

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



Guatemala, marzo de 2020

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA



**Informe de Tesis**

**"Evaluación del efecto bactericida *in vitro* de los extractos de *Piper jacquemontianum* y *Piper oradendron* en patógenos del género *Streptococcus* causantes de mastitis bovina"**

Presentado por

**Sergio Javier Menchú Vanegas**

Para optar al Título de

**Químico Farmacéutico**

Guatemala, marzo de 2020

## JUNTA DIRECTIVA

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto	Decano
Licda. Miriam Roxana Marroquín Leiva	Secretaria
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal I
Dr. Roberto Enrique Flores Arzú	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Giovani Rafael Funes Tovar	Vocal IV
Br. Carol Merari Caceros Castañeda	Vocal V

## DEDICATORIA

- A Dios** Eternamente agradecido por todo, especialmente en esta ocasión por darme la oportunidad de formarme como profesional.
- A mi madre** Evelyn Lissette Vanegas Palma.  
Por acompañarme, apoyarme, motivarme y creer en mí en todo momento. Por inculcarme los valores fundamentales y fomentar en mí el bien. Por ser el ejemplo por excelencia de perseverancia, disciplina y constancia. Y por lo más importante, por su amor incondicional. Te honro en vida con este logro. Con todo mi amor.
- A mi padre** Mario Alfonso Menchú Francisco (Q.E.P.D.).  
Por recordarme que estudiar, ser profesional y disfrutar la carrera universitaria es uno de los logros más importantes que un hombre puede alcanzar. Honro tu memoria con este logro. Con amor.
- A mi hermano** Mario Alberto Menchú Vanegas.  
Por estar conmigo desde siempre y esperar lo mejor de mí para ser mejor persona. Con todo mi amor.
- A mis abuelos** Bertila Palma Aguilar. Mi segunda madre. Con amor.  
A la memoria de: Marco Tulio Vanegas López (Q.E.P.D.).  
Pascacio Menchú Hernández (Q.E.P.D.).  
Teresa Erlinda Francisco (Q.E.P.D.).
- A mis tíos** Marco Tulio Vanegas Palma, Erica Lucrecia Vanegas Palma y Edy Stuardo Vanegas Palma  
Muchas gracias por el apoyo y acompañarme en este viaje.
- A mis primos** Irving, Edy, Amy y Ralph.

## **AGRADECIMIENTOS**

- A Dios**                      Infinitas gracias por abrimme las puertas al conocimiento.
- A mi familia**                      Su apoyo incondicional, respaldo total hacia mí. Este éxito también es suyo.
- A la Universidad de  
San Carlos de  
Guatemala**                      Mi Alma Mater. La única. Por siempre. Para siempre.
- A la Facultad de  
Ciencias Químicas  
de Farmacia**                      Me siento muy dichoso de haber pasado por las aulas de esta magnífica Facultad. Seguiré las enseñanzas que aquí me compartieron y viviré la excelencia académica que se aquí me inculcaron.
- A la Escuela de  
Química  
Farmacéutica**                      Carrera noble en pro de la humanidad. Me siento muy honrado de formar parte de este gremio.
- A mi asesora**                      Dra. Sully Margoth Cruz Velásquez.  
Gracias por su asesoría a lo largo del proceso de la elaboración de mi tesis tanto en la parte teórica como en experimental.
- A mi revisora**                      Lcda. Lesbia Mengala Guerra Urizar  
Gracias por revisar minuciosamente mi tesis y por el apoyo brindado.
- Al Lic. Armando  
Cáceres**                      Por ser mi mentor en Medicina Natural y Alternativa. Además, por sus valiosas observaciones y aportes para realizar esta investigación.
- Al Lic. André Chocó**                      Por su amistad y por aportar su conocimiento en el diseño estadístico de esta investigación.

**Al Dr. Jorge Luis De  
León Arana**

Por sus apreciables observaciones realizadas en el Informe Final.

**Al equipo del  
Laboratorio de  
Investigación de  
Productos Naturales  
(LIPRONAT)**

Haber pasado por esta área me concedió explorar otra área del Químico Farmacéutico. Me permitió aprender a valorar y apreciar a los seres vivos y aprovechar sus bondades. Gracias por abrir sus puertas a los estudiantes e integrarlos como equipo.

**Al Laboratorio de  
Microbiología de la  
Facultad de  
Medicina  
Veterinaria y  
Zootecnia**

Por haberme apoyado con material e información para realizar esta investigación. Agradezco su disponibilidad y amabilidad.

**A mis profesores**

Agradezco mucho su labor docente. Gracias al conocimiento que me compartieron. Me he formado como un profesional por ustedes.

**A Ilse**

Por todo el apoyo y amor.

**A mis amigos.**

Valoro mucho su amistad. La Universidad hubiera sido muy distinta sin ustedes. Los aprecio.

**A las personas que  
ayudaron en el  
proceso**

Gracias. Por siempre estarán presentes en mí.

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
3. ANTECEDENTES .....	4
4. JUSTIFICACIÓN .....	15
5. OBJETIVOS.....	16
6. HIPÓTESIS.....	17
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
8. RESULTADOS.....	26
9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	31
10. CONCLUSIONES.....	35
11. RECOMENDACIONES .....	36
12. REFERENCIAS .....	37
13. ANEXOS.....	41

## 1. RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se exponen los resultados de la actividad bactericida de dos piperáceas en contra de estreptococos que causan mastitis en bovinos.

Se colectaron dos especies del género *Piper* procedentes de Samayac, Suchitepéquez (*P. jacquemontianum* y *P. oradendron*). Se secaron las muestras y se les realizó control de calidad a cada una de ellas por medio del porcentaje de humedad y el porcentaje de rendimiento húmedo/seco.

Al material vegetal seco se le realizó una extracción fraccionada con un solvente apolar (hexano) y uno polar (alcohol etílico). Para conocer cuál era la concentración adecuada de etanol para extraer la fracción polar de las plantas se hizo una prueba de mejor solvente.

Se secaron las muestras en una desecadora con gel de sílice hasta extraer solventes y agua.

Se prepararon los extractos para ser sometidos con agares planta a pruebas microbiológicas. La bacteria utilizada fue *Streptococcus dysgalactiae*, la cual estaba sembrada en agar sangre. Se utilizó agar Müller-Hinton en microaerobiosis para hacer crecer la bacteria con los extractos preparados de piperáceas.

Los resultados del agar planta demostraron que el extracto etanólico de *Piper jacquemontianum* y el extracto hexánico de *Piper oradendron* son efectivos como bactericidas *in vitro* contra bacterias del género *Streptococcus* causantes de mastitis bovina a concentraciones de 0.5 mg/mL y 1.0 mg/mL.

Se concluye que el extracto etanólico de *Piper jacquemontianum* a concentraciones de 0.5 mg/mL y 1.0 mg/mL y el extracto hexánico de *Piper oradendron* a 0.5 y 1.0 mg/mL son efectivos en contra de las bacterias estreptocócicas causantes de mastitis bovina. La concentración inhibitoria mínima para ambos casos fue 0.5 mg/mL para cada extracto. Este resultado puede generar mayor investigación del género *Piper* en la etnoveterinaria.



## 2. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es una enfermedad infecto-contagiosa de la glándula mamaria, en la cual la inflamación se produce como respuesta a la invasión, a través del canal del pezón, de diferentes tipos de bacterias, micoplasmas, hongos, levaduras y hasta algunos virus. Sin embargo, las bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* y algunos gérmenes Gram negativos, son responsables de más del 90 % de los casos clínicos y subclínicos.

La bacteria *Streptococcus* es el agente clásico asociado con la mastitis bovina y es altamente contagioso. Es el único representante del grupo B de Lancefield ( $\beta$ -estreptococos). Estos son, probablemente, el segundo grupo en importancia, después del *Staphylococcus aureus*, responsable de la mastitis. Aunque el *Streptococcus agalactiae*, el *Streptococcus uberis* y el *Streptococcus dysgalactiae* son las especies más frecuentemente identificadas, otras especies de estreptococos, como el *Streptococcus parasanguinis*, ha sido implicado en las infecciones de la glándula mamaria (Corbellini, C., 2015, pp. 1 y 3).

*S. dysgalactiae* y *S. uberis* se encuentran especialmente en camas orgánicas de paja o aserrín, aguas estancadas y tierra. Pueden encontrarse también en la piel de la vaca (pezón y abdomen) y en los órganos reproductores. Estos organismos son generalmente transferidos desde el medio ambiente al pezón entre los ordeños, pero algunas transferencias pueden tener lugar durante el ordeño. *S. agalactiae* es una de las bacterias contagiosas de mastitis porque comúnmente es diseminada de un cuarto infectado a otro y de una vaca a otra (Solís, M., 2007, pp. 13; López, M., 2008, pp. 12).

En Guatemala, las especies del género *Piper* crecen en las regiones cálidas tanto de la parte sur como del norte, en donde están asociadas principalmente a bosques secundarios. La taxonomía de estas especies no es clara y aparentemente varias podrían agruparse en una sola especie. A la fecha, en la Flora de Guatemala se reconocen más de 80 especies (Martínez, J., 2009, pp. 2).

Actualmente, se está tomando en consideración la terapia alternativa (homeopatía, fitoterapia, entre otras) en animales. La fitoterapia tiene grandes ventajas zootécnicas en sistemas ecológicos: a) Se adapta muy bien a los ciclos naturales y fisiología de la cría; b) Es muy eficaz, junto al manejo sanitario, para recuperar los equilibrios perdidos y normalizar la homeostasis; c) Es más económica

que la sintética y los residuos eliminados son compatibles con el medio natural; c) Se administra fácilmente a través del agua de los bebederos y/o depósitos (García-Romero, C., 2013, pp. 26).

La siguiente investigación constó en evaluar la actividad bactericida *in vitro* de los extractos etanólico y hexánico de *Piper jacquemontianum* y *Piper oradendron* en bacterias del género *Streptococcus* generadoras de mastitis en ganado bovino.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. *Piper*

Es un género que pertenece a la familia *Piperaceae*. Las especies pertenecientes a la familia *Piperaceae* frecuentemente son arbustos aromáticos, rara vez como árboles, lianas o epifitos. Sus hojas son alternas, enteras a menudo lobuladas en la base, con frecuencia la morfología foliar puede variar drásticamente en una misma planta. Los dos géneros más grandes son *Piper* y *Peperomia*, conteniendo cada uno alrededor de 1,000 especies. Las *peperomias* son en su mayoría plantas pequeñas, hierbas suculentas, epifitas a menudo; gaiteros son leñosos.

En el género *Piper* las plantas son pequeñas y sus límites son inciertos. Presentan tallos con nudos engrosados y las inflorescencias son espigas solitarias opuestas a las hojas que están dispuestas en forma alternada. Estas plantas se encuentran en una gran variedad de hábitats. Las partes vegetativas a menudo presentan aromas cuando son estrujadas.

Se caracterizan por ser arbustos o árboles más o menos leñosos, a veces con madera blanda y sub-herbácea, ocasionalmente trepadora, tallos usualmente con nudos engrosados, hojas enteras, simples alternas o lobuladas, nudosidades e inflorescencia en aumento.

La mayor diversidad de especies de *Piper* se encuentra en el Neotrópico. Unas 300 especies son endémicas al sudeste de Asia, incluyendo las islas de las Indias Orientales y el norte de Australia. Sólo dos especies son nativas de África. La mayoría de las especies de *Piper* crecen en los bosques húmedos, cálidos y lluviosos de tierras bajas.

Las plantas del género *Piper* son conocidas como “cordoncillo” y se les atribuye propiedad analgésica, antirreumática, diurética, estimulante, digestiva, antiulcerosa, antihelmíntica y bactericida; son ampliamente utilizadas para el tratamiento de vaginitis, desórdenes intestinales y como antimicrobiano.

En Guatemala, las especies del género *Piper* crecen en las regiones cálidas, en donde están asociadas principalmente a bosques secundarios. La taxonomía de estas especies no es clara y aparentemente varias podrían agruparse en una sola especie; en la Flora de Guatemala se reconocen más de 88 especies.

Las especies de *Piper* son bastante uniformes morfológicamente, con hojas simples, alternas y tallos con agrandamiento de los ganglios. Su anatomía del tallo es inusual para las dicotiledóneas. Muchos producen cuerpos de perlas en las hojas o tallos, o en el revestimiento de los pecíolos.

Una caracterización de extractos y aceites esenciales y evaluación de la actividad biológica de la hoja de *P. jacquemontianum* y *P. oradendron* demostró que ambas muestras presentan alcaloides, flavonoides, antraquinonas, saponinas, principios amargos, aceites volátiles y cumarinas. Solamente la especie *P. jacquemontianum* presentó taninos (Almeda, H., *et al*, 2014, pp. 30-32).

### 3.2. PIPERÁCEAS DEL ESTUDIO

Las especies a utilizar en esta investigación son las siguientes:

#### 3.2.1. *Piper jacquemontianum* Kunth

3.2.1.1. **Descripción botánica.** Arbusto de generalmente 2 m de alto, en ocasiones es un árbol pequeño, las ramas jóvenes son densamente hispídas o hirsutas, pecíolos de 1cm de largo o menos, algunas veces más largos en las hojas inferiores, grueso, densamente hispído o raramente glabroso; muy desigual en la base y más o menos oblicuo, usualmente redondeado o más o menos cordado en un lado y obtuso en el otro, un lado mucho más decurrente que el otro, grueso y firme, muy lustroso en el haz y con frecuencia lustroso en el envés, ligeramente más pálido en el envés, verde grisáceo o en ocasiones negruzco, glabroso en el haz, suave al tacto, hispída debajo, especialmente en los nervios, con pelos pequeños, firme al tacto.

3.2.1.2. **Hábitat y distribución.** Se encuentra en bosquesillos húmedos y secos, algunas veces en bosques de pinos a 1,600 metros o elevaciones menores. En Petén, Alta Verapaz, Baja Verapaz, Guatemala, Chimaltenango, Izabal, Zacapa, Chiquimula, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa, Escuintla, Suchitepéquez y algunas regiones de Suramérica

3.2.1.3. **Usos medicinales.** El aceite esencial de esta especie posee propiedades antibacterianas y actividad contra insectos y moluscos. La infusión preparada

con las hojas y decocción de la raíz se utiliza para tratamiento de diarrea, disentería, vómitos, úlceras. Así como para controlar hemorragias.

3.2.1.4. **Bioactividad demostrada.** El extracto etanólico tiene una amplia actividad contra microorganismos a dosis <1 mg/mL; en el tamizaje contra protozoos se encontró potente actividad contra *Plasmodium falciparum* (11 µg/mL), *Trypanosoma cruzi* (12 µg/mL) y *Leishmania mexicana* (24 µg/mL). Del extracto etanólico se prepararon particiones con hexano, cloroformo y acetato de etilo y se determinó la CIM (concentración mínima inhibitoria), encontrándose que la partición hexánica es activa contra *P. falciparum* (14 µg/mL), *T. cruzi* (24 µg/mL), *Mycobacterium smegmatis* y *Bacillus subtilis* (0.125 mg/mL), *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (0.25 mg/mL) y *Candida albicans* (0.50 mg/mL). La partición clorofórmica fue activa contra *T. cruzi* (8 µg/mL), *P. falciparum* (11 µg/mL), *B. subtilis* y *C. albicans* (0.0625 mg/mL), *M. smegmatis* (0.125 mg/mL), y *S. aureus* (0.5 mg/mL). La partición con acetato de etilo fue activa contra *P. falciparum* y *T. cruzi* (22 µg/mL), *B. subtilis* y *C. albicans* (0.0625 mg/mL), y *S. aureus* y *M. smegmatis* (0.50 mg/mL). El extracto diclorometánico tiene actividad contra *B. subtilis*, *M. smegmatis* y *Cryptococcus neoformans*. Los extractos diclorometánicos y metanólicos presentaron actividad contra *B. subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *M. smegmatis*.

3.2.1.5. **Fitoquímica.** En la hoja se encuentran presentes alcaloides. Se identificaron linalol, E-nerolidol y  $\alpha$ -pineno (Almeda, H., *et al*, 2014, pp. 37-39).

### 3.2.2. *Piper oradendron* Trelease & Standley

3.2.2.1. **Descripción botánica.** Arbusto de 1-2.5 m de altura, las brácteas tenues, densamente hispídas con pelos cortos, esparcidos en la parte superior de los entrenudos cortos; peciolos delgados, de 1-2 cm de longitud, no alados, hispídos dilatados en la base; las láminas de las hojas son delgadas, usualmente verdes o verde oscuro cuando se secan, densamente pelúcidas puntuadas, tenuemente lustrosas, ovadas o elípticas-ovadas, casi siempre de 13-18 cm de longitud y 6- 9 cm de ancho, abruptamente acuminadas, oblicuas y no

uniformes de forma conspicua en la base, usualmente acusada de un lado y obtusa o hasta redondeada en el otro, escabrosa arriba, en su mayoría glabra, generalmente suave al tacto, peninervada de tres a cuatro nervios de cada lado, ascendiendo en un ángulo menor de 45°, poco arqueados y casi rectos, pedúnculos opuestos a las hojas, robustas, aproximadamente 6mm de longitud, hispido o glabro; espigas delgadas, las inmaduras de 5-6 cm de longitud y 2 mm de grosor; brácteas densamente pubescentes.

- 3.2.2.2. **Hábitat y distribución.** Se encuentra en bosques mixtos húmedos o secos a 1,200 metros o menor elevación; endémica de Izabal, Santa Rosa, Escuintla, Guatemala, Sacatepéquez, Retalhuleu y San Marcos.
- 3.2.2.3. **Usos medicinales.** No hay información disponible.
- 3.2.2.4. **Bioactividad demostrada.** El extracto metanólico de las hojas tiene actividad antioxidante y en las raíces contiene alta cantidad de piperina.
- 3.2.2.5. **Fitoquímica.** Presenta alta cantidad de flavonoides en las hojas (Almeda, H., *et al*, 2014, pp. 39-40).

### 3.3. ESTUDIOS PREVIOS

#### 3.3.1. Estudios recientes de fitoterapia en tratamiento de mastitis bovina.

##### 3.3.1.1. "El efecto de algunos aceites esenciales naturales contra la mastitis bovina causada por *Prototheca zopfii* aislados *in vitro*" (Grzesiak, B., *et al*, 2018).

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de los aceites esenciales obtenidos de *Thymus vulgaris* L., *Origanum vulgare* L., *Origanum majorana* L., *Mentha × piperita* L. y *Allium ursinum* L. contra cepas de *Prototheca zopfii* que causan inflamación de la ubre (mastitis) en las vacas. El estudio se realizó en diez cepas derivadas de muestras de leche. El método de microdilución se usó para determinar la sensibilidad de las cepas de *P. zopfii* a los aceites esenciales estudiados y el método de difusión en disco se usó para determinar la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos antimicóticos. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C bajo condiciones aeróbicas. Todas las cepas de algas fueron sensibles a los aceites esenciales de mejorana, tomillo y orégano y resistentes a los aceites

de menta y ajo. Los valores CIM oscilaron entre 0,25 y 1  $\mu$ l/ml. El aceite de mejorana demostró la mayor actividad y el aceite de orégano la más débil. Entre los agentes antifúngicos probados, el 90% de las cepas mostraron sensibilidad a la nistatina. Una de las cepas probadas (71 / IV) fue resistente a todos los agentes antifúngicos investigados. Se sabe que los aceites esenciales probados tienen actividad antialgas y se pueden usar como agentes naturales para la profilaxis en animales, particularmente en vacas afectadas por mastitis.

### 3.3.1.2. “Actividad antibacteriana de plantas medicinales seleccionadas del noroeste de Pakistán tradicionalmente utilizada contra la mastitis en el ganado”.

Este estudio tuvo como objetivo investigar la eficacia de las plantas antimastitis usadas tradicionalmente (*Allium sativum*, *Bunium persicum*, *Oryza sativa* y *Triticum aestivum*) en el noroeste de Pakistán contra los patógenos bacterianos. Las plantas seleccionadas se analizaron fitoquímicamente para alcaloides, flavonoides y saponinas; y, se verificó su actividad antibacteriana *in vitro* a una concentración de 50 mg/ml contra *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae* mediante un método de difusión en agar. Se determinó la concentración mínima inhibitoria y la concentración bactericida mínima contra bacterias resistentes a múltiples fármacos utilizando el método de dilución por tubo. Se encontró que todos los extractos inhibían significativamente ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ) la actividad contra las cepas bacterianas examinadas. Entre los fitoquímicos, los alcaloides de todas las plantas antimastitis probadas produjeron zonas de inhibición significativamente más altas contra las bacterias. La concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima de fitoquímicos y extractos metanólicos en bruto contra las cepas bacterianas ensayadas oscilaron entre 12,5-50 mg/ml y 25-50 mg/ml, respectivamente. Las plantas medicinales utilizadas tradicionalmente contra la mastitis son terapéuticamente activas contra los patógenos bacterianos. *A. sativum* y *B.*

*persicum* resultaron ser posibles especies candidatas para el desarrollo de nuevas drogas veterinarias con bajo costo y menos efectos secundarios (Amber, R., *et al*, 2018, pp. 154).

3.3.1.3. **“Efectos antibacterianos y anti-biofilm de una fórmula polihierbal y sus constituyentes contra estafilococos coagulasa negativos y positivos aislados de mastitis bovina”.**

Las preocupaciones sobre los residuos de antibióticos en la leche y la aparición de patógenos resistentes a los antimicrobianos requieren la exploración de estrategias terapéuticas alternativas para el tratamiento de la mastitis. Este estudio tuvo como objetivo investigar las propiedades antiinfecciosas de una fórmula tradicional de un polihierbal tailandés, llamado, Ya-Sa-Marn-Phlae (YSMP), sus componentes herbales (*Curcuma longa*, *Areca catechu*, *Oryza sativa* y *Garcinia mangostana*) y constituyentes químicos representativos (catequina,  $\alpha$ -mangostina y curcuminas). Los extractos de etanol de YSMP y *G. mangostana* y  $\alpha$ -mangostina exhibieron potentes efectos antibacterianos contra *Staphylococcus* spp. aislado de vacas con mastitis y valores CIM de 1-32  $\mu\text{g/mL}$ . Estos agentes probados inhibieron la formación de biofilm de los aislados tanto en las superficies de polipropileno (hidrófobo) como de vidrio (hidrófila). El estudio indicó que YSMP tenía una fuerte actividad antibacteriana y capacidad antibiofilm contra los aislamientos probados similares a los de  $\alpha$ -mangostina y *G. mangostana*. Los efectos antiestafilocócicos se confirmaron con microscopios electrónicos de barrido y transmisión. Las principales anomalías en la microestructura de las células tratadas fueron las graves alteraciones de la pared celular con la formación de agujeros y la desorganización morfológica. Por lo tanto, se propone que *G. mangostana* es el componente activo principal de YSMP y  $\alpha$ -mangostina se puede usar como un compuesto marcador activo para YSMP que indica su actividad contra estafilococos aislados de mastitis bovina (Sasitorn C., *et al*. 2017, pp. 364).



3.3.1.4. **“Aislamiento y caracterización de tres alcaloides de la bencilisoquinolina de *Thalictrum minus* L. y su actividad antibacteriana contra la mastitis bovina”.**

Relevancia etno-farmacológica: las raíces de *Thalictrum minus* se usan tradicionalmente en el tratamiento de la inflamación y enfermedades infecciosas como la mastitis bovina. Sin embargo, no hay informes disponibles en la literatura hasta la fecha sobre los estudios antibacterianos de *T. minus* contra la mastitis bovina. El objetivo del estudio fue evaluar el potencial antibacteriano del extracto crudo de *T. minus* (raíz) y algunos de sus constituyentes aislados contra la mastitis bovina para validar científicamente su uso tradicional. Se aislaron un total de tres compuestos alcaloides del diclorometano (DCM): extracto de metanol de las raíces de *T. minus* usando cromatografía en columna de gel de sílice. La elucidación estructural de los compuestos aislados se realizó mediante el uso de técnicas espectroscópicas como la espectrometría de masas y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Los patógenos se aislaron de casos de mastitis bovina y se identificaron mediante la secuenciación del gen 16S rRNA. El método de microdilución de caldo se utilizó para evaluar las actividades antibacterianas de DCM: extracto de metanol y compuestos aislados contra patógenos de mastitis. Los tres compuestos aislados se identificaron como alcaloides bencilisoquinolínicos (1) 5'-Hidroxitallinas, (2) Thalrugosaminina y (3) O-Metiltálico. Los compuestos (2) y (3) se informan por primera vez desde las raíces de *T. minus*. Se identificaron cinco patógenos de mastitis a saber, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus equorum*, *Enterococcus faecalis* y *Pantoea agglomerans* sobre la base del análisis de secuencia de aislados usando el algoritmo BLAST de nucleótido. Este estudio informa por primera vez sobre el aislamiento y la caracterización molecular de los patógenos de la mastitis en el valle de Cachemira, India. El extracto de DCM: el metanol exhibió actividades antibacterianas de amplio espectro que

variaban entre las especies bacterianas (CIM = 250-500 mg/ml). La 5'-hidroxialisina y la talaroesaminina mostraron una actividad antibacteriana prometedora con valores de CIM de 64-128 mg/ml, mientras que las especies de *Staphylococcus* fueron las cepas más sensibles. Se concluyó que las actividades antibacterianas del DCM: extracto de MeOH y compuestos aislados apoyan el uso tradicional de *T. minus* en el tratamiento de la mastitis bovina (Mushtaq S., 2016, pp. 221).

### 3.3.2. Estudios previos con piperáceas para control/tratamiento de mastitis bovina

Se realizó un estudio donde se evaluaron 6 plantas medicinales para tratar mastitis en vacas lecheras, entre esas plantas se encuentra *Piper jacquemontiaum*. Los extractos metanólico y diclorometánico fueron evaluados frente a distintas bacterias causantes de mastitis bovina. Hubo resultados inhibitorios para estos extractos (López, M., 2009, pp. 21).

### 3.3.3. Estudios realizados en Guatemala con piperáceas en animales

Un estudio realizado en la Facultad de Veterinaria y Zootecnia demuestra que los extractos metanólico (MetOH) y diclorometánico (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) de *Piper jacquemontianum* poseen actividad bactericida frente a distintos patógenos causantes de otitis canina, tanto la cepa de piel como cepa de oído.

Las cepas a evaluar fueron *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, y de pioderma canina: *S. intermedius*, *Streptococcus* sp. El extracto metanólico de *Piper jacquemontianum* presentó actividad contra todas las bacterias a las que se enfrentó, mientras que el extracto diclorometánico presentó actividad únicamente contra las bacterias Gram positivo (Chávez, J., 2010, pp. 18 y 27).

Esto puede ser un indicativo que los extractos apolares y polares de *Piper jacquemontianum* tengan actividad terapéutica en vacas con mastitis. Es probable que *Piper oradendron* posea actividad medicinal para la misma patología.

### 3.4. EXTRACCIÓN Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Cuando se realizan investigaciones para buscar o confirmar una actividad biológica es importante la determinación de los constituyentes químicos de la planta. El escrutinio fármaco químico constituye el marco de referencia convencional para el estudio de los principios activos de plantas medicinales. Este enfoque se enmarca en la extracción y fraccionamiento bioguiado el cual consiste en la preparación de extractos crudos, fracciones obtenidas a partir de dichos extractos y la evaluación de su bioactividad.

3.4.1. **Extracción.** Para la investigación fitoquímica y farmacológica es necesario realizar extracciones reproducibles, cuantitativas, estables y eficientes para el efecto que se desea demostrar. La extracción para tamizaje consiste en realizar una extracción con disolventes de diferentes polaridades; generalmente, diclorometano o hexano, éter, metanol, etanol y agua. Por la toxicidad y efectos farmacológicos de estos disolventes es preciso concentrar los extractos evaporando el disolvente a presión reducida y temperatura controlada (rotavapor) hasta alcanzar un estado de miel. En el caso de los extractos acuosos se suele concentrar por medio de liofilización. En esta forma los extractos son más estables y fáciles de almacenar y dosificar.

#### 3.4.2. Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro*

La actividad antimicrobiana es empleada para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia de la sustancia, la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas de una droga de origen vegetal, el espectro de microorganismos inhibidos y la concentración de la droga en el organismo humano. Es indispensable en la evaluación de la actividad antimicrobiana conocer y controlar las condiciones de laboratorio del modelo microbiano, tanto en procedimientos *in vivo* como *in vitro*.

Factores como la composición y el pH del medio, el método de extracción, la solubilidad de la muestra en el medio de cultivo y los microorganismos utilizados en la prueba pueden hacer variar los resultados, por lo que es difícil establecer un método estandarizado para el estudio de la actividad antimicrobiana de las plantas medicinales.

La determinación de la actividad antimicrobiana puede dividirse en dos fases: tamizaje y concentración mínima inhibitoria. Este último procedimiento se realiza únicamente con los microorganismos cuyo crecimiento fue inhibido por el extracto en la primera fase. Se evalúa si hubo crecimiento, una completa supresión del crecimiento es requerida para declarar que el extracto es activo. Los extractos que son activos deben ser probados nuevamente para confirmar los resultados. Para evitar confusiones en la interpretación de resultados provocadas por probable contaminación durante la preparación del medio de cultivo deben colocarse dos cajas de control positivo por lote de pruebas. Adicionalmente, para los casos en los que hubo crecimiento es posible evaluar de nuevo la actividad a distintas concentraciones.

Generalmente la medición de la actividad antimicrobiana se realiza por medio del método de difusión o el método de dilución. La selección del método depende de las necesidades del investigador, las cuales han hecho que los métodos sufran modificaciones con el fin de optimizar las técnicas empleadas y por consiguiente obtener resultados confiables.

**3.4.2.1. Método de dilución en agar.** Se basa en el crecimiento exponencial de bacterias susceptibles inoculadas en medios de cultivo adecuados. La bacteria es inhibida por las moléculas bioactivas diluidas en el agar. Este procedimiento ofrece una distribución homogénea del compuesto en el agar. En este método, una cantidad conocida de muestra es diluida en agar, siendo indispensable la dispersión homogénea de la muestra en agua.

El método de dilución se emplea para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se requiere del agente antimicrobiano para inhibir o matar al microorganismo, es decir, la CIM es la concentración más baja en la que no hay crecimiento visible, esta prueba puede ser en caldo (tubo) y en agar (placa). Se ha utilizado principalmente para determinar los valores de CIM de un extracto, aceite esencial o sustancia pura; así

como, para el tamizaje preliminar de la actividad antimicrobiana. Además permite evaluar la CIM usando diluciones decrecientes del extracto.

El método de dilución es el único método para determinar el mínimo de concentración bactericida (CMB). El CMB es determinado por subcultivos de los tubos con inhibición en un plato de agar o en medio líquido, cuando el microorganismo no crece, la muestra es un microbicida. La dilución en medio líquido es la técnica más complicada pero también la más precisa. Se interpreta como resultado positivo, la ausencia del crecimiento de microorganismo.

El método de dilución sólido, es parecido al método de dilución en líquido. Este método es rápido y la CIM de un producto puede ser determinada contra seis microorganismos a la vez. Este método permite la inoculación de aproximadamente 20-25 microorganismos en platos estandarizados. El método de dilución en agar establece la cantidad de muestra necesaria, la cual no debe ser mayor de 1 mg de muestra en 1 mL del medio de cultivo. Las muestras activas son reensayadas a una concentración de 0.1 mg/mL.

Las ventajas de este método son su simplicidad, sensibilidad, reproducibilidad, rapidez, facilidad de estandarizar y procesar gran cantidad de muestras; además, ofrece la posibilidad de usarlo en el estudio de antimicrobianos solubles en agua o muestras insolubles como aceites esenciales. También pueden ser sembrados hasta seis microorganismos en una caja de Petri.

**3.4.2.2. Microorganismos.** La Facultad de Veterinaria proveerá la cepa de *Streptococcus dysgalactiae* para la realización del estudio.

#### 4. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los métodos modernos establecidos para el control de la mastitis bovina, esta es una de las mayores causas de serias pérdidas económicas en la producción lechera, sufrimiento animal, efectos negativos en la calidad de leche, y reducción en la higiene del producto. Es considerada una enfermedad altamente prevalente en el ganado lechero, y es una de las más importantes que afecta mundialmente la industria lechera; pues ocasiona pérdidas económicas muy fuertes a todos los productores de leche en el mundo debido a la disminución de la calidad y cantidad de leche producida y un aumento en los costos de tratamiento y servicios veterinarios, así como pérdida de animales (Ruiz, A., et al, 2011, pp. 58).

Es un problema agrícola, el cual conlleva al uso de antibióticos para erradicar a los patógenos causantes. La leche de los mamíferos es un medio de excreción de antibióticos, los cuales pueden alterarla y tener efectos negativos en el consumidor (como alergias) y/o en la naturaleza de la leche. Considerando que la leche vacuna es consumida por los habitantes de Guatemala, esto puede causar problemas de salud en los consumidores (Díaz, D., Pena, G., 2016; Fernández, O., et al, 2012, pp. 1; Kirk, J., Mellenberger, R., 1990, pp. 2; López, M., 2008, pp. 12 y 14).

La utilización de un método alternativo de origen vegetal a los antibióticos es un campo casi inexplorado. De forma tópica, se utilizan los aceites esenciales de eucalipto, wintergreen y *Aloe vera* en vacas lecheras para tratar la mastitis (Chávez, L., Murguía, A., 2014, pp. 1-2). Además, se utilizan otros tratamientos etnoveterinarios que están siendo documentados paulatinamente. No existen estudios disponibles aún sobre la aplicación terapéutica de extractos de piperáceas para el tratamiento de mastitis bovina.

Las plantas del género *Piper* están distribuidas ampliamente en el país, debido a su clima tropical y subtropical. Estas plantas poseen diversas propiedades farmacológicas que las hacen adecuadas para validar su uso medicinal (Martínez, J., 2009, pp. 1-2). La validación puede efectuarse tanto en humanos como en animales.

El empleo de los extractos de *Piper jacquemontianum* y *Piper oradrendon* puede contribuir a la sustitución paulatina de los antibióticos para el tratamiento de la mastitis bovina, en caso que estos extractos tengan actividad bactericida contra estreptococos que producen mastitis bovina.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GENERAL

5.1.1. Evaluar *in vitro* las propiedades bactericidas de los extractos de *Piper jacquemontianum* y *Piper oradendron* en estreptococos que producen mastitis bovina.

### 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1. Determinar el efecto bactericida de los extractos hexánico y etanólico de *Piper jacquemontianum* y *Piper oradendron* contra *Streptococcus dysgalactiae*.

5.2.2. Establecer la concentración mínima inhibitoria (CIM) de los extractos del estudio que posean actividad bactericida.

## 6. HIPÓTESIS

Al menos un extracto (hexánico o etanólico) obtenido de *Piper jacquemontianum* o *Piper oradendron* tiene actividad bactericida *in vitro* en contra de bacterias causantes de mastitis bovina del género *Streptococcus*.



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. UNIVERSO Y MUESTRA

7.1.1. **Universo (población):** Extractos de plantas del género *Piper*

7.1.2. **Muestra:** Extractos hexánicos y etanólicos de *Piper jacquemontianum* y *Piper oradendron*

### 7.2. MATERIALES

#### 7.2.1. Vegetal

7.2.1.1. *Piper jacquemontianum*

7.2.1.2. *Piper oradendron*

#### 7.2.2. Biológico

7.2.2.1. *Streptococcus dysgalactiae*

#### 7.2.3. Materiales y equipo

7.2.3.1. Algodón

7.2.3.2. Asa de nicromo en argolla

7.2.3.3. Autoclave

7.2.3.4. Balanza analítica

7.2.3.5. Bata de laboratorio

7.2.3.6. Cajas de Petri simples

7.2.3.7. Campana bacteriológica

7.2.3.8. Campana bacteriológica con flujo laminar

7.2.3.9. Campana de extracción

7.2.3.10. Crisol para evaporación

7.2.3.11. Cristalería de laboratorio

7.2.3.12. Desecador

7.2.3.13. Estufa

7.2.3.14. Etiquetas de identificación

- 7.2.3.15. Guantes
- 7.2.3.16. Horno de secado
- 7.2.3.17. Incubadora a 36 °C
- 7.2.3.18. Mascarilla
- 7.2.3.19. Mechero
- 7.2.3.20. Papel filtro
- 7.2.3.21. Percolador
- 7.2.3.22. Pinzas
- 7.2.3.23. Pipetas automáticas
- 7.2.3.24. Plantilla para siembra
- 7.2.3.25. Puntas amarillas de 200 µL
- 7.2.3.26. Puntas azules de 1000 µL
- 7.2.3.27. Recipiente con boquilla regulable en la parte inferior
- 7.2.3.28. Recipiente para empapado de plantas
- 7.2.3.29. Recipientes para recuperar los extractos
- 7.2.3.30. Refrigeradora
- 7.2.3.31. Rotavapor con baño de calentamiento y recirculación de agua fría
- 7.2.3.32. Tamizador No. 5
- 7.2.3.33. Tijeras
- 7.2.3.34. Tubos con tapón de rosa de 15 ml
- 7.2.3.35. Varilla de agitación

#### **7.2.4. Medios de cultivo**

- 7.2.4.1. Agar Müller-Hinton
- 7.2.4.2. Caldo Trypticase-Soya

#### **7.2.5. Reactivos**

- 7.2.5.1. Agua destilada
- 7.2.5.2. Disolventes
  - 7.2.5.2.1. Dimetilsulfóxido
  - 7.2.5.2.2. Etanol con concentraciones al 30%, 50%, 70% y 90%

7.2.5.2.3.Hexano

7.2.5.3. Solución salina estéril

### **7.3. MÉTODOS**

#### **7.3.1. Selección de especies**

7.3.1.1. Especies nativas del género *Piper*.

7.3.1.2. Originarias de la misma área geográfica en Suchitepéquez.

#### **7.3.2. Obtención y colecta de material vegetal**

7.3.2.1. *Piper jacquemontianum* y *Piper oradendron* proceden de la Finca de FARMAYA, S.A. (Samayac, Suchitepéquez). Dichas plantas son colectadas e identificadas por el Lic. Armando Cáceres.

#### **7.3.3. Secado**

7.3.3.1. El proceso empieza con el secado a la sombra y utilización del horno de secado a 40 °C del Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia hasta obtener un porcentaje de humedad menor o igual al 10%.

#### **7.3.4. Tamizado**

7.3.4.1. Con tamiz No. 5 otorgado por el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT). Posteriormente, se pesa y rotula con el nombre de la especie, órgano, porcentaje de humedad, procedencia, peso y fecha.

#### **7.3.5. Prueba de mejor solvente**

7.3.5.1. Preparar 100 ml de las siguientes concentraciones de etanol: 30%, 50%, 70% y 90%.

7.3.5.2. Seleccionar 4 recipientes de boquilla regulable y colocar un trozo de algodón en la parte inferior de cada recipiente (cada recipiente seleccionado corresponderá a cada concentración de etanol).

- 7.3.5.3. Colocar un cono de papel filtro dentro de cada recipiente con boquilla regulable.
- 7.3.5.4. Pesar 1 g de materia vegetal en balanza analítica y colocarla dentro del papel filtro.
- 7.3.5.5. Cubrir totalmente el material con el solvente a utilizar, aproximadamente 20 ml de solvente.
- 7.3.5.6. Tapar cada recipiente a manera de asegurar que no se evaporará el solvente contenido en su interior.
- 7.3.5.7. Dejar en reposo la materia vegetal con el solvente por 24 horas.
- 7.3.5.8. Seleccionar 4 cápsulas y colocarlos en horno desecador 1 hora a 110 °C, esperar que baje la temperatura del horno a 50 °C y pasar las cápsulas a la desecadora, dejarlos en la desecadora por unos 20 minutos para que lleguen a temperatura ambiente.
- 7.3.5.9. Recibir en beackers cada una de las tinturas.
- 7.3.5.10. Pesar las cápsulas con tintura. En una estufa, dentro de la campana, evaporar el disolvente a llama directa hasta que se elimine toda la tintura sin que se queme.
- 7.3.5.11. Colocar las cápsulas en el horno desecador 1 hora a 110 °C, esperar que baje la temperatura del horno a 50 °C y pasar las cápsulas a la desecadora, dejarlos en la desecadora por unos 20 minutos para que lleguen a temperatura ambiente.
- 7.3.5.12. Pesar las cápsulas y calcular la cantidad de sólidos totales.
- $$\%de\ sólidos = \left( \frac{Peso\ final - tara}{Peso\ de\ la\ tintura} \right) (100\%)$$
- 7.3.5.13. El solvente que presente un mayor porcentaje de sólidos totales, es el que se considera como mejor solvente.
- 7.3.5.14. Limpiar todo lo empleado y ordenado. (LIPRONAT, 2014, pp. 1-3).

### **7.3.6. Extracción fraccionada**

#### **7.3.6.1. Preparación de la planta**

- 7.3.6.1.1. Colocar la planta previamente molida dentro de un recipiente resistente al disolvente a utilizar
- 7.3.6.1.2. Añadir la cantidad necesaria de disolvente para remojar la planta antes de colocarla en el percolador.
- 7.3.6.1.3. Dejar reposar 24 horas.

#### **7.3.6.2. Preparación del percolador**

- 7.3.6.2.1. Lavar y secar el percolador a utilizar.
- 7.3.6.2.2. Colocar una tapa de algodón en la parte inferior del percolador.
- 7.3.6.2.3. Colocar sobre el algodón un pedazo de papel filtro en forma de cono.
- 7.3.6.2.4. Colocar dentro del percolador la planta molida y empapada según el paso 6.3.6.1.
- 7.3.6.2.5. Agregar el mismo disolvente para completar el volumen (disolvente apolar), el disolvente debe quedar 5 cm sobre la planta.
- 7.3.6.2.6. Agitar suavemente para acomodar la planta.
- 7.3.6.2.7. Tapar el percolador y dejar reposar 24 horas.

#### **7.3.6.3. Recuperación y concentración de la tintura**

- 7.3.6.3.1. Abrir la llave del percolador con un goteo intermedio y recibir en un recipiente adecuado o directamente en el balón de concentración del rotavapor.
- 7.3.6.3.2. Colocar el balón de concentración en el rotavapor.
- 7.3.6.3.3. Marcar la temperatura y presión adecuadas según el disolvente que se está utilizando.
- 7.3.6.3.4. Accionar el rotavapor según el PEO específico, recuperar el disolvente y agregarlo de nuevo al percolador, repetir el proceso anterior. Esto se conoce como fracción I.

7.3.6.3.5. Realizar dos veces este proceso o según se requiera en la investigación particular.

7.3.6.3.6. Si es una extracción exhaustiva se harán extracciones cuantas veces sea necesario hasta que el efluente obtenido sea incoloro, lo que indica que se ha agotado el material.

7.3.6.3.7. Destapar el percolador 24 horas para que se evapore el disolvente que haya quedado.

7.3.6.3.8. Agregar el segundo disolvente menos polar y repetir el proceso anterior. Esto se conoce como fracción II.

7.3.6.3.9. Hacer de la misma forma con todos los disolventes a utilizar, e ir numerando las fracciones obtenidas (LIPRONAT, 2013, pp. 1-2).

### **7.3.7. Tamizaje de la actividad antibacteriana *in vitro***

#### **7.3.7.1. Procedimiento**

7.3.7.1.1. En la balanza analítica pesar 30 mg de extracto a ensayar y disolverlo en 3 ml de etanol al 50% (hacer cálculos para determinar el volumen de extracto necesario para realizar el ensayo).

7.3.7.1.2. Agitar en un vortex hasta que esté bien disuelto. Si no se disuelve utilizar un sonificador. En el caso de extractos con disolventes apolares agregar 25  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO).

7.3.7.1.3. Filtrar el extracto.

#### **7.3.7.2. Filtración del extracto**

7.3.7.2.1. Trabajar la filtración en la campana de flujo laminar (previamente limpia, ver PEO de limpieza de campana).

7.3.7.2.2. Aspirar el extracto utilizando una jeringa estéril de 5 ml.

7.3.7.2.3. Desenroscar la aguja y enroscar en la jeringa el filtro de 0.45  $\mu$ m de diámetro.

7.3.7.2.4. En un frasco estéril recibir el filtrado haciendo pasar la dilución del extracto por el filtro lentamente.

#### 7.3.7.3. Preparación del agar planta

7.3.7.3.1. Preparar tubos con 9.0 ml de agar Müller-Hinton (dos tubos por cada extracto o compuesto a trabajar). Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos, dejar enfriar a 50 °C. En una caja de Petri simple agregar 1.0 ml de la solución del extracto filtrado (este debe tener una concentración de 10 mg/ml) y los 9 ml de agar Müller-Hinton. Tapar la caja y homogenizar con movimientos circulares. La concentración final que se obtiene es de 1 mg/ml.

7.3.7.3.2. Dejar solidificar e incubar a 36 °C por 24 horas, para comprobar esterilidad.

7.3.7.3.3. Guardar en refrigeración hasta el momento de usar.

#### 7.3.7.4. Preparación del inóculo

7.3.7.4.1. Purificar el microorganismo (*Streptococcus dysgalactiae*) a ensayar inoculándolo en una caja de Petri con agar tripticasa-soya, incubar 36 °C durante 24 horas.

7.3.7.4.2. Inocular una asada del cultivo puro microbiano en un tubo con 5.0 ml de caldo tripticasa-soya, incubar a 36 °C durante 24 horas.

7.3.7.4.3. Diluir 0.05 ml de la suspensión anterior en 4.95 ml de solución salina estéril al 0.85% (dilución 1:100).

#### 7.3.7.5. Demostración de la actividad antibacteriana

7.3.7.5.1. Inocular en las cajas con agar-planta una asada de cada uno de los microorganismos siguiendo el patrón de la plantilla. Hacer cinco repeticiones por microorganismo.

Dejar reposar 5-10 minutos e incubar a 36 °C durante 24 horas.

7.3.7.5.2. Utilizar como control negativo 9 ml de agar Müller-Hinton mezclándole 1 ml de etanol al 50 %.

#### 7.3.7.6. Interpretación de resultados

7.3.7.6.1. Actividad negativa: crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

7.3.7.6.2. Actividad positiva: no hay crecimiento homogéneo a lo largo del inóculo.

7.3.7.6.3. Contaminación: presencia de microorganismos fuera de la inoculación (LIPRONAT, 2013, pp. 1-3).

## 7.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

7.4.1. Tipo de estudio: Prueba binomial.

7.4.2. Variables

7.4.2.1. Variable dependiente: actividad bactericida de los extractos hexánicos y etanólicos de dos plantas *Piper jacquemontianum* y *Piper oradendron*.

7.4.2.2. Variable independiente: tipo de extracto (hexánico y etanólico) y plantas *Piper* (*P. jacquemontianum* y *P. oradendron*).

#### 7.4.3. Análisis estadístico

Según la prueba binomial, si se tienen 3 repeticiones (3 éxitos) hay cumplimiento.



## 8. RESULTADOS

La colecta de las muestras vegetales fue realizada en la Ecoparcela El Kakawatal, Samayac, Suchitepéquez, latitud 14°33'06.3"N y longitud 91°27'57.9"O. Se colectaron aproximadamente 1 Kg de cada una de las piperáceas del estudio.

En la **Tabla 1** se observa que el porcentaje de rendimiento de *Piper jacquemontianum* fue menor con respecto al porcentaje de rendimiento de *Piper oradendron*. El porcentaje de humedad de las muestras colectadas fue medido posteriormente a su secado en hornos de convección.

**Tabla 1**

Porcentaje de Rendimiento y Humedad de Hojas secas de *Piper jacquemontianum* y *Piper oradendron*

Descripción	<i>Piper jacquemontianum</i>	<i>Piper oradendron</i>
Peso de la muestra húmeda (Kg)	1.45	1.97
Peso de muestra seca (g)	347.89	374.21
Peso de hojas exclusivamente (g)	331.00	350.70
Porcentaje de rendimiento (%)	<b>21.92</b>	<b>17.80</b>
Porcentaje de humedad (%)	<b>8.60</b>	<b>9.40</b>

*Fuente:* Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

En la **Tabla 2** se visualiza que el mejor disolvente para realizar la extracción fraccionada de compuestos polares es el etanol al 50%. No obstante, existe diferencia mínima entre la extracción con etanol al 70%. Por lo cual, se optó por utilizar el etanol al 70% para extraer los compuestos polares.

**Tabla 2**Prueba de Mejor Disolvente para *Piper jacquemontianum*

Porcentaje de etanol (%)	Material vegetal seco (g)	Cápsula/ Tara (g)	Tintura (g)	Cápsula		PORCENTAJE DE RENDIMIENTO (%)
				con residuo (g)	Residuo (g)	
30	1.00	38.46	1.01	38.47	0.0017	0.17
50	1.00	45.46	0.91	45.46	0.0036	<b>0.40</b>
70	1.00	36.30	0.92	36.30	0.0033	0.36
90	1.00	30.73	1.00	30.74	0.0025	0.24

*Fuente:* Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

En la **Tabla 3** se observa que la concentración del disolvente etanol más efectiva para extraer compuestos polares de *Piper oradendron* fue al 70%, con 0.22%.

**Tabla 3**Prueba de Mejor Disolvente para *Piper oradendron*

Porcentaje de etanol (%)	Material vegetal seco (g)	Cápsula/ Tara (g)	Tintura (g)	Cápsula		PORCENTAJE DE RENDIMIENTO (%)
				con residuo (g)	Residuo (g)	
30	1.00	40.16	1.00	40.16	0.0001	0.01
50	1.00	72.33	1.01	72.33	0.0003	0.03
70	1.00	24.54	1.00	24.55	0.0022	<b>0.22</b>
90	1.00	51.53	1.00	51.53	0.0012	0.12

*Fuente:* Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

La extracción fraccionada de los compuestos apolares y polares de *Piper jacquemontianum* fue efectuada con los siguientes disolventes: hexano y etanol al 70%, respectivamente, y En la **Tabla 4** se observa que el rendimiento obtenido fue de 1.95% para el extracto hexánico y 20.00% para el extracto etanólico.

**Tabla 4**

Extracción Fraccionada de *Piper jacquemontianum*

Peso (g)	Solvente	Peso de extracto	Rendimiento (%)
100.00	Hexano	1.95	1.95
	Etanol 70%	20.00	20.00

*Fuente:* Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

La extracción fraccionada *Piper oradendron* se realizó con etanol al 70% y hexano. Se obtuvo mayor rendimiento con etanol al 70% en comparación con la extracción con hexano. Esto denota que hay mayores compuestos con afinidad polar que apolar. En la **Tabla 5** se visualiza que el extracto etanólico tuvo un rendimiento de 26.00% y el extracto hexánico 1.13%.

**Tabla 5**

Extracción Fraccionada de *Piper oradendron*

Peso (g)	Solvente	Peso de extracto	Rendimiento (%)
100.00	Hexano	1.13	1.13
	Etanol 70%	25.96	26.00

*Fuente:* Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

En la **Tabla 6** se observa que el extracto etanólico de *Piper jacquemontianum* inhibió el crecimiento *Streptococcus dysgalactiae* a una concentración de 1 mg/mL. Del mismo modo, el extracto hexánico de *Piper oradendron* tuvo actividad bactericida a la misma concentración. El ensayo se realizó por medio de un sistema de microaerobiosis y agar Müller-Hinton.

**Tabla 6**

Prueba de Agar Planta de Extractos Etanólicos y Hexánicos de *Piper jacquemontianum* y *Piper oradendron* a Concentración de 1 mg/mL

Planta	Solvente	Crecimiento	Cumple (Sí/No)
<i>Piper jacquemontianum</i>	<b>Etanol</b>	<b>(-)</b>	<b>Sí</b>
	Hexano	(+)	No
<i>Piper oradendron</i>	Etanol	(+)	No
	<b>Hexano</b>	<b>(-)</b>	<b>Sí</b>

*Fuente:* Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó a los extractos que inhibieron el crecimiento de *Streptococcus* sp. a la concentración de 1 mg/mL.

En la **Tabla 7** se observa que para el ensayo de la CIM, las concentraciones a las que se tuvo actividad bactericida para el extracto etanólico de *Piper jacquemontianum* fueron al 0.50 mg/mL y a 1 mg/mL. Hubo crecimiento bacteriano a 0.25 mg/mL.

**Tabla 7**Concentración Inhibitoria Mínima del Extracto Etanólico de *Piper jacquemontianum*

Disolvente	Concentración (mg/mL)	Crecimiento	Cumple (Sí/No)
Alcohol Etílico al 70%	0.25	(+)	No
	0.50	(-)	Sí
	1.00	(-)	Sí

*(+) Crecimiento: No cumple**(-) Inhibición: Cumple*

*Fuente:* Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

En la **Tabla 8** se visualiza que la CIM para el extracto hexánico de *Piper oradendron* fue de 0.50 mg/mL. Asimismo, a concentración de 1.00 mg/mL tiene efecto bactericida en contra de estreptococos causantes de mastitis en vacas.

**Tabla 8**Concentración inhibitoria mínima del extracto hexánico de *Piper oradendron*

Disolvente	Concentración (mg/mL)	Crecimiento	Cumple (Sí/No)
Hexano	0.25	(+)	No
	0.50	(-)	Sí
	1.00	(-)	Sí

*(+) Crecimiento: No cumple**(-) Inhibición: Cumple*

*Fuente:* Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

## 9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La mastitis bovina es una patología que posee etiología, factores de riesgo, sintomatología, clasificación, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento que son específicos e importantes para su prevención y control (**anexo I**).

En esta investigación se emplearon extractos apolares (hexánicos) y polares (etanólicos) de plantas del género *Piper* (*Piper jacquemontianum* y *Piper oradendron*) para comprobar la actividad bactericida. Todo el proceso de obtención de los extractos y los procedimientos subsiguientes fueron realizados en las instalaciones del Departamento de Fitoquímica y en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

El primero paso fue obtener el material vegetal. Las muestras fueron colectadas en la Ecoparcela El Kakawuatal, Samayac, en el departamento de Suchitepéquez, Guatemala. Las muestras fueron secadas en horno de convección hasta lograr un porcentaje de humedad <10%, el cual es un porcentaje óptimo para conservar la muestra y evitar su descomposición (**figura 1, 2 y 3**). Como parte del control de calidad de las plantas, se les realizó prueba de humedad (%) y rendimiento (%). En la **tabla 1** se observa que el porcentaje de humedad de *P. jacquemontianum* fue de 8.60% (**figura 4**) y para *P. oradendron* fue 9.40% (**figura 5**). El porcentaje de humedad es la cantidad de agua libre que contiene el material vegetal para su buena conservación. Si el porcentaje es mayor al 10% hay una mayor posibilidad de que los principios activos de la planta puedan sufrir degradación por medio de hidrólisis y exista crecimiento de microorganismos (Flores, I., 2017, pp. 49).

El rendimiento que tuvieron las plantas desde que fueron colectadas hasta que se secaron en el horno se puede representar por medio de porcentaje. Antes de realizar este cálculo, se limpiaron las muestras para extraer las flores y tallos para dejar solamente las hojas. Las hojas son el órgano vegetal de estudio. Éstas fueron tamizadas (**figura 6**). En la **tabla 1** se puede observar que *P. jacquemontianum* tuvo un rendimiento del 21.92% y *P. oradendron* 9.40%.

El segundo paso fue la extracción fraccionada (**figura 7**). Se necesitaban extraer dos fracciones, una polar y una apolar. Para la fracción polar se usó un disolvente de naturaleza general, de alta polaridad, (alcohol etílico). Para la segunda fracción se empleó un disolvente selectivo, de menor polaridad, (hexano) que sólo extrae de la planta las grasas vegetales y otros componentes apolares. Cuando la droga se pone en contacto con el disolvente se inicia un proceso opuesto al proceso de secado que tiende a reconstituir el estado original de la célula. Inicialmente el disolvente penetra en la célula vegetal y expulsa el aire contenido en el citoplasma, dándose inicio de forma al proceso extractivo. La penetración del disolvente en la célula induce un momento bipolar en las moléculas de los compuestos que van a ser extraídos. Es de esta manera como las sustancias extraíbles se adhieren a las moléculas del disolvente (Tení, D., 2008, pp. 18).

Para conocer la concentración de etanol adecuada para la extracción fraccionada se usó la prueba de mejor disolvente con etanol al 30, 50, 75 y 90%. Después de macerar durante 24 horas en percoladores pequeños, por medio de un porcentaje de rendimiento se calculó la cantidad de residuo que quedaba al incinerar la tintura. La tintura que tuviera mayor residuo, era la concentración adecuada para el ensayo.

En la **tabla 2** y **figura 8** se determinó que la concentración con mayor residuo era el etanol al 50% para *P. jacquemontianum* con 0.40% de rendimiento.

En la **tabla 3** y **figura 9** se comprobó que la cantidad mayor cantidad de residuo era el etanol al 70% para *P. oradendron*, con 0.22% de rendimiento.

El porcentaje residuo de las tinturas de *P. jacquemontianum* descritos en la **tabla 2** con concentraciones de etanol al 50% fue 0.40% y etanol al 70% fue 0.36%. Se estableció que la concentración de etanol a usar como solvente tanto para *P. jacquemontianum* como *P. oradendron* debía ser alcohol etílico al 70%. La decisión fue tomada en base a la diferencia poco significativa del porcentaje de residuo entre el etanol al 50% y el etanol al 70%.

En el proceso de extracción fraccionada se lavó 3 veces el percolador con hexano para obtener la fracción apolar. El solvente fue extraído con rotavapor (**figura 10** y **11**). Después de su extracción, se colocaron en cristalizadores en una desecadora. Posteriormente, se pesaron y depositaron en un frasco. En la **tabla 4** y **tabla 5** se observa que el porcentaje de rendimiento del residuo de la tintura

de *P. jacquemontianum* es 1.95% y para *P. oradendron* 1.13%. La planta que obtuvo mejor rendimiento en extracto para la fracción apolar fue *P. jacquemontianum*.

Para la finalización de la extracción fraccionada, se lavó el percolador 6 veces con el etanol al 70%. Se extrajo el solvente con rotavapor (**figura 12**). En la **tabla 4** y **tabla 5** se puede observar que el rendimiento obtenido de extracto utilizando etanol al 70% como solvente fue de 20.00% para *P. jacquemontianum* y 26.00% para *P. oradendron*. La planta que obtuvo mejor rendimiento en extracto para la fracción polar fue *P. oradendron*. Los resultados indican que las plantas poseen más compuestos polares dentro de su composición.

La evaluación microbiológica de los extractos en contra de *Streptococcus dysgalactiae* se realizó con la siembra de la bacteria y los extractos diluidos en concentraciones de 1 mg/mL en agar Müller-Hinton (**figuras 13, 14, 15**). *Streptococcus dysgalactiae* debía ser inoculado con anticipación en un agar sangre (**figura 16**).

La incubación de estreptococos se realiza a 37°C en aerobiosis o microaerofilia durante 18 a 24 horas, transcurridas las cuales se pueden observar colonias con un diámetro de 0.5 a 2 mm (Bedolla, C., 2016, pp. 116.). Un sistema de microaerofilia (microaerobiosis) creado por jarras fue necesario (**figura 17**).

En la **tabla 6** se visualiza que por medio de la prueba de agar planta se determinó que el extracto etanólico de *P. jacquemontianum* sí posee actividad bactericida en contra de *Streptococcus dysgalactiae* (**figura 18**). Asimismo, el extracto hexánico de *P. oradendron* fue efectivo en contra de dichas bacterias (**figura 19**).

El extracto hexánico de *P. jacquemontianum* (**figura 20**) y el extracto etanólico de *P. oradendron* no presentaron actividad bactericida para *Streptococcus dysgalactiae*.

En la **tabla 7** y **tabla 8** se observa que a través de la prueba de concentración inhibitoria mínima se determinó que las concentraciones a las cuales tanto el extracto etanólico de *P. jacquemontianum* como el extracto hexánico *P. oradendron* tienen actividad bactericida son 0.5 mg/mL y 1 mg/mL al cumplir con las 3 repeticiones (3 inoculaciones) (**figura 21, 22 y 23**).



Alguno o varios de los compuestos presentes en *P. jacquemontianum*, alcaloides, linalol, E-nerolidol y  $\alpha$ -pineno (Almeda, H., *et al*, 2014, pp. 37-39), le provee actividad bactericida en contra estreptococos que tienen una actividad virulenta en bovinos.

*P. oradendron* posee alta cantidad de flavonoides en sus hojas, entre ellos está el hiperósido (Almeda, H., *et al*, 2014, pp. 37-40; Cáceres, A., 2013, pp. 3). Uno o varios flavonoides pueden otorgarle a esta planta una actividad bactericida frente a estreptococos que generen mastitis en vacas.

La hipótesis de investigación es verdadera, ya que dos de los extractos son efectivos como bactericidas frente a *Streptococcus dysgalactiae*.

La importancia de los resultados obtenidos radica en generar nuevas opciones terapéuticas basadas en plantas con propiedades medicinales, las cuales pueden ser aprovechadas tanto en humanos como en animales.

Esta investigación es relevante debido a que genera y amplía la información científica sobre las plantas medicinales de Guatemala. Para esta investigación se emplearon piperáceas, las cuales tienen alto interés científico para su uso en medicina natural.

## 10. CONCLUSIONES

- El mejor rendimiento de la extracción fraccionada con hexano fue de *Piper jacquemontianum*, con 1.95%.
- El extracto etanólico de *Piper oradendron* (26.00%) fue el que tuvo mejor rendimiento comparado con el extracto de *Piper jacquemontianum* (20.00%).
- El extracto etanólico de *Piper jacquemontianum* presentó actividad bactericida a 0.5 y 1 mg/mL en contra *Streptococcus dysgalactiae*, que provoca mastitis bovina.
- El extracto hexánico de *Piper jacquemontianum* y el extracto etanólico de *Piper oradendron* no poseen actividad bactericida ante *Streptococcus dysgalactiae*.
- El extracto hexánico de *Piper oradendron* presentó actividad bactericida a 0.5 y 1 mg/mL en contra de *Streptococcus dysgalactiae*.
- Las concentraciones de los extractos que no tuvieron actividad bactericida en contra *Streptococcus dysgalactiae* fueron el extracto etanólico de *Piper oradendron* a 1 mg/mL y el extracto hexánico de *Piper jacquemontianum* a 1 mg/mL.
- La importancia de los resultados obtenidos radica en la difusión de nueva información científica basada en las propiedades medicinales de las plantas nativas de Guatemala.

## 11. RECOMENDACIONES

- Experimentar con otras plantas piperáceas provenientes de distintas áreas de Guatemala. Preferiblemente especies nativas para contrastar si se alcanzan resultados similares a los obtenidos en esta investigación.
- En agares planta, utilizar aceites esenciales de *Piper jacquemontianum* y *Piper oradendron* para estudiar si poseen actividad bactericida como los extractos.
- Estudiar la viabilidad de emplear otras bacterias que son patógenas en humanos con extractos polares y apolares de piperáceas.
- Se recomienda que Químicos Farmacéuticos formulen productos fitofarmacéuticos con extractos de *Piper jacquemontianum* y *Piper oradendron* a concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/mL para evaluar el efecto bactericida *in vivo* en ganado bovino para ampliar el estudio.

## 12. REFERENCIAS

- Almeda, H., *et al.* (2014). *Actividad antiureasa, antitirosinasa y antioxidante de especies nativas del género Piper con potencial aplicación en medicina, cosmética y conservación de alimentos*. Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Pp. 30-32, 37-40.
- Amber, R., *et al.* (2018). Antibacterial activity of selected medicinal plants of northwest Pakistan traditionally used against mastitis in livestock. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(1). Pp. 154.
- Bedolla, C. (2016). Etiología de la mastitis bovina. *Entorno Ganadero*, 13(80). Pp. 108, 110, 112, 114, 116. Recuperado el 1 de agosto de 2017, en: <http://bmeditores.mx/etiologia-mastitis-bovina/>
- Bedolla, C., Ponce, M. (2008). Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. *Revista Electrónica de Veterinaria (REDVET)*, 9(4). Pp. 6-7. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/636/63611952010.pdf>
- Cáceres, A. (2013). *Valoración de especies mesoamericanas de Piper bioactivas como potenciales productos naturales de aplicación agroindustrial*. Guatemala: Proyecto FODECYT 27-2011. Pp. 3.
- Chávez, J. (2010). *Actividad antimicrobiana in vitro de seis plantas de uso medicinal sobre las principales cepas de bacterias y hongos que afectan piel y oído en perros*. Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Pp. 18 y 27.
- Chávez, L., Murguía, A. (2014). *Los aceites esenciales tópicos en la prevención y cuidado de mastitis*. Perú: AgrovvetMarket, S.A. Pp. 1-2.
- Corbellini, C. (2015). *La mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche*. Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Pp. 1 y 3.

- Díaz, D., Pena, G. (2016). *Uso de antibióticos en la ganadería lechera*. Estados Unidos de América: Cooperative Extension System.
- Fernández, O., et al. (2012). Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. *Revista Veterinaria REDVET*, 13(11). Pp. 1.
- Flores, I. (2017). *Evaluación de la actividad antioxidante y caracterización fitoquímica del extracto de hojas de matilisguate (*Tabebuia rosea*)*. Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Pp. 49.
- García-Romero, C. (2013). Las terapias naturales en ganadería ecológica fitoterapia veterinaria. *Agricultura y ganadería ecológica*, 13. Pp. 26.
- Gasque, R. (2008). *Enciclopedia Bovina*. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 176, 180-181.
- Grzesiak, B., et al. (2018). The Effect of Some Natural Essential Oils Against Bovine Mastitis Caused by *Prototheca zopfii* Isolates In Vitro. *Mycopathologia*.
- Kirk, J., Mellenberger, R. (1990). *Mastitis Control Program for Environmental Strep.-infected Dairy Cows*. Washington D.C.: North Central Regional Extension Publications. Pp. 2.
- Laboratorio de investigación de productos naturales (LIPRONAT). (2014). *Mejor solvente*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp. 1-3.
- Laboratorio de investigación de productos naturales (LIPRONAT). (2013). *Procedimiento de extracción fraccionada*. Capítulo XIII. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp. 1-2.
- Laboratorio de investigación de productos naturales (LIPRONAT). (2013). *Tamizaje de la actividad antibacteriana in vitro*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp. 1-3.

- López, M. (2008). *Evaluación de la Resistencia antibiótica de los microorganismos aislados en casos de mastitis clínica en una explotación lechera*. Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Pp. 3-12 y 14.
- López, M. (2009). *Evaluación del efecto antibacteriano in vitro de seis especies de plantas de uso medicinal sobre bacterias causantes de mastitis en vacas lecheras*". Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Pp. 21.
- Martínez, J. (2009). *Caracterización morfológica, ecológica, genética y química de 3 especies de Piper (Piper Jacquemontianum, Piper donnell, smithii y Piper oradendron) con fines de conservación y mejoramiento para su aprovechamiento como nuevos recursos aromáticos y/o medicinales en Guatemala*. Guatemala: Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACY); Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT); Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT). Pp. 1-2.
- Mushtaq S. (2016). Isolation and characterization of three benzylisoquinoline alkaloids from *Thalictrum minus* L. and their antibacterial activity against bovine mastitis. *Journal of Ethnopharmacology*, 193. Pp. 221.
- Ruiz, A., et al. (2011). Prevalencia de mastitis bovina subclínica y microorganismos asociados: comparación entre ordeño manual y mecánico, en Pernambuco, Brasil. *Rev. Salud Anim.*, 33(1). Pp. 58.
- Sasitorn C., et al. (2017). Antibacterial and anti-biofilm effects of a polyherbal formula and its constituents against coagulase-negative and -positive staphylococci isolated from bovine mastitis, *Journal of Applied Animal Research*, 45(1). Pp. 364.
- Solís, M. (2007). *Utilización de la solución hipertónica (agua de mar) en el tratamiento de la mastitis bovina en la Finca "Guadalupana", del municipio de Nagarote, Departamento de León*. Licenciatura. Universidad Nacional Agraria, Nicaragua. Pp. 13.

Tení, D. (2008). *Tamizaje fitoquímico, extracción fraccionada y evaluación biocida del extracto diclorometánico y metanólico de Brosimum alicastrum Swartz (ramón) fruto, semilla y hojas.* Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. Pp. 18.

## 13. ANEXOS

### ANEXO I

#### 13.1. MASTITIS BOVINA

##### 13.1.1. DEFINICIÓN

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria y sus tejidos secretores, que reduce la producción del volumen de leche, alterando su composición, incluso su sabor, además de elevar su carga bacteriana normal. De acuerdo a su duración, se puede clasificar en aguda o crónica. En relación a sus manifestaciones clínicas, puede ser clínica o subclínica. Esta enfermedad provoca graves pérdidas económicas a la industria lechera.

Aunque en muchos casos hay tumefacción, calor, dolor y endurecimiento de la glándula mamaria, la mastitis no se identifica fácilmente, ni por examen visual ni por leche obtenida en la copa de ordeño (Gasque, R., 2008, Pp. 176).

##### 13.1.2. ETIOLOGÍA

###### 13.1.2.1. Agentes etiológicos causantes de mastitis bovina

En la glándula mamaria bovina se han identificado hasta 140 especies, subespecies y serovariedades microbianas. Las técnicas microbiológicas han permitido la determinación precisa de la identidad de muchos microorganismos patógenos de la mastitis.

Clásicamente estos microorganismos causantes de infección intramamaria o mastitis han sido divididos en patógenos contagiosos y ambientales; en base a su asociación epidemiológica con la enfermedad y a su proclividad de causar la infección oportunista, persistente o transeúnte, respectivamente. Dependiendo asimismo, de su repertorio primario y el ambiente contra el cuarto de la glándula mamaria infectada.

###### 13.1.2.2. Patógenos causantes de la mastitis contagiosa



Los patógenos contagiosos de primera importancia incluyen al *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium spp.*, y *Mycoplasma spp.* Estos organismos se transmiten de vaca a vaca, donde el reservorio primario que alberga los patógenos es el animal infectado o el cuarto de la ubre, y la exposición de los cuartos mamarios no infectados se restringe al proceso de la ordeña.

Los patógenos contagiosos de la mastitis como el *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* que son infecciosos a nivel individual y a nivel de población, han sido reportados bajo control en los hatos lecheros a través del uso de prácticas de manejo que utilizan la desinfección de los pezones después de la ordeña, terapia de la vaca seca, desecho, mantenimiento del equipo de ordeño y terapia antibiótica de las infecciones intramamarias.

#### 13.1.2.3. Patógenos causantes de la mastitis ambiental

Los patógenos ambientales a diferencia de los contagiosos son transmitidos entre las ordeñas por el ambiente que sirve como la fuente primaria de estos organismos. Los patógenos principales en este grupo son los bacilos entéricos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*), *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, y *Enterococcus spp.*

La mastitis ocasionada por patógenos ambientales es el principal problema que afecta a muchos hatos lecheros bien manejados, que aplican un programa de control de los patógenos contagiosos de la mastitis.

A pesar de que la mastitis por organismos contagiosos (especialmente *Streptococcus agalactiae*) ha disminuido por mejoramiento en el manejo. Las pérdidas económicas debido a la enfermedad pueden continuar porque los organismos causales no pueden ser erradicados del medio ambiente de las vacas lecheras ya que pertenecen a la microbiota normal del ambiente y se encuentran en cada establo.

Estos patógenos poseen en general un potencial muy pobre para causar enfermedad. Sin embargo, pueden penetrar en el conducto galactóforo hacia la ubre y provocar infecciones muy persistentes que requieren una terapia muy difícil.

Las fuentes de patógenos ambientales incluyen:

- Materiales de cama
- Estiércol
- Suciedad y lodo
- Agua estancada
- Alimento

La fuente más importante es la cama porque los pezones están en contacto frecuente y prolongado con ella. Por tanto, la prevención de la contaminación de los pezones es muy importante y la práctica de mantener los materiales de cama secos ayudan a reducir las poblaciones de esos organismos.

Además de los patógenos mencionados anteriormente, existen otros que también se incluyen en la clase ambiental de este tipo de infecciones. Se trata generalmente de oportunistas que invaden la glándula mamaria cuando los mecanismos de defensa están disminuidos o cuando se introducen inadvertidamente en la glándula mamaria al realizar un tratamiento intramamario.

#### 13.1.2.4. **Patógenos oportunistas**

Este grupo de microorganismos oportunistas incluyen a *Pseudomonas spp.*, levaduras, *Prototheca spp.*, *Serratia marcescens* y *Nocardia spp.* Cada uno de estos agentes posee características de cultivo, mecanismos patógenos y consecuencias clínicas singulares.

La fuente de estos agentes patógenos es el entorno de la vaca. La forma de transmisión principal es del ambiente a la vaca a través de un

manejo inadecuado del primero. Algunos ejemplos incluyen la cama húmeda, terrenos sucios, ubres mojadas por la leche, preparación inadecuada de la ubre y los pezones antes del ordeño, sistemas de estabulación que favorecen las lesiones en los pezones y la exposición de los cuartos no infectados a los patógenos ambientales que puede ocurrir en cualquier momento durante la vida de una vaca.

Estas infecciones generalmente ocurren de forma esporádica. Sin embargo, se pueden producir brotes en los rebaños o en una región entera, normalmente como consecuencia de problemas con la higiene o el tratamiento. Por ejemplo, se ha producido mastitis causada por *Pseudomona aeruginosa* en brotes relacionados con la contaminación de las conducciones de goma en las salas de ordeño.

La mastitis ocasionada por patógenos ambientales es el principal problema que afecta a muchos hatos lecheros bien manejados, que aplican un programa de control de los patógenos contagiosos de la mastitis.

Debido a que en la actualidad estos patógenos no han sido bien controlados por los métodos arriba mencionados, ahora están surgiendo como la causa más frecuente de mastitis en muchos hatos, particularmente bien manejados, hatos con bajo conteo de células somáticas (<200,000 cs/ml). Tradicionalmente, los agentes más comunes causantes de la mastitis también han sido clasificados como patógenos principales (mayores) y menores según el grado de inflamación que estos producen en la glándula mamaria.

Los patógenos principales son definidos como los patógenos responsables, la mayoría de las veces, de las mastitis clínicas o de fuertes respuestas inflamatorias (elevados de células somáticas en la leche) y comprenden al *Staphylococcus aureus*, *S. uberis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* y coliformes.

#### 13.1.2.5. Patógenos principales o mayores

Los patógenos menores son definidos como los patógenos que infectan la glándula mamaria, causando conteos moderados de células somáticas, pero en lo general no causan signos clínicos. Estas infecciones, son especialmente frecuentes, debidas sobre todo a otros Estafilococos (principalmente *S. chromogenes*, *S. hyicus*, *S. epidermidis*, y *S. xylosus*) o por *Corynebacterium bovis* y *Micrococcaceae* coagulasa-negativos.

#### 13.1.3. *Streptococcus*

El término *Streptococcus* (*Streptós*, trenzado; *kókkos*, grano) fue utilizado por primera vez por Billroth, en 1874. Para describir unos microorganismos de forma cocácea, dispuestos en cadena. Son células esféricas u ovoides, con un diámetro de 0.5 a 2  $\mu\text{m}$ , que se dividen en un plano y pueden quedar adheridas y formar parejas o bien cadenas largas cuando crecen en medios de cultivo líquido. A excepción de algunas especies, son generalmente inmóviles y no capsuladas. Los estreptococos son organismos Gram-positivos, de catalasa negativa, que frecuentemente son aislados de la glándula mamaria bovina y de tanques de leche cruda. Algunos organismos que pertenecen al género *Enterococcus* y *Streptococcus* en particular el *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus* y el *Streptococcus uberis*, han sido bien documentados como agentes etiológicos de mastitis bovina y sus resultados han provocado severas pérdidas económicas a la industria lechera. Los estreptococos son, probablemente, el segundo grupo en importancia, después de los estafilococos, responsables de la mastitis. Aunque el *Streptococcus agalactiae*, el *Streptococcus uberis* y el *Streptococcus dysgalactiae* son las especies más frecuentemente identificadas, otra especie de estreptococos, el *Streptococcus parasanguinis*, ha sido implicado en las infecciones de la glándula mamaria.

##### 13.1.3.1.1. Aislamiento e identificación

Para el aislamiento de los estreptococos se utilizan medios enriquecidos con sangre o suero y medios de cultivo selectivos, que

pueden llevar en su composición cristal violeta, sulfato de talio y, en ocasiones, sustancias antimicrobianas; la incubación se realiza a 37°C en aerobios o microaerofilia durante 18 a 24 horas, transcurridas las cuales se pueden observar colonias con un diámetro de 0.5 a 2 mm, de bordes regulares, transparentes u opacas y convexas. En medios de cultivo con sangre, los estreptococos pueden producir distintos tipos de hemólisis: Hemólisis  $\beta$  que se caracteriza por una lisis total de los hematíes; hemólisis  $\beta$ , que corresponde a una decoloración incompleta alrededor de la colonia, rodeada de una zona de tonalidad verdosa de 1 a 3 mm, y hemólisis  $\alpha$  o ausencia de hemólisis. La capacidad hemofílica de la bacteria se debe a dos enzimas: la estreptolisina O (que se inactiva en presencia de oxígeno) y la estreptolisina S (que permanece estable en presencia de oxígeno, y cuya producción es inducida por el suero).

13.1.3.1.2. ***Streptococcus agalactiae***

El *Streptococcus agalactiae* es considerado una de las mayores causas de infecciones intramamarias bovinas. Es un patógeno muy contagioso de la glándula mamaria, donde puede sobrevivir por largos períodos de tiempo. Esta bacteria es considerada una de las mayores causas de infecciones intramamarias bovinas particularmente en América del Norte. En los países donde se ha controlado el *Streptococcus agalactiae*, los patógenos más importantes son el *Staphylococcus aureus*, el *Streptococcus dysgalactiae* y el *Streptococcus uberis*. En general las especies normalmente aisladas, a nivel mundial, de estafilococos coagulasa negativos parecen ser de *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis* y de *Staphylococcus simulans*. Algunas diferencias en la patogenicidad entre las diferentes especies de Estafilococos Coagulasa Negativos (ECN) han sido observadas. Así,

se encuentra al *Staphylococcus simulans* más frecuentemente asociado con las infecciones clínicas que las otras especies y asociado con la reacción de una inflamación aumentada.

13.1.3.1.3. ***Streptococcus uberis***

El *Streptococcus uberis* es una bacteria patógena medioambiental que induce, en una proporción significativa, la mastitis clínica bovina en todo el mundo; Por consiguiente la mastitis medioambiental se ha vuelto un gran problema. El *Streptococcus uberis* es un importante patógeno medioambiental involucrado en los casos de mastitis subclínica y clínica durante el periodo de lactación temprana y el periodo seco; y es responsable del 12 al 14% de la mastitis clínica en vacas lactantes. En el Reino Unido es responsable de alrededor del 20% de todos los casos de mastitis bovina; sin embargo, se afirma que es el responsable del 33% de los casos detectados de mastitis bovina. En Dinamarca podrían relacionarse el 23% de los casos de mastitis en los hatos lecheros con la infección por este patógeno. Se han diferenciado 31 especies del género *Streptococcus* incluidas las especies *S. uberis* y *S. parauberis*, ambas especies son bien conocidas como agentes causales de mastitis bovina.

13.1.3.1.4. ***Streptococcus dysgalactiae***

La mastitis causada por patógenos medioambientales es un gran problema que afecta a los hatos lecheros. De entre los patógenos medioambientales, el *Streptococcus dysgalactiae* ha sido frecuentemente aislado de las infecciones intramamarias durante la lactación y el período seco. El *Streptococcus dysgalactiae* es una de las especies bacterianas más importantes aislada en la mastitis bovina. El de la especie hemolítica, es un patógeno muy común en la mastitis clínica y subclínica. La prueba serológica de Lancefield a

la bacteria *Streptococcus dysgalactiae*, del grupo C, la identifica como uno de los patógenos más comunes de mastitis bovina, que causa pérdidas económicas más grandes en la industria de la leche. Este patógeno es muy capaz de sobrevivir en la boca, vagina y piel de los animales saludables que pastan. Debido a su situación medioambiental, los métodos de higiene normales y la terapia del antibiótico son menos eficaces previniendo las infecciones por *Streptococcus dysgalactiae* que las infecciones por otro patógeno contagioso (Bedolla, C., 2016, Pp. 108, 110, 112, 114, 116).

#### 13.1.4. FACTORES DE RIESGO

- Errores de manejo como el sobreordeño.
- Mamilas de ordeño de tamaño inadecuado.
- Falta de sellado de los pezones al término del ordeño.
- Lavado deficiente o inadecuado de la ubre.
- Equipo o material contaminado.
- Época de lluvias, edad, implantación de la ubre, entre otros.
- Un medio ambiente sucio predispone en gran medida a la presentación de la mastitis (Gasque, R., 2008, Pp. 176).

#### 13.1.5. SINTOMATOLOGÍA

13.1.5.1. **Galactoforitis aguda.** Se manifiesta con la presencia de grumos de fibrina y pus, sin alteración de las constantes fisiológicas de la vaca, no existe modificación en la conducta, no hay alteraciones de alimentación, no se presenta inflamación manifiesta en el o los cuartos afectados, no existen signos de dolor y solo se aprecia en ocasiones una ligera asimetría en los cuartos afectados, los tolondrones pueden aparecer al inicio, a la mitad o al final del ordeño. En este cuadro es donde la prueba del tazón de fondo oscuro es indispensable.

13.1.5.2. **Galactoforitis crónica.** La presentación clínica es igual al caso anterior de galactoforitis aguda, siendo la única diferencia, la reincidencia del proceso.

Aquí el tratamiento es a base de inmunoterapia específica y de cefalosporinas.

13.1.5.3. **Mastitis apostematosa.** Este cuadro se manifiesta con proceso abscedativo múltiple, que va desde microabcesos hasta abscesos del tamaño de una naranja, los cuales debridan constantemente tanto hacia el exterior como hacia la cisterna de la glándula, por lo que se observa pus franca en lugar de leche al exprimir el o los cuartos afectados, este material purulento tiene las características de exudados de *Actinobacillus pyogenes*

(Bedolla, C., Ponce, M., 2008, pp. 7).

#### 13.1.6. CLASIFICACIÓN

La mastitis se clasifica en mastitis clínica, subclínica e infección latente, según el grado de inflamación. La inflamación de la glándula mamaria se caracteriza por los signos cardinales de ésta, los cuales son tumor, rubor, dolor, calor y disminución de la función.

13.1.6.1. **Mastitis Clínica.** Puede presentarse como: severamente aguda, suave que por la severidad inflamatoria se subdivide moderada y ligera, crónica y gangrenosa

13.1.6.1.1. **Mastitis severamente aguda.** Generalmente es de presentación súbita con una severa inflamación de la glándula mamaria afectada, pudiendo presentarse o no con alteraciones aparentes en la secreción láctea, pero sí una disminución en la cantidad producida. En ésta forma de mastitis podrán presentarse signos sistémicos como septicemia, toxemia, fiebre, anorexia, depresión, movimientos ruminales disminuidos, entre otros signos

13.1.6.1.2. **Mastitis suave-moderada.** De presentación súbita que se presenta con un decremento en producción de leche y alteraciones que pueden ser de aspecto seroso, con hilos de fibrina, coágulos, grumos.



- 13.1.6.1.3. **Mastitis suave-ligera.** Es una forma intermedia entre la forma de presentación anterior y una mastitis crónica. Esta clase de inflamación puede presentarse con brotes de reagudización o pasar a una fase de inflamación crónica. En éste tipo de cuadro es frecuente el que no se aprecien cambios aparentes en la ubre y únicamente al inicio del ordeño se observen pequeños grumos en la secreción láctea.
- 13.1.6.1.4. **Mastitis crónica.** Cuando la agresión en la glándula mamaria persiste y no hay una solución a la reacción inflamatoria aguda el resultado es una inflamación crónica, microscópicamente puede verse necrosis tisular. Un cuadro de mastitis crónica podrá presentarse clínicamente en forma aguda.
- 13.1.6.1.5. **Mastitis Gangrenosa.** Esta forma de presentación clínica es ocasionada cuando los microorganismos involucrados o sus toxinas producen vasoconstricción, isquemia y muerte del tejido. A la inspección la glándula afectada se encuentra inflamada, fría y cianótica, se observa una línea de demarcación entre el tejido sano y el afectado, viéndose éste de color azul o negro.
- 13.1.6.2. **Mastitis subclínica.** Esta es una forma en la cual no hay signos visibles en la glándula mamaria, pero sí una disminución en la producción de leche e incremento en el número de células somáticas.
- 13.1.6.3. **Infección latente.** Esta es una forma de presentación de mastitis subclínica en la cual se da en leche el aislamiento de microorganismos considerados como tradicionalmente patógenos para la glándula mamaria.

(López, M., 2008, pp. 3-4)

#### 13.1.7. FISIOPATOLOGÍA

La infección de cada glándula mamaria ocurre a través del conducto del pezón a partir de dos fuentes principales de contaminación: la ubre infectada y el medio. La contaminación de las manos de los ordeñadores, paños de lavado y copas de

aparatos de ordeño pueden diseminar con rapidez la infección a los pezones de otros animales por la leche procedente de cuarterones infectados.

Los microorganismos pueden invadir el canal del pezón por distintas vías:

- Entre ordeños las bacterias pueden avanzar por el canal del pezón por multiplicación.
- Pueden ingresar por la presión física ejercida sobre la punta del pezón cuando la vaca se mueve.
- Durante el ordeño mecánico pueden ser impulsados hacia el canal del pezón o desde el mismo hacia el interior de la cisterna del pezón, por los impactos que causan las fluctuaciones de vacío contra el orificio del pezón.
- Durante la aplicación de un antibiótico pueden ser empujados físicamente a través del canal del pezón por la inserción completa de la cánula.

La invasión microbiana de la glándula mamaria ocurre siempre siguiendo la vía del conducto del pezón y a primera vista, el desarrollo de la inflamación después de la infección se sospecha que es un fenómeno natural. Sin embargo, la aparición de la mastitis es más compleja de lo que este concepto puede indicar y quizás resulte más satisfactorio explicarla en términos de tres etapas: invasión, infección e inflamación.

- **Etapas de invasión.** Es aquella en la que el microorganismo pasa del exterior de la ubre a la leche que se encuentra en el interior de la cisterna del pezón.
- **Etapas de infección.** Este es el momento en que los microorganismos se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario; se establece una población bacteriana que se disemina por toda la glándula, dependiendo de la patogenicidad del microorganismo.
- **Etapas de inflamación.** Todo lo anterior deriva en una inflamación (mastitis) y aumenta notablemente la cuenta leucocitaria en la leche ordeñada (Bedolla, C., Ponce, M., 2008, pp. 6-7).

### 13.1.8. **DIAGNÓSTICO**

#### 13.1.8.1. **Exploración física.**

- Inspección. Consiste en ver y observar, empleando el sentido de la vista.
- Palpación. La palpación se hace utilizando el tacto. Puede ser inmediata en la que se emplea el tacto al tocar o hacer presión, o mediante cateterismo valiéndose de una sonda o cánula o de un bisturí de campana.
- Percusión. Procedimiento exploratorio como un auxiliar en la identificación de abscesos, quistes, estenosis de ductos, enfisema, etc.
- Auscultación. Es escuchar aplicando el oído. Habiendo gas entre piel y tejido celular subcutáneo al palpar la glándula, se puede escuchar por medio del sentido auditivo la crepitación que acusa la presencia del gas.
- Olfación. Este es un procedimiento de exploración que permite percibir por medio del sentido del olfato a la ubre, así como a las muestras de leche que ocasionalmente tienen olores característicos, que sugieren alteraciones y etiologías específicas.

13.1.8.2. **Colección de muestras de leche.** La muestra de leche es obtenida para hacer diferentes pruebas relacionadas a mastitis: subclínica, clínica y composición de la misma, por lo tanto, la muestra se toma durante el ordeño de la vaca, dependiendo el momento, según el propósito perseguido con la muestra se pueden realizar las siguientes pruebas:

13.1.8.2.1. **Cloro en leche.** En la leche la relación lactosa- cloro es influenciada por:

- Estado lactacional

- Presentación de mastitis
- En casos de mastitis el contenido de cloro en la leche tiende a incrementarse en proporción a la lactosa, lo que ocasiona en la leche un sabor ligeramente salado.

13.1.8.2.2. **Determinación de pH en leche.** Se ha considerado que la leche que proviene de glándulas mamarias afectadas por mastitis el pH es alcalino, lo que se atribuye a la disminución de la lactosa e incremento de sales que pasan de sangre a la leche. Para determinar el pH en la leche podemos emplear:

- Púrpura de bromocresol.
- Azul de bromotimol.
- Potenciómetros.
- Escala de valoración en papel indicador de pH.

13.1.8.2.3. **Determinación de albúmina sérica en leche.** Uno de los primeros cambios en vacas con mastitis es la presencia de albúmina sanguínea en leche, atribuida al aumento de permeabilidad capilar en el proceso inflamatorio. Se considera que la leche proviene de animales positivos a mastitis cuando contiene más de 0.20 mg/ml.

13.1.8.2.4. **Conductividad eléctrica.** La secreción láctea de una glándula mamaria con mastitis tiene una alta conductividad eléctrica por el elevado contenido electrolítico, especialmente en iones de sodio y cloro; lo que se presenta como uno de los primeros signos en la mastitis, siendo esto un elemento útil en el diagnóstico, considerando que niveles superiores a 6.9 m/cm<sup>2</sup> entre 20-30°C son anormales.

13.1.8.2.5. **Determinación del número de células somáticas.** Esta prueba se puede realizar de una forma directa o indirecta:

- **Examen microscópico y cálculo del número de células.** Se coloca una laminilla con frotis sobre platina del microscopio, usando el objetivo calibrado. Luego se enfoca el campo a estudiar, contando el número de células presentes y se anota el total de células observadas; se repite la actividad recorriendo los campos. Al alcanzar aproximadamente 50 células, es sugerible cambiar de zona de observación. Se calcula el número de células considerando todo campo estudiado y sacando el promedio de células por campo, resultado que se multiplica por el factor microscópico lo que resultará en el número de células por mililitro.
- **Prueba de California para Mastitis (CMT).** En las infecciones por bacterias, de los vasos localizados en el área afectada escapan leucocitos, siendo generalmente ésta, una respuesta celular proporcional a la severidad de la infección. La prueba de CMT, identifica la presencia de ácido desoxirribonucleico de las células somáticas en la leche. Para hacer la prueba se toma la paleta para CMT por el mango dirigido hacia la cola de la vaca, se descartan los dos primeros chorros de leche de cada pezón y seguidamente se colectan en cada una de las charolas de plástico (debiendo estar la superficie y uniforme), y se anexa a cada charola cuidando que la proporción de reactivo a leche sea de 1:1. De inmediato se mezclan la leche y el reactivo mediante un movimiento rotatorio suave, haciendo la lectura de la reacción alrededor de los 7 segundos, momento en que alcanza el pico la reacción.

- **Prueba de Wisconsin para Mastitis (WMT).** Se basa en la viscosidad de la mezcla del reactivo de California que ha sido diluido 1:1 con agua destilada y que se combina con la leche. La leche (2 ml), se agrega en el tubo de plástico al que previamente se le han incorporado la misma cantidad del reactivo ya diluido y posteriormente se coloca el tapón del tubo. Las muestras son agitadas por 10 segundos, con movimientos gentiles y repetidos hacia el frente y abajo hasta que los tubos quedan casi en posición horizontal, evitando la salida del producto por el orificio lateral, pero con la agitación se procura la adecuada mezcla de la leche y el reactivo en el tiempo determinado. Se dejan reposar los tubos en posición vertical por 20 a 30 segundos. Se coloca la rejilla en forma invertida, quedando el tapón del tubo hacia el suelo por un tiempo de 15 segundos. Posteriormente, la rejilla conteniendo las muestras se regresa a su posición original y se deja reposar por 2-3 minutos permitiendo un adecuado escurrido.

(López, M., 2008, pp. 5-9)

#### 13.1.9. TRATAMIENTO

Aunque la prevención de la mastitis es de mayor relevancia que su tratamiento, todos los casos de mastitis clínica que se presentan en un hato deben ser tratados sin dilatación debido a su gran peligrosidad. El tratamiento quimioterapéutico se recomienda en casos de mastitis clínica sobreaguda y aguda o subaguda, y en los casos recientes o crónicos.

Para que el tratamiento sea efectivo deben cumplirse los siguientes requisitos:

- Que el fármaco elegido sea el indicado para la mastitis, basándose en los reportes de los exámenes de identificación bacteriana.
- Que la concentración del fármaco sea la adecuada.

- Que la frecuencia del tratamiento no sufra interrupciones hasta lograr la curación.
- Administración de terapia de soporte, si el caso lo demanda. El método convencional de tratar la mastitis es mediante la infusión intramamaria de un fármaco específico, previo vaciamiento o drenaje completo del cuarto o cuartos afectados.

En las mastitis agudas, se atribuye la falla de la terapia intramamaria a una distribución deficiente de los fármacos en el parénquima glandular, sobre todo cuando está intensamente inflamado y edematoso, ya que con frecuencia hay obstrucción de los ductos mamarios, ya sea por compresión, coágulos o tolonrones, según el tipo de mastitis.

#### 13.1.9.1. Antibióticos utilizados en el tratamiento de mastitis

13.1.9.1.1. **Bencilpenicilina G.** Este antibiótico es eficaz contra estreptococos que no han desarrollado resistencia importante contra la penicilina G. Combinada con estreptomycin, tiene acción sinérgica incrementando el espectro de acción contra estafilococos.

13.1.9.1.2. **Cloxacilina.** Es un antibiótico semisintético que tiene la ventaja de no ser inactivado por la enzima lactamasa, generada por los estafilococos penicilino-resistentes.

13.1.9.1.3. **Ampicilina.** Penicilina semisintética eficaz contra gérmenes grampositivos y gramnegativos, no obstante, es ineficaz contra *Staphylococcus* resistentes a penicilina.

13.1.9.1.4. **Cefalosporina.** Pertenece al grupo de penicilinas semisintéticas y es eficaz contra gérmenes grampositivos y gramnegativos. En general, su acción es parecida a la de la ampicilina.

13.1.9.1.5. **Neomicina.** Se le considera de amplio espectro, pero es menos eficaz contra *Streptococcus* y *Staphylococcus* que las penicilinas.

13.1.9.1.6. **Gentamicina.** Este antibiótico es activo contra organismos gramnegativos.

13.1.9.1.7. **Estreptomicina y dihidroestreptomicina.** Estos antibióticos son eficaces contra muchos organismos gramnegativos y la mayoría de los *Staphylococcus*. A menudo se utiliza la estreptomicina combinada con penicilina, aunque las bacterias pueden desarrollar rápidamente resistencia contra la estreptomicina.

13.1.9.1.8. **Cloranfenicol.** En general, es de amplio espectro. Eficaz contra coliformes, específicamente, pero no es el agente de elección contra *Streptococcus* y *Staphylococcus*.

(Gasque, R., 2008, pp. 180-181).

#### 13.1.10. PREVENCIÓN

13.1.10.1. **Ordeño mecánico.** Las tasas de mastitis siempre son más elevadas en hatos mal ordeñados. El buen ordeño depende de varios elementos:

- Buena disposición del ordeñador para el trabajo.
- Capacidad de identificación de las vacas, sus características y sus problemas.
- Capacitación en el mejor arte del ordeño

13.1.10.2. **Control del ordeño mecánico.** En manos de un buen jefe; hábil en el manejo del personal, en la supervisión de los procedimientos y en el mantenimiento del equipo de ordeño.

13.1.10.3. **Médico veterinario.** Que es responsable de la planificación de toda la operación desde el punto de vista técnico; sus funciones son:

- Elaborar el manual de procedimientos del ordeño y de la limpieza y desinfección del equipo.
- Enseñar la aplicación correcta del procedimiento de ordeño.
- Elaborar, con otros técnicos, el manual de procedimientos para el mantenimiento del equipo.



- Elaborar y hacer cumplir el manual de procedimientos para el control de la mastitis.
- Seleccionar los implementos (pezoneras), materiales (limpiadores, desinfectantes) y medicamentos que deben emplearse; e instruir al personal sobre su uso.
- Realizar o supervisar los controles con CMT u otros; y decidir, en base a los resultados, la redistribución de los lotes de vacas y el orden del ordeño.
- Decidir sobre la toma de muestras de leche para cultivo y antibiogramas.
- Hacer el análisis estadístico mensual de monitoreo de la mastitis.
- Decidir sobre el rol y método de secado de las vacas.
- Recomendar la saca de las vacas problema de mastitis (López, M., 2008, pp. 10-11)

#### 13.1.11. CONTROL DE LA MASTITIS BOVINA

El control de la mastitis implica la aplicación de un programa completo que abarque medidas higiénicas y de manejo, cuyo objetivo final es la reducción al máximo de la necesidad de recurrir al tratamiento quimio-terapéutico; usualmente muy costoso. Un programa completo comprende los siguientes puntos:

- Mantenimiento óptimo de las condiciones de limpieza en los alojamientos (áreas pavimentadas y/o camas individuales).
- Higiene personal de los ordeñadores (manos y salud en general).
- Prácticas de ordeño que abarquen lavado de ubre baja y pezón, secado y sellado de pezones con solución desinfectante después de cada ordeño.
- Mantenimiento funcional óptimo de las ordeñadoras mecánicas.
- Diagnóstico periódico del funcionamiento del equipo de ordeño.
- Pruebas mensuales de detección de mastitis subclínica (prueba de California o de Wisconsin).

- Muestreo frecuente de leche en casos clínicos para análisis bacteriológicos de sensibilidad a antibióticos.
- Tratamiento de todas las vacas al momento de secarse para reducir la incidencia a la siguiente lactación.
- Cambio periódico de pezoneras y piezas de hule.
- De ser posible ordeñar vacas de primera lactancia en grupo aparte para evitar contagios del hato adulto.
- Eliminación de casos crónicos y contagiosos.

(Gasque, R., 2008, pp. 181)

## ANEXO II

**Figura 1** Secado en horno de convección de muestra de *Piper jacquemontianum*



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 2** Secado previo de muestra vegetal de *Piper oradendron*



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 3** Secado en horno de convección de muestra de *Piper oradendron*



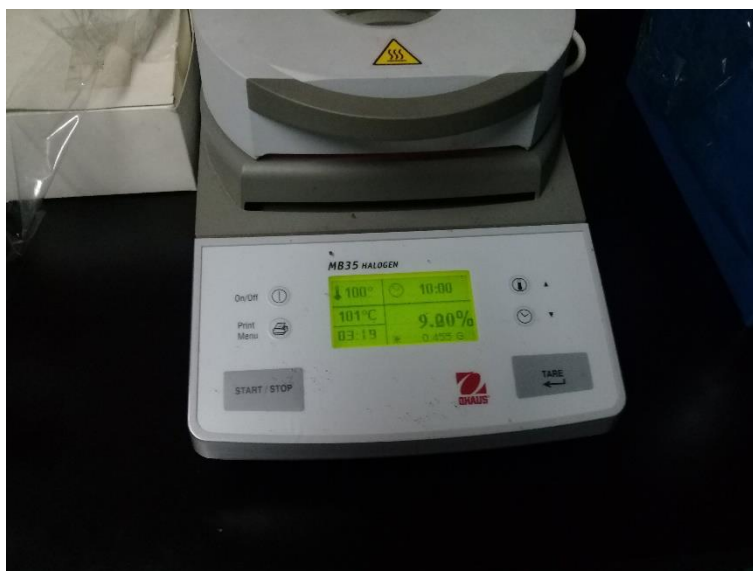
**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 4** Prueba de humedad de muestra de *Piper jacquemontianum*



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 5** Prueba de humedad de muestra de *Piper oradendron*



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 6** Tamizado y limpieza de hojas



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 7** Extracción fraccionada de *Piper jacquemontianum* y *Piper oradendron*



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 8** Prueba de mejor solvente (etanol)



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.



**Figura 9** Cápsulas y desecadora en prueba de mejor solvente.



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 10** Extracción de hexano con rotavapor, *Piper jacquemontianum*



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 11** Extracción de hexano con rotavapor, *Piper oradendron*



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 12** Extracción de etanol con rotavapor



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

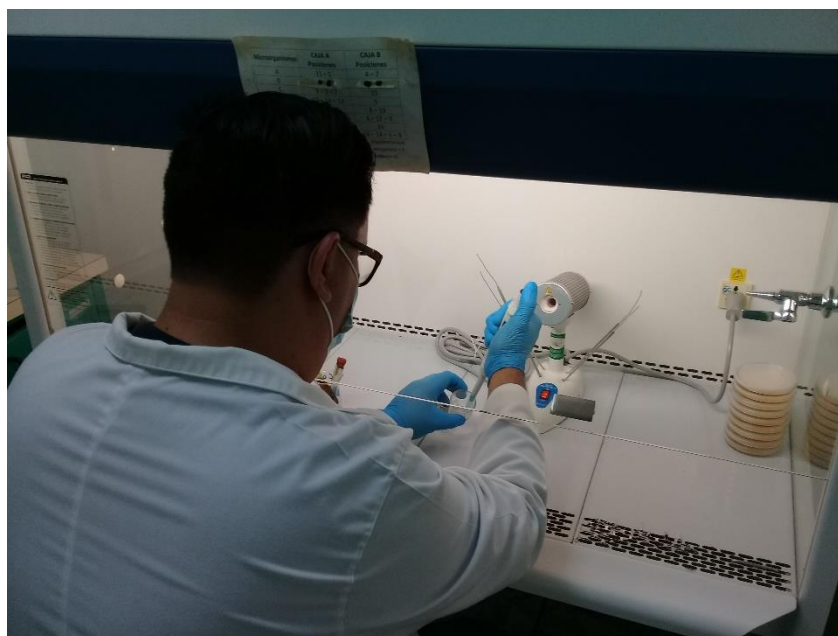


**Figura 13** Esterilización de campana previo a su uso



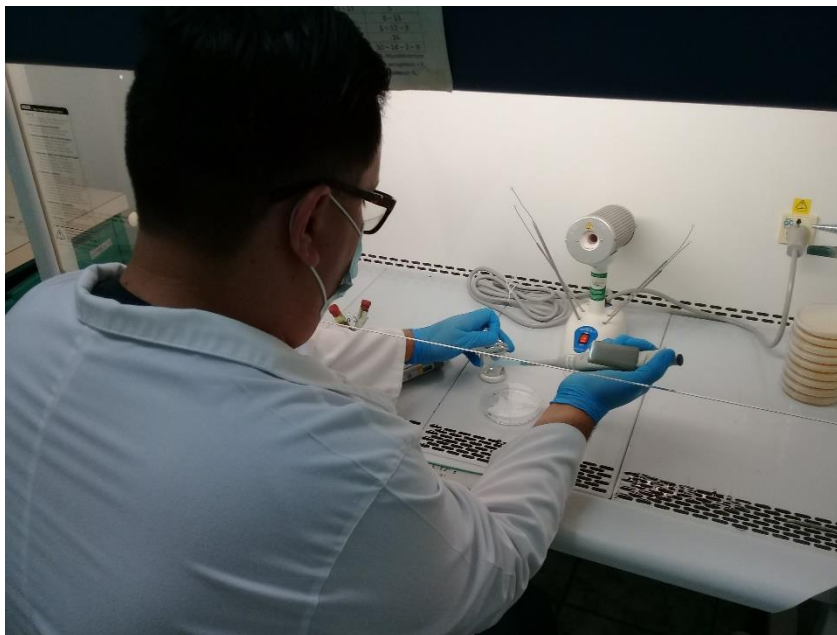
**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 14** Realización de agares control



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 15** Inserción de extracto piperáceo en caja de Petri para agar planta



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 16** *Streptococcus dysgalactiae* en agar sangre entregado en Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



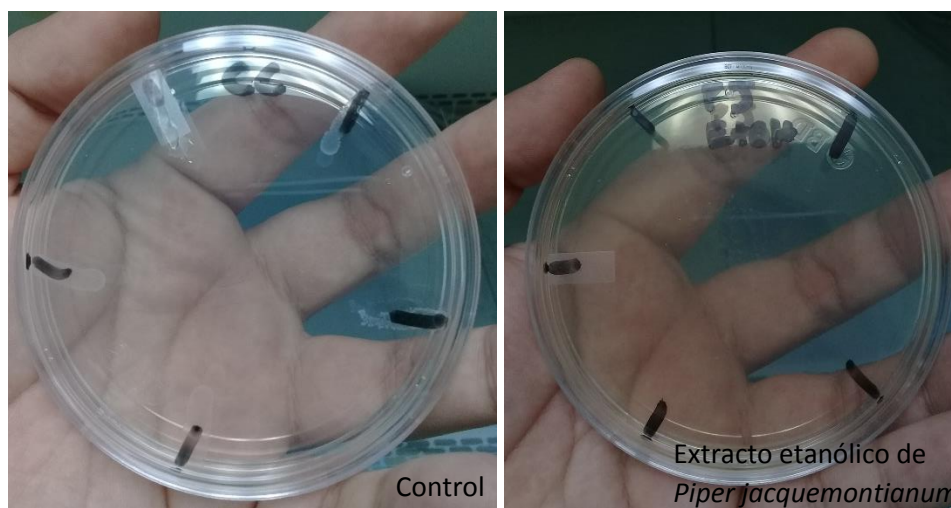
**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 17** Sistema de microarobiosis



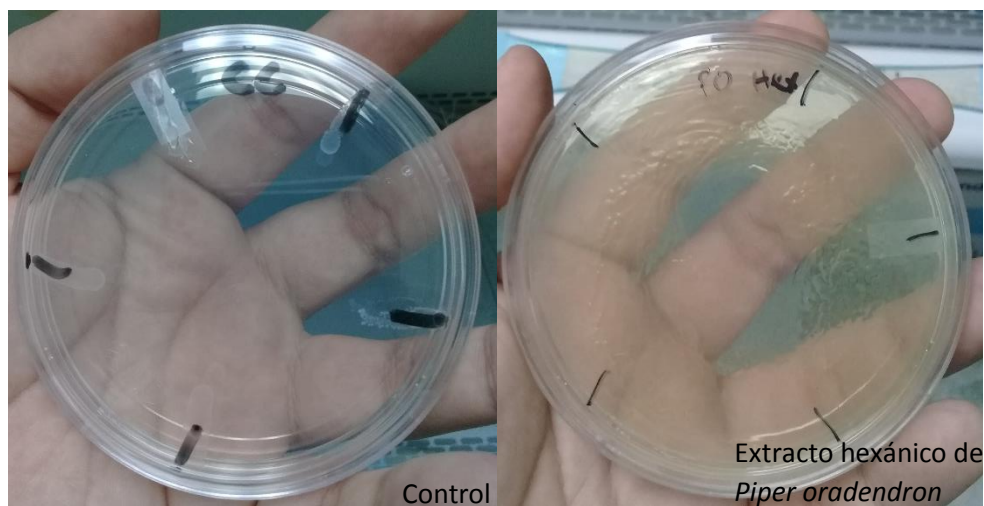
**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 18** Actividad de extracto etanólico de *P. jacquemontianum* comparado con control



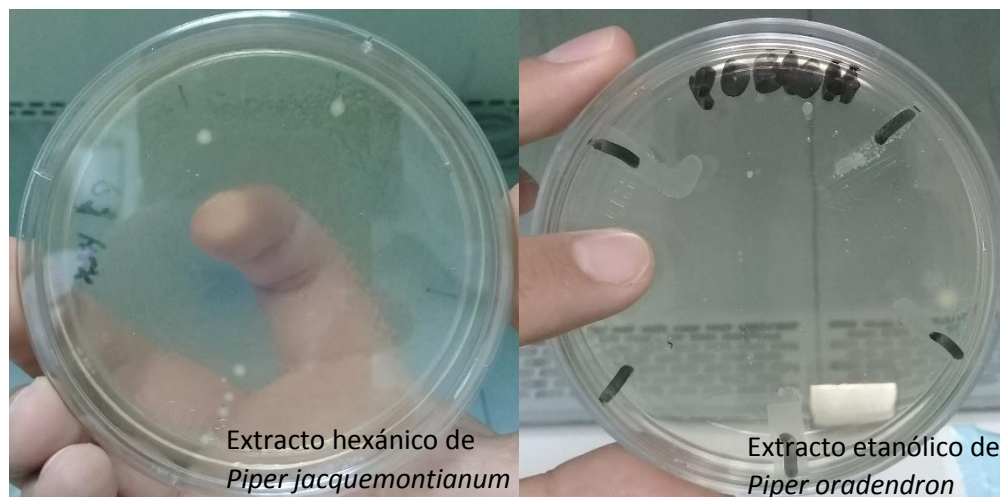
**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 19** Actividad de extracto hexánico de *P. oradendron* comparado con control



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 20** Actividad nula de los extractos hexánico de *Piper jacquemontianum* y el extracto etanólico de *P. oradendron* comparado con control



**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

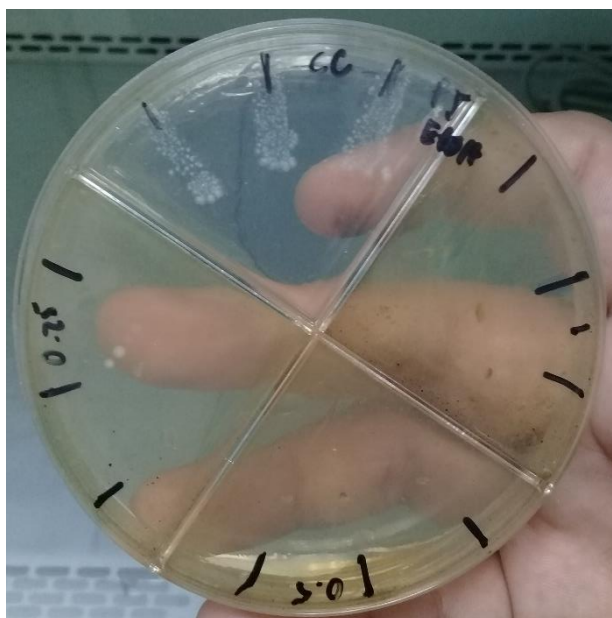


**Figura 21** Procedimiento de elaboración e incubación de agares planta. ww



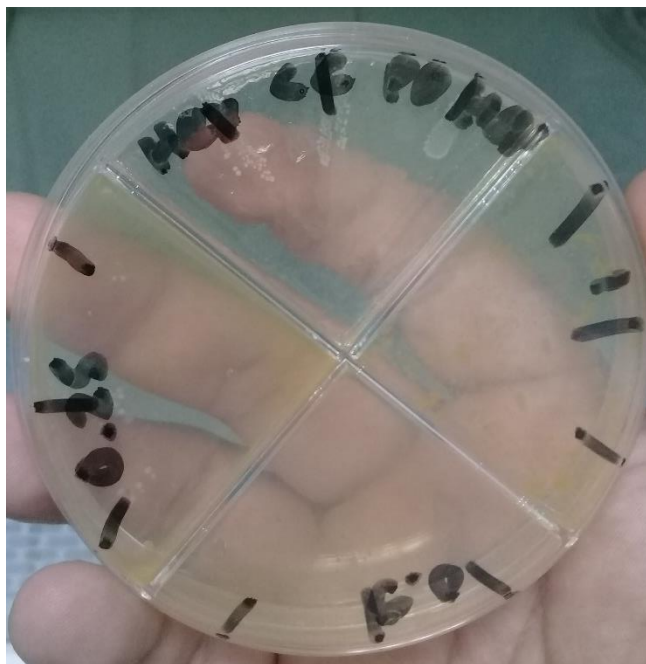
**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 22** Agar planta de Concentración Inhibitoria Mínima para el extracto etanólico de *Piper jacquemontianum*

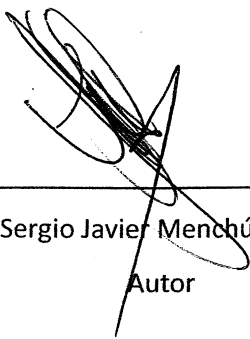


**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.

**Figura 23** Agar planta de Concentración Inhibitoria Mínima para el extracto hexánico de *Piper oradendron*



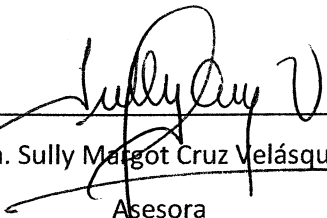
**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Productos Naturales, LIPRONAT, Edificio T-10, Ciudad Universitaria.



---

Br. Sergio Javier Menchú Vanegas

Autor



---

Dra. Sully Margot Cruz Velásquez

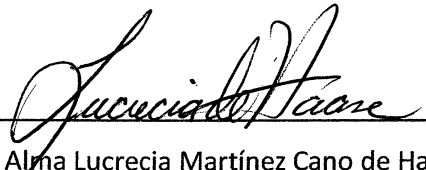
Asesora



---

M.A. Lesbia Mengala Guerra Urizar

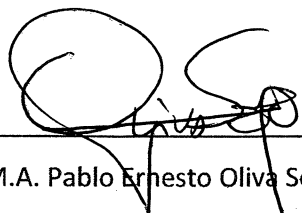
Revisora



---

M.A. Alma Lucrecia Martínez Cano de Haase

Directora



---

M.A. Pablo Ernesto Oliva Soto

Decano