantes hay dos causas fundamentales que conducen a esta situación, la primera es que los sistemas de prevención y vigilancia como baño de pezones e higiene de la maquina de ordeño son insuficientes para su control y la segunda es una importante falta de respuesta a la terapia de acuerdo a lo reportado por Echeverría en el año 2000. <sup>(13)</sup>

*Streptococcus faecalis* al ser un microorganismo oportunista que se encuentra en piel de la ubre y pezones adquiere importancia a raíz del descenso en la prevalencia de microorganismos como *Staphylococcus aureus* se consideran resultantes del buen trabajo realizado en cuanto al control de microorganismos contagiosos como lo menciona Saron en el año 2000 <sup>(52)</sup>. Así mismo se observa que el 75% de las cepas son bacterias Gram positivas y el 25% son gram negativas.

Los extractos empleados fueron hidroalcohólicos, se prepararon con etanol al 70% ya que Pérez Carreón et. al en 2002 <sup>(43)</sup> probaron extracto acuoso, acuoso-etanólico, etanólico y clorofórmico, demostrando que el extracto hidroalcohólico contiene saponinas, glucósidos, sesquiterpenos, flavonoides y alcoholes ya que por cuestiones de polaridad y solubilidad, de los principales componentes de las plantas al realizar una extracción hidroalcohólica permite obtener una amplia variedad de sustancias químicas lo que le confiere una importante actividad biológica como bactericida, anti inflamatoria, antiviral, antitumoral y antimutagénica como lo indicó Lara Ochoa en 1996 <sup>(29)</sup> Posteriormente Montalvo en 2005 <sup>(36)</sup> obtuvo resultados satisfactorios trabajando con extracto hidroalcohólico de *Caléndula officinalis* inhibiendo el desarrollo de bacterias aisladas de casos de mastitis bovina.

Una vez obtenidos los extractos se retira el material insoluble por filtración empleando papel filtro No. 3 Wattman <sup>(53)</sup>. Estos extractos se



esterilizaron por filtración con membrana de celulosa de  $0.22\mu\text{m}$  previamente esterilizadas en autoclave, como lo plantea Vera y Gardea en 2006 <sup>(53)</sup> posteriormente se les realizó una prueba de esterilidad para lo cual se sembraron de manera masiva en medios BHI o Agar sangre para facilitar el desarrollo de los microorganismos en caso de estar presentes, obteniendo resultados de crecimiento negativos después de la incubación por 24 y 48 horas, lo cual indica que la esterilización con membrana de celulosa de  $0.22\mu\text{m}$  y teniendo las precauciones necesarias es un proceso viable que permite esterilizar compuestos que no pueden ser sometidos a altas temperaturas.

Una vez esterilizados los extractos, se evaporaron hasta sequedad en el horno a  $56\text{ }^{\circ}\text{C}$  evitando sobrepasar de esta temperatura. Vera y Gardea en 2006 <sup>(53)</sup> y Hernández 2008 <sup>(26)</sup> proponen la evaporación en un rotavapor, mientras que Montalvo en 2005 <sup>(36)</sup> propone la obtención de materia seca por medio de liofilización, en el presente trabajo para la evaporación de los extractos a sequedad se empleo un horno manteniendo la temperatura constante a  $54\text{-}55\text{ }^{\circ}\text{C}$  y no sobrepasando de  $57\text{ }^{\circ}\text{C}$ , este método permite la optimización del tiempo ya que la materia seca de 1 litro de extracto se obtiene en 24 horas esta es una importante ventaja sobre la liofilización y el rotavapor, además de que técnicamente es un proceso más sencillo.

El rendimiento obtenido con los extractos de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* es el mismo ya que se obtuvieron cantidades aproximadas de materia seca de las tres plantas, una diferencia importante radica en la facilidad de obtención ya que *Hippocratea excelsa* permitió una sencilla recolección de materia seca debido a que esta se desprendía fácilmente de su recipiente contenedor y en el caso de *Caléndula officinalis* disminuye la facilidad de recolección pues al tratar de tomar los cristales



formados estos salen del contenedor y se observa que son higroscópicos, pero la que representó la mayor dificultad fue *Echinacea purpúrea* porque la materia seca obtenida es altamente higroscópica lo cual le permite adquirir una consistencia pegajosa y pastosa que complica su recolección, almacenamiento y posterior manejo en general.

La materia seca obtenida se pesó y disolvió en Dimetil sulfoxido (DMSO) y se aforó en solución salina fisiológica para obtener una solución stock de concentración de 40mg/ml según lo reportado por Pérez Carreón 2002 <sup>(43)</sup> y Hernández 2008. <sup>(26)</sup>

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de *Caléndula officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpúrea* contra las cuatro diferentes bacterias aisladas de casos de mastitis bovina seleccionamos el método de diluciones en microplaca y para evidenciar los resultados el método de Mosmann , tomando como referencia trabajos anteriores uno de Montalvo en 2005 <sup>(36)</sup> quien estudió el efecto inhibitorio de *Caléndula officinalis* en bacterias de mastitis bovina, y el de González et. al. en 2006 <sup>(23)</sup> quienes evaluaron actividad antiviral de plantas medicinales frente al virus de Hepatitis B y emplean ambos métodos mencionados anteriormente.

La prueba de dilución en microplaca consiste en atacar al microorganismo en un medio líquido (caldo de cultivo) partimos de una solución stock de 40mg/ml y a partir de aquí realizamos diluciones dobles, obteniendo resultados satisfactorios por lo cual se decidió no modificar las concentraciones de los extractos. La prueba de dilución en microplaca presentó ventajas como proporcionar resultados cuantitativos como la Concentración Mínima Inhibitoria además de requerir volúmenes muy pequeños tanto del inóculo bacteriano como de los extractos a evaluar y optimización de material y espacio ya

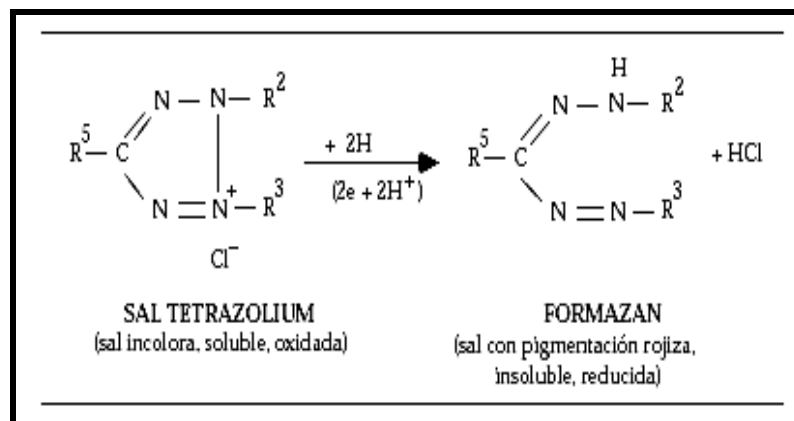


que en una microplaca de titulación (96 pozos) se pueden realizar hasta 8 ensayos diferentes. <sup>(28)</sup>

Para poder evidenciar los resultados obtenidos por dilución en microplaca empleamos el método del Mosmann, este nos permitió evidenciar si el extracto inhibió el crecimiento bacteriano y poder determinar la Concentración Mínima Inhibitoria. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 y modificado posteriormente en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang <sup>(20, 58)</sup>. Este método ha sido utilizado en una gran variedad de ensayos que incluyen citotoxicidad, proliferación, inhibición, supervivencia y activación celular. <sup>(20, 46)</sup>

El ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT, color amarillo) a formazán (color púrpura) por deshidrogenasas mitocondriales (Figura 26). <sup>(4, 20)</sup>

**FIGURA (26):** Fundamento del método de Mosmann: reducción de la sal de tetrazolium a formazán.



Tomado de (67)

Las sales de tetrazolium se conocen desde 1894 siendo reconocidas inicialmente por su efecto de teñir bacterias, son actualmente



utilizadas para medir actividad respiratoria asociada a cadena de transporte de electrones que operan bajo condiciones de respiración aeróbica o anaeróbicas, de esta manera nos permiten medir la actividad metabólica de las bacterias ya que estas poseen sistemas de enzimas deshidrogenasas. <sup>(15, 67)</sup>

Para facilitar la lectura e interpretación de los resultados solo se reporta una cepa de cada bacteria, cabe mencionar que se trabajó con las 10 bacterias y que de acuerdo a su género y especie presentaron el mismo comportamiento, además de que cada ensayo se realizó por triplicado, se determinaron promedios de todas las lecturas así como de los controles positivos y negativos con el propósito de tener un solo resultado representativo de cada una de las cepas.

En otros trabajos se ha evaluado a *Caléndula officinalis* por propiedades antivirales contra el virus de la hepatitis B González et. al. en 2006 <sup>(23)</sup>, antifúngicas contra diferentes especies de *Candida* como lo reportó Cristiane et al en 2008 <sup>(19)</sup>, antitumoral y activación de linfocitos Jiménez et. al. en 2006 <sup>(27)</sup>, obteniendo resultados satisfactorios. En el presente estudio se evaluó la actividad antimicrobiana sobre bacterias aisladas de casos de mastitis bovina y se determinó el efecto inhibitorio de *Caléndula officinalis* (Tabla 18 y 19) mostrando que los mejores resultados son para *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis* considerándolas bacterias sensibles al extracto ya que no presentaron crecimiento en ninguna de las diluciones trabajadas. *Staphylococcus aureus* presenta un nivel intermedio de sensibilidad/resistencia al tener una CMI de 1000µg/100µl. *Escherichia coli* se considera poco sensible ya que solo se ve inhibida por el extracto a su mayor concentración utilizada que es 4000µg/100µl. Estos datos obtenidos concuerdan con Alonso en 2004 <sup>(2)</sup> que menciona que debido a la riqueza en flavonoides



*Caléndula officinalis* en extracto etanólico al 80% es activa frente a *Staphylococcus aureus* pero no ocurre lo mismo frente a *Escherichia coli*, lo mismo es reportado por Muñoz en 2004. Montalvo en 2005 <sup>(36)</sup> indica en sus resultados que *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* presentan un bajo porcentaje de inhibición por *Caléndula officinalis* y la CMI mas alta que para el *Streptococcus agalactiae* y *Pseudomonas aeruginosa* que son las bacterias con las cuales trabajó. Este ensayo permite determinar que el extracto etanólico de *Caléndula officinalis* presenta importante actividad inhibitoria sobre *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis*, intermedia en *Staphylococcus aureus* y poca en *Escherichia coli*.

Es importante mencionar que *Caléndula officinalis* además de su actividad antimicrobiana puede ser importante en el tratamiento de la mastitis por su actividad anti inflamatoria como lo menciona Lastra en 1999 <sup>(30)</sup> y Hamburger en 2003 <sup>(25)</sup> que atribuyen esta propiedad a sus constituyentes triterpenoides en especial los esterres de faradiol y taraxasterol.

Actualmente no existe suficiente información acerca de *Hippocratea excelsa*. Lara Ochoa 1996 <sup>(29)</sup> menciona que entre sus principales actividades farmacológicas estudiadas es antiamebiana, antifúngica, antibacteriana, anticancerígena, antiartrítica, Cáceres 2008 <sup>(9)</sup> reporta una importante actividad contra *Giardia lamblia* y Navarrete 2002 <sup>(42)</sup> sugiere que presenta actividad gastroprotectora.

En este trabajo evaluamos la acción antibacterial contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis* las cuales fueron aisladas de casos de mastitis bovina, los resultados obtenidos nos indican que el extracto etanólico de *Hippocratea excelsa* presenta importante actividad inhibitoria sobre *Streptococcus faecalis*, su CMI es 15.6µg/100µl. Actividad intermedia contra *Escherichia coli* y *Streptococcus uberis* con una CMI de





1000µg/100µl y 2000µg/100µl respectivamente, se considera que *Staphylococcus aureus* presenta la mayor resistencia al extracto ya que solo es inhibido en concentración de 4000µg/100µl. Alanis y et. al. en 2005 <sup>(1)</sup> trabajaron con un extracto de *Hippocratea excelsa* en metanol obteniendo un porcentaje de inhibición del 51.5% para *Escherichia coli*, Lara Ochoa en 1996 <sup>(29)</sup> menciona que con un extracto de esta corteza en etanol al 96% no se presenta actividad antibacteriana representativa contra *Escherichia coli*. En este trabajo se considera que el extracto etanólico al 70% de *Hippocratea excelsa* presenta actividad inhibitoria intermedia contra *Escherichia coli*, esta contradicción se pueden deber a la diferencia en los extractos metanol y etanol, 70% y 96%. No se encontraron datos reportados acerca de trabajos anteriores contra *Streptococcus sp.* o *Staphylococcus sp.* Al igual que *Caléndula officinalis*, *Hippocratea excelsa* resulta una propuesta importante para el tratamiento de la mastitis bovina debido a que además de su actividad antibacteriana posee actividad anti inflamatoria por sus compuestos triterpenoides y esteroides principalmente, como lo indica Lara Ochoa en 1996. <sup>(29)</sup>

*Echinacea purpúrea* es una planta con múltiples acciones farmacológicas esto debido a su variada composición química Alonso 2004 <sup>(2)</sup>, además presenta elementos traza que resultan importantes en sus acciones medicinales Razic 2003 <sup>(47)</sup>. Trabajos de investigación anteriores han reportado actividad inmunomoduladora – inmunoestimulante, aumentando la capacidad de fagocitosis por parte de los macrófagos Burger y col. 1998 <sup>(8)</sup>, ayuda a activar células Natural Killer Currier 2000 <sup>(12)</sup>, actividad antiviral, inhibe la replica del rinovirus humano y para tratar desordenes bronquiales por su efecto expectorante Narimanian 2005 <sup>(40)</sup>. Se ha encontrado que ayuda al alivio y acortamiento de síntomas relacionados con patologías del tracto respiratorio superior Fugh-Berman 2003 <sup>(18)</sup> y Naser 2005. <sup>(41)</sup>



Los resultados obtenidos de la actividad inhibitoria sobre las 4 bacterias estudiadas con el extracto de *Echinacea purpúrea* son muy satisfactorios ya que *Staphylococcus aureus* es sensible a este extracto con una CMI de 250µg/100µl, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis* son muy sensibles ambos con una CMI de 15.6µg/100µl, mientras que sobre *Escherichia coli*, *Echinacea purpúrea* presenta una actividad inhibitoria intermedia con una CMI de 1000µg/100µl. Frank en 1999 <sup>(16)</sup> menciona que las propiedades bacteriostáticas y fungostáticas de *Echinacea purpúrea* se debe al equinacósido que ha demostrado esta actividad in vitro, se observa actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* según lo reportado por Alonso en 2004. <sup>(2)</sup> *Echinacea purpúrea* debido a sus acciones farmacológicas; antibacteriana, antiinflamatoria, inmunomoduladora e inmunoestimulante demuestra ser una opción viable para el tratamiento de la mastitis bovina.

Una vez que se evaluó el efecto inhibitorio de los tres extractos de manera individual se realizaron las posibles combinaciones empleando la misma metodología.

La combinación de los extractos resulta importante por diferentes razones: no todos los microorganismos son sensibles a la misma planta, proporciona la posibilidad de utilizar cantidades menores de los extractos a evaluar, una combinación puede ser más eficaz contra un microorganismo que un solo extracto. En una combinación de extractos o antibióticos en general se pueden presentar cuatro interacciones:

- Autónoma o indiferente: el resultado con dos fármacos es igual al obtenido con el más eficaz solo.
- Antagonista: el resultado con dos fármacos es significativamente peor que la mejor respuesta individual.



- Aditiva: el resultado con dos fármacos es igual a la acción combinada de cada uno por separado.
- Sinérgica: el resultado con dos fármacos es significativamente mejor que la respuesta aditiva. <sup>(28)</sup>

Para determinar si existe sinergismo, antagonismo o indiferencia entre una combinación de extractos se pueden realizar isobogramas que son representaciones gráficas en un eje de coordenadas de dosis efectivas en cada uno de los antibacterianos utilizados individualmente y de su combinación. <sup>(28, 26)</sup>. Hernández Zamora en 2008 <sup>(26)</sup> estudió el efecto de sinergismo o antagonismo del extracto de *Caléndula officinalis* y Quitosán en bacterias asociadas a infecciones en heridas en humanos empleo el método de microdilución y dilución en caldo y para evidenciar resultados empleó el Método de Mosmann, así mismo realizó los isobogramas para determinar sinergismo o antagonismo estos no presentaron una diferencia significativa en comparación a sus resultados obtenidos por el método de microdilución y dilución en caldo.

En el presente trabajo el objetivo principal no es determinar sinergismo o antagonismo, pero con los resultados obtenidos de la dilución en microplaca si podemos pronosticar una interacción de sinergismo, antagonismo, indiferencia o aditiva para las diferentes mezclas de extractos.

Al combinar los extractos de *Caléndula officinalis* e *Hippocratea excelsa* se observa notablemente que los resultados mejoran, en comparación de cuando trabajamos ambos extractos de manera separada. Una diferencia notable es para *Streptococcus uberis* que al ser tratado con *Hippocratea excelsa* presentaba una CMI de 2000µg/100µl, cuando se realizó la prueba con la combinación de



*Caléndula officinalis* e *Hippocratea excelsa* la CMI para *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis* es de 7.8µg/100µl. En *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* también se ve aumentada la sensibilidad ante esta combinación de extractos ya que anteriormente *Escherichia coli* al ser tratada con *Caléndula officinalis* presentó una CMI de 4000µg/100µl, esta disminuyó con la mezcla de extractos hasta 500µg/100µl. Para *Staphylococcus aureus* ocurre algo similar, tenía una CMI de 4000µg/100µl con *Hippocratea excelsa* que al combinar con *Caléndula officinalis* mejora a 500µg/100µl.

La combinación de *Caléndula officinalis* y *Echinacea purpúrea* proporcionó mejores resultados, para *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis*, su sensibilidad se incrementa obteniendo una CMI de 7.8µg/100µl. *Escherichia coli* presenta una CMI de 500µg/100µl como en la combinación anterior, pero *Staphylococcus aureus* aumenta su susceptibilidad al ser tratado con esta mezcla y su CMI se modifica hasta 500µg/100µl.

La mezcla de *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpúrea* resultó ser muy adecuada mejorando los resultados obtenidos en las otras dos combinaciones, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis* presentan una CMI de 62.5µg/100µl y 7.8µg/100µl respectivamente, pero la sensibilidad de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se ve aumentada notablemente ante esta nueva mezcla ya que ahora presentan una CMI de 250µg/100µl para *Escherichia coli* y 125µg/100µl para *Staphylococcus aureus*.

Al realizar la combinación de los tres extractos: *Caléndula officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpúrea*, tienen una CMI para *Escherichia coli* de 166.6µg/100µl y para *Staphylococcus aureus* 83.3µg/100µl. *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis* mostraron su alta sensibilidad con una CMI de 5.2µg/100µl, esta combinación



proporciona las CMI más bajas en  $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  para las cuatro bacterias utilizadas.

Se determinó que los extractos etanólicos de *Caléndula officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpúrea* si presentan actividad inhibitoria frente a las 4 bacterias obtenidas de casos de mastitis bovina y al obtener la CMI de cada uno de los extractos solos y combinados para los microorganismos evaluados, la interacción de sinergismo en las mezclas de los extractos es notable ya que el efecto inhibitorio muestra una evidente mejoría que se ve reflejada en las modificaciones de la CMI. Posteriormente se procede a determinar si la actividad de estas plantas es bactericida o bacteriostática.

La actividad bactericida se refiere a la acción de un fármaco que produce la muerte de más del 99.9% de las bacterias probadas. La actividad bacteriostática se refiere a la acción de un fármaco de inhibir el desarrollo visible de las bacterias probadas. <sup>(28)</sup> Se determinó que la actividad que presentan los extractos de *Caléndula officinalis*, *Hippocratea excelsa* y *Echinacea purpúrea* es bacteriostática ya que las bacterias se ven inhibidas pero hay una mínima cantidad de ellas que al ser colocadas en un medio de cultivo con condiciones de nutrimentos y temperatura óptimas presentan crecimiento.

Finalmente se realizaron observaciones en microscopio electrónico de transmisión, de 8 muestras de las cuales 4 corresponden a un control positivo no tratado de cada una de las diferentes bacterias estudiadas y las 4 muestras restantes son bacterias tratadas con los extractos como se indica a continuación:

- *Escherichia coli* + Extracto de *Hippocratea excelsa*.
- *Staphylococcus aureus* + Extracto de *Echinacea purpúrea*.
- *Streptococcus uberis* + Extracto de *Caléndula officinalis*.



- *Streptococcus faecalis* + Extracto de *Hippocratea excelsa* y *Caléndula officinalis*.

La microscopía electrónica de transmisión es una herramienta de gran utilidad en microbiología tanto para fines diagnósticos como de investigación, permite la observación detallada de las estructuras bacterianas. <sup>(70)</sup>

Para realizar la observación de los microorganismos empleamos el método de Tinción negativa, el cual emplea ácido fosfotúngstico, que tiene como elemento activo el tungsteno, por el gran peso molecular de este ácido las tinciones electrónicas denotan una gran resistencia al bombardeo del haz de electrones en el microscopio electrónico de transmisión, el ácido fosfotúngstico es un excelente colorante electrónico de tipo general y específicamente con selectividad para los componentes extracelulares como mucopolisacárido y membranas basales. <sup>(48)</sup>

Las observaciones al microscopio electrónico tienen como finalidad determinar si existe alguna alteración en las bacterias en cuanto a su morfología y estructura. Los resultados obtenidos de las observaciones en microscopía electrónica nos indican que las cepas de *Staphylococcus aureus* tratada con extracto de *Echinacea purpúrea* y *Streptococcus uberis* con *Caléndula officinalis* presentan un daño notable a nivel de pared y membrana celular.

La pared celular de una bacteria es necesaria para protegerla frente a la destrucción por presión osmótica. Los solutos están mucho más concentrados en el citoplasma bacteriano que en la mayoría de hábitats microbianos, que son hipotónicos. Durante la ósmosis, el agua se desplaza a través de membranas selectivamente permeables, como la membrana plasmática, desde soluciones diluidas a soluciones más concentradas, por eso el agua entra normalmente en las células



bacterianas. La membrana plasmática sin la presencia de la pared no podría soportar estas presiones y la célula se hincharía, alterándose físicamente y destruyéndose, proceso denominado lisis. Por el contrario en hábitats hipertónicos los solutos están más concentrados que en la célula, por ello el agua fluye hacia fuera y el citoplasma se contrae a lo que se le denomina plasmólisis. <sup>(31, 44)</sup>

*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis* presentan protoplastos, estos anteceden a la lisis de bacterias gram positivas, se forman porque la pared celular se debilita y se pierde, por lo cual el agua puede entonces entrar a la célula y esta se hincha y explota en un fenómeno de lisis. Los protoplastos se presentan en bacterias gram positivas que han perdido su pared celular y son osmóticamente sensibles, (Figura 22 y 24), al encontrarse las bacterias en un medio isotónico, la presión osmótica interna se equilibra con la externa, al perderse este equilibrio las bacterias se lisan inmediatamente. Hay dos posibles métodos por los cuales se puede destruir la pared celular, uno es el ataque al peptidoglicano, como lo hace la enzima lisozima que hidroliza el enlace que une el ácido N-acetilmurámico con el carbono 4 de la N-acetilglucosamina o por inhibición de la síntesis de nuevo peptidoglicano en células en crecimiento como es el caso de la penicilina. Estas observaciones sugieren que el posible mecanismo de acción de los extractos de *Hippocratea excelsa*, *Caléndula officinalis* y *Echinacea purpúrea* sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* sea a nivel de pared celular por la formación de protoplastos. En la cepa de *Escherichia coli* no se observa claramente que se de la formación de esferoplastos, estos son los equivalentes a los protoplastos en las bacterias gram positivas, pero en las bacterias gram negativas se les denomina esferoplastos ya que conservan parte de su pared celular en su membrana externa y son osmóticamente sensibles, anteceden a la lisis celular la cual se puede observar en la



cepa de *Escherichia coli* tratada con el extracto de *Hippocratea excelsa* (Figura 21).

*Streptococcus uberis*, al igual que *Streptococcus faecalis* en el método de dilución en microplaca y método de Mosmann resultaron ser las bacterias más sensibles a los tres extractos solos y combinados, pero a diferencia de *Streptococcus faecalis*, en *Streptococcus uberis* la formación de protoplastos no es muy evidente, lo que sugiere que tal vez el efecto del extracto de *Caléndula officinalis* sobre *Streptococcus uberis* no sea a nivel de pared celular (Figura 21) en donde no se observa daño aparente, nosotros creemos que *Caléndula officinalis* podría en esta bacteria inhibir la biosíntesis de las proteínas y/o de los ácidos nucleicos.

Se probó que los extractos etanólicos de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* presentan actividad antibacteriana in vitro contra 4 bacterias causantes de mastitis bovina *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis*, que su actividad es bacteriostática, las bacterias con mayor sensibilidad son *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis*, los resultados de inhibición mejoran notablemente al probar los extractos combinados, por lo cual representan una opción viable para el tratamiento contra la mastitis bovina causada por estas bacterias.





## 6. CONCLUSIONES.

- Logramos determinar el efecto inhibitorio del extracto de: *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, (solos y combinados) en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina utilizando el método de Mosmann y la microscopía electrónica.
- Logramos preparar tres extractos de plantas (*Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*) a base de etanol al 70%.
- Determinamos la actividad antibacterial de los extractos de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* (solos), por el método colorimétrico de Mosmann.
- Determinamos la actividad antibacterial de los extractos de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* (combinados), por el método colorimétrico de Mosmann.
- Logramos establecer la actividad bacteriostática de *Caléndula officinalis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa* (solos y combinados) en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus faecalis*, mediante una prueba cualitativa.



- El microscopio electrónico nos permitió evidenciar el daño provocado por los extractos en las bacterias estudiadas.

## 7. SUGERENCIAS.

- Nosotros sugerimos que se continúen estudiando los extractos de las plantas utilizadas, ampliando otro tipo de tinciones.



## 8. APENDICES

### 8.1 MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS.

#### MATERIAL

- Vaso de precipitados de 50, 100, 250, 500, 1000ml.
- Probeta graduada de 100, 250, 500ml.
- Matraz erlenmeyer de 250, 500, 1000ml.
- Matraz aforado de 100ml.
- Varilla de vidrio
- Embudo de vidrio
- Frasco dosificador
- Campana servidora
- Cajas petri de vidrio estériles
- Tubos de vidrio con tapón de rosca
- Frascos ámbar de 20, 50, 100, 250, 500, 1000ml.
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5, 10ml.
- Micro pipeta de 0.5, 2–10, 100 $\mu$ l.
- Termómetro
- Balanza granataria
- Mechero bunsen
- Soporte universal
- Filtro de bala
- Manguera de látex
- Espátula
- Gradilla
- Asa bacteriológica



- Puntas para micropipetas de 0.5, 2–10, 100 $\mu$ l.
- Papel filtro
- Membrana Millipore de 0.22, 0.45  $\mu$ m.
- Marcador indeleble
- Cinta adhesiva

#### EQUIPO

- Autoclave All American Modelo 1925X.
- Estufa bacteriológica Ríos Rocha S.A.
- Refrigerador IEM
- Balanza analítica
- Agitador Vortex Genie 2 Scientific Industries Modelo G560.
- Centrifuga Dynac
- Bomba de vacío Hoffmann Pinther Modelo 0210
- Horno Pasteur Ríos S.A. Modelo HS-41
- Parrilla con agitadores NOUVA II Stir Plate
- Microscopio óptico Olympus Modelo CHS
- Microscopio electrónico de transmisión
- Espectrofotómetro.



## MATERIAL BIOLÓGICO

- Bacterias aisladas de casos de mastitis bovina de la cuenca Lechera de Tizayuca Hidalgo.
  - *Escherichia coli* (251, 253)
  - *Staphylococcus aureus*
  - *Streptococcus uberis* (63, 74, 445, 670, Rugosa)
  - *Streptococcus faecalis* ( 65, 445)
- *Caléndula officinalis*
- *Echinacea purpúrea*
- *Hippocratea excelsa*

## REACTIVOS

- Etanol al 100%
- Etanol al 70%
- Agua destilada
- Cloruro de sodio
- Solución salina fisiológica estéril
- Medio BHI agar BIOXON
- Medio BHI caldo BIOXON
- Solución buffer de fosfatos PBS
- Glutaraldehído
- Dimetil sulfoxido DMSO
- MTT SIGMA M-2128



## 8.2 PREPARACION DE REACTIVOS.

- MTT

Disolver MTT en RPMI-1640 rojo de fenol, hasta una concentración de 5mg/ml.

Filtrar con membrana de 0.22µm.

Guardar a una temperatura de 4 °C, hasta su uso.

- SSF estéril

Por cada 100ml de agua destilada agregar 850mg de NaCl.

Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 libras de presión, durante 15 minutos.

- ACIDO FOSFOTUNGSTICO

El ácido es una solución al 2% ajustada al pH de 7.0 mediante NaOH 1N.



▪ GLUTARALDEHIDO- PARAFORMALDEHIDO (KARNOSKY)

Prepare una solución de amortiguador de fosfatos al 0.2M o una solución de cacodilato al 0.2N al pH 7.0.

Prepare 20ml de una solución de paraformaldehído al 10% disolviendo 2g de paraformaldehído en polvo en 20ml de agua destilada calentando a 60-70°C mientras se agita vigorosamente (en campana de extracción de gases). Agregue unas gotas de NaOH 0.2N hasta que la solución se vuelva transparente. Esperar a que se enfríe.

Ya fría la solución anterior se prepara el fijador

Amortiguador de fosfatos al 0.2M -----50ml.  
Paraformaldehído al 10% en agua -----20ml.  
Glutaraldehído al 25% en agua -----10ml.  
Agua destilada hasta volumen final de -----100ml.



## 9. REFERENCIAS

1. Alanís A. D, F. Calzada, J.A. Cervantes, J. Torres, G.M. Ceballos. (2005). **Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders.** Journal of Ethno pharmacology 100, 153-157.
2. Alonso Jorge. (2004). **Tratado de fitofármacos y nutraceuticos.** Ed. Corpus libros. Rosario Argentina.
3. Andrews Anthony. (2004). **Sanidad del ganado vacuno lechero.** Ed Acribia. Zaragoza España.
4. Bautista G. Carlos Ramón, Acosta G. Elizabeth, Toledo G. Icela. (2000). **Evaluación del bioensayo de MTT para determinar la proliferación de linfocitos de bovino, frescos y congelados.** Revista Veterinaria de México. Vol. 31, No. 2, 101-106.
5. Bedolla, CC, Castañeda, VH, Wolter, W. (2007). **Methods of detection of the bovine mastitis.** Revista electrónica de Veterinaria. Vol. VIII, N° 9.
6. Bedolla, CC, Ponce de León, MER. (2008). **Economic causalities inflicted by the bovine mastitis in the milk industry.** Revista electrónica de Veterinaria. Volumen IX Número 4.
7. Brooks Geo, Butel Janet, et al. (2002). **Microbiología médica de Jawets, Melnick y Adelberg.** Ed. Manual Moderno. México DF.
8. Burger Roger, Torres Anthony, Warren Reed, Caldwell Virgil and Hughes Bronwyn. (1998). **Echinacea induced cytokine by human macrophages.** Journal Immunopharmacobiology Vol. 19, No. 7, 371-379.
9. Cáceres David Castillo, Gonzalo J. Mena Rejón a, Roberto Cedillo-Rivera, Leovigildo Quijano. (2008). **21b-Hydroxy-oleanane-type triterpenes from *Hippocratea excelsa*.** Phytochemistry 69, 1057-1064.
10. Cerero Omelio, Castillo Julio César, Salado José. (2005). **Subclinical mastitis: detection by different diagnose techniques in bovine heris.** Revista electrónica de Veterinaria Vol. 6, No. 3.





11. Cordero S. Angélica, Georgina G. Morales. Cruz J. Gerardo, Licea V. José Antonio. (2005). Tesis Licenciatura QFB: **Reto microbiológico de extractos de Caléndula con bacterias aisladas de casos de metritis y mastitis bovina**. UNAM FES-C. México DF.
12. Currier N. L, S.C. Miller. (2000). **Natural killer cells from aging mice treated with extracts from *Echinacea purpúrea* are quantitatively and functionally rejuvenated**. Experimental Gerontology 35, 627–639.
13. Echeberria Gueracenea Juan Miguel. (2000). ***Streptococcus uberis*: Un problema creciente ¿Cómo controlarlo?**. Boehringer Inhelheim, División Veterinaria.
14. Faría R.José F., Aleida G. Urdaneta, Gerardo D'Pool, Kutchynskaya V. Leal, María A. Cagnas1 y Geovany Angelosante. (2005). **Detection of Subclinical Mastitis in Dual Purpose Bovines By Hand Milking or Milking Machine. Comparasion of Three Diagnostic Tests**. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XV, N° 2, 109-118.
15. Flores E. Marcos, Sánchez C. Mariano, Ortiz G. Felipe. (2004). **Las PQQ deshidrogenasas. Un novedoso ejemplo de Quinoproteínas bacterianas**. Revista Latinoamericana de Microbiología. Vol. 46, No. 1-2, 47-59.
16. Frank Amelio. (1999). **Botanicals a Phytocosmetic**. Ed. CRS. Madrid España.
17. Frenk Mora Julio, et al. (2001). **Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos**. Comisión permanente de la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México DF.
18. Fugh Berman Adriane. (2003). **Echinacea for the prevention and treatment of upper respiratory infections**. Seminars in Integrative Medicine, Vol 1, No 2, 106-111.
19. Gazim Z. Cristiane, Rezende M. Claudia, Fraga S. Regina, Estivaleti T. Inés, García C. Diógenes. (2008). **Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (Asteráceas) Growing in Brazil**. Brazilian Journal of Microbiology 39, 61-63.



20. Gerlier Denis and Nicole Thomasset. (1986). **Use off MTT colorimetric assay to measure cell activation.** Journal of immunological methods. 94, 57-63.
21. González Ferrara Mauricio. (2007). **Clip herbal Echinacea.** Pacalli. 44 (3): 361-66 (1994).
22. González Gallardo Sofía, Hernández Baumgarten Eliseo, et al. (2003). **Guía de microscopia electrónica.** UNAM. FES-C. México DF.
23. González González Rubí, Roque Quintero Annele, Morier Díaz Luis y Liceo de los Ángeles Rodríguez. (2006). **Evaluación de la actividad antiviral de plantas medicinales frente al virus de la hepatitis B (VHB) en células PLC/PRF/5.** Revista Cubana de Medicina Tropical Vol.58 No.2
24. Grimm Wolfram, MD, Hans-Helge Muller, PhD. (1999). **A Randomized Controlled Trial of the Effect of Fluid Extract of Echinacea Purpúrea on the Incidence and Severity of Colds and Respiratory Infections.** The American Journal of Medicine.106, 138-143.
25. Hamburger, S. Adlera, D. Baumann, A. Forgb, B. Weinreich. (2003). **Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*).** Fitoterapia 74, 328–338.
26. Hernández Zamora S., Cruz Jiménez G., Licea Vega A., Miranda Castro S., (2008). **Tesis de Licenciatura QFB: Efecto sinérgico y/o antagónico de Quitosán y extracto de *Caléndula officinalis* en bacterias comúnmente asociadas a infecciones de heridas en humanos.** UNAM FES-C. México DF.
27. Jiménez M. Eva, García L. Ángel, Algarra Ignacio, Paco Laura, Collado Antonia, and Garrido Federico. (2006). **A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in Vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation.** Biomed central 6, 119-132.
28. Koneman Elmer, Stephen Allen, et al. (2001). **Diagnostico microbiológico: Texto y atlas a color.** 5ª ed. Ed. Médica Panamericana. Madrid España.



29. Lara Ochoa y Márquez Alonso. (1996). **Plantas medicinales de México: composición usos y actividad biológica**. Ed. UNAM. México DF.
30. Lastra Valdés Humberto y Piquet García Rosario, (1999). ***Caléndula officinalis***. Revista Cubana de Farmacia. 33(3):188-94
31. Madigan Michael, Martinko John, et al. (2004). **Biología de los microorganismos**. 10ª ed. Ed. Pearson Prentice Hall. Madrid España.
32. Martínez M. David, Alvarado F. Roberto, Mendoza C. Mirna, Basurto P. Francisco. (2006). **Plantas medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México**. Sociedad Botánica de México 79, 79-87.
33. Matthias,T, R.S. Addisonb, K.G. Penmana, R.G. Dickinsonb, K.M. Bonea,c, R.P. Lehmann. (2005). ***Echinacea* alkamide disposition and pharmacokinetics in humans after tablet ingestion**. Life Sciences 77, 2018–2029.
34. Miliuskas, P.R. Venskutonisa, T.A. van Beek. (2004). **Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts**. Food Chemistry 85, 231–237.
35. Miranda Malvaez M., Cruz Jiménez G., Licea Vega A. (2006). **Tesis de Licenciatura QFB: Efecto antimicrobiano del extracto acuoso de Cuachalalate (*Amphiptrygium adstringens*) en bacterias gram (+) y gram (-) y *Helicobacter pylori***. UNAM FES-C. México DF.
36. Montalvo Paredes L., Cruz Jiménez G., Licea Vega A. (2005). **Tesis de Licenciatura QFB: Efecto inhibitorio de extracto de *Caléndula officinalis* en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina en la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo**. UNAM FES-C. México DF.
37. Muñoz Centeno Luz Maria. (2004). **Plantas medicinales españolas: *Caléndula officinalis***. Medicina Naturista 5, 257-261.
38. Murray Patrick, Rosenthal Ken, et al. (2006). **Microbiología médica**. Ed Elsevier. Madrid España.



39. Myrna Déciga, Campos, Isabel Rivero, Cruz, Myriam Arriaga, Alba, Gabriela Castañeda, Corral, Guadalupe E. Ángeles López, Andrés Navarrete, Rachel Matab. (2007). **Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine.** Journal of Ethno pharmacology 110, 334–342.
40. Narimanian, M. Badalyana, V. Panosyana, E. Gabrielyanb, A. Panossianb, G. Wikmanc, H. Wagnerd. (2005). **Randomized trial of a fixed combination (KanJangs) of herbal extracts containing *Adhatoda vasica*, *Echinacea purpúrea* and *Eleutherococcus senticosus* in patients with upper respiratory tract infections.** Phytomedicine 12, 539–547.
41. Nasera, B. Lund, H.H. Henneicke-von Zepelin, G. Kohlerc, W. Lehmacherd, F. Scaglionee. (2005). **A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical dose–response trial of an extract of *Baptisia*, *Echinacea* and *Thuja* for the treatment of patients with common cold.** Phytomedicine 12, 715–722.
42. Navarrete Andrés, José Luis Trejo-Miranda, Lino Reyes-Trejo. (2002). **Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastro protective activity.** Journal of Ethno pharmacology 79, 383–388.
43. Pérez-Carreón J.I, Cruz-Jiménez G., Licea-Vega J.A, Arce Popota E., Fattel Fazenda S., Villa-Treviño S. (2002). **Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethyl nitrosamine.** Toxicology in Vitro 16, 253–258.
44. Prescott Lansing, Klein John, et al. (2004). **Microbiología.** 5a ed. Ed. Mc Graw Hill. España.
45. Radostits O.M, Gay C.C, et al. (2002). **Medicina veterinaria: tratado de enfermedades del ganado bovina, ovino, porcino, caprino y equino.** 9ª ed. Ed. Mc Graw Hill. Madrid España.
46. Rajala P. J, Smith K. L, Hogan J. S, Love B. C. (2004). **Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from firs lactation and older cows.** Veterinary microbiology 102, 33-42.
47. Razic Slavica, Antonije Onjia, Branislav Potkonjak. (2003). **Trace elements analysis of *Echinacea purpúrea* herbal medicinal.**



- Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 33, 845-850.
48. Reyes Aguayo M., Salas Téllez E., Núñez del Arco A. (2002). **Tesis de Licenciatura QFB: Determinación de vesículas de *Actinobacillus seminis* y *Brucella ovis* mediante microscopia electrónica de barrido y transmisión.** UNAM FES-C. México DF.
  49. Roger Blowey, Weaver David. (2003). **Atlas a color de enfermedades y trastornos del ganado vacuno.** 2ª ed. Ed. Elsevier. Madrid España.
  50. Sánchez, A. Contreras, J.C. Corrales, P. Muñoz. (2004). **Influence of sampling time on bacteriological diagnosis of goat intramammary infection.** Veterinary Microbiology 98, 329-332.
  51. Santos Francisco Javier, Granados Sánchez Juan Carlos. (2000). **La medicina complementaria en el mundo.** Revista mexicana de medicina física y rehabilitación. Vol. 12, No. 4, 91-99.
  52. Saron Arthur, Marcelo Chaffer. (2000). **Mastitis y calidad de la leche.** Ed. Intermedica. Buenos Aires Argentina.
  53. Vera Viviano G., Gardea García S., Cruz Jiménez G., Licea Vega A., Mendoza Elvira S., Ciprian Carrasco A. (2006). **Tesis de Licenciatura QFB: Determinación del efecto citotóxico y/o inductor de proliferación celular del extracto de *Caléndula officinalis* y *Amphiptrygium adstringens* en dos líneas celulares evidenciado por el método colorimétrico de Mosmann.** UNAM FES-C. México DF.
  54. Wen-Wu Lia, and Wolfgang Barz. (2005). **Biotechnological production of two new 8, 40 oxynorneolignans by elicitation of *Echinacea purpúrea* cell cultures.** Tetrahedron Letters 46, 2973-2977.
  55. Wolfgang Joklik, Willet Hilda, et al. (1998). **Zinsser Microbiología.** Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina.
  56. Wolter W., Castañeda V.H., Kloppert B., y Zschoeck M. **La mastitis bovina.** (2000). Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse. Universidad de Guadalajara.



DIRECCIONES ELECTRONICAS

57. [http://vaca.agro.uncor.edu/pleche/material/babkcoc/24\\_pdf](http://vaca.agro.uncor.edu/pleche/material/babkcoc/24_pdf)
58. [http://www.iupac.org/publications7cd7medicinal\\_chemistry/](http://www.iupac.org/publications7cd7medicinal_chemistry/)
59. [http://www.agrobit.com/info\\_tecnica/Ganaderia/enfermedades/GA000009.html](http://www.agrobit.com/info_tecnica/Ganaderia/enfermedades/GA000009.html)
60. <http://aspectosbasicossobreeldesarrollodemastitis.htm>
61. <http://www.delaval.com/laglandulamamaria.htm>
62. <http://www.waste.ideal.es/calendulaofficinalis.htm>
63. <http://www.colanta.com.co/agromas/?id=news&item=258news=49>
64. <http://focosi.immunesig.org/echinacea.jpg>
65. <http://www.bolivar.udo.ve/biologia/tecnicas.htm>
66. <http://www.ciencia.net/verarticulo/Microscopio-electrico-de-transmision>
67. <http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p4-actividadmicro.pdf>
68. [http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon\\_vet\\_seccion/0,1419,SCID%2526SID%253D452,00.html](http://www.monografiasveterinaria.uchile.cl/CDA/mon_vet_seccion/0,1419,SCID%2526SID%253D452,00.html)
69. <http://www.academicos.cualtos.udg.mx/DiplomadoCalidadLeche/data/tdg/SLAC/ch.pdf>
70. [http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/vol25n1/097\\_Jurado\\_ME.pdf](http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/vol25n1/097_Jurado_ME.pdf)
71. <http://www.ohiodnr.com/dnap/prairies/prairiespecies.htm>