

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE ORÉGANO *Origanum vulgare* EMULSIONADO EN MASTITIS BOVINA.

Johnny Bravo Loor jonisitobravolotmail.com

Carlos Suarez Porto

RESUMEN.- Se ha estudiado la inhibición antibacteriana del extracto acuoso obtenido de la destilación con arrastre de vapor de las hojas de orégano, con 12 y 14% de concentración en compuestos fenólicos y se elaboró una emulsión aceite en agua (O/W) para estabilizar la fase interna (16%) en una externa (80%) para aplicarlo vía intramamaria en vacas en producción con mastitis provenientes de fincas vecinas y de la UIDV ESPAM MFL, previo diagnóstico con Test de California (CMT) de muestras de leche tomada directamente del pezón y confirmadas por siembra de superficie por estrías en cultivos de Agar manitol y MacConkey para *Staphylococcus aureus* y *E.coli* respectivamente, y además Conteo de Células Somáticas (CCS) por citometría directa. El tratamiento en los bovinos se efectuó en el campo con la asepsia y desinfección correspondiente, y se administró mediante cánulas de acero inoxidable las 2 concentraciones del extracto en dosis de 5 ml durante 3 días, posterior al ordeño y secado. Para el procesamiento de los resultados del experimento se aplicó un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial con un análisis de varianza. El resultado muestra que no se presentó diferencias estadísticas para el CCS entre las concentraciones, no obstante si hubo diferencias significativas en las UFC del medio de agar manitol para colonias de *staphylococcus aureus* menor al 6% mostrando efecto inhibitorio sobre esta bacteria en la mastitis bovina.

Palabras clave: Mastitis, emulsión, fases interna y externa, Conteo de Células Somáticas.

INTRODUCCION.- La mastitis bovina es considerada la enfermedad infecciosa del ganado lechero de mayor impacto económico, debido a una disminución en la producción de leche y deterioro en la calidad (Ceron-Muñoz y col., 2002), esta enfermedad puede presentarse en forma clínica, sub-clínica o crónica (Wellenberg et al., 2002), así mismo (Cotrino 2003) estima que el 10% de los casos de mastitis, corresponden a la forma clínica y casi el 90% a la sub-

clínica. Así, las grandes pérdidas en producción láctea es ocasionada, fundamentalmente, en su forma subclínica (OEA, 2003). La prevalencia mundial de la infección de los microorganismos patógenos de la mastitis es aproximadamente del 50% en vacas lecheras, y el nivel de infección de los cuartos, del 25% (Radostits et al., 2001). En Ecuador en el 2015 se estimaba alrededor 4,115 millones de cabezas de ganado, Manabí esta con 893 mil, con un 21.7% seguido de Esmeraldas con 331 mil bovinos, Manabí es la provincia que lidera a nivel nacional el número de cabezas de ganado vacuno, sin embargo, no se destaca en la producción y venta de leche, registrándose 610 mil de litros de leche a nivel nacional. Las provincias más representativas se centran en la Sierra, se exhibe a Pichincha con un 17,93%, seguida de Cotopaxi con el 10,63%, al ostentar Manabí el 12,24% se sitúa en un tercer lugar respecto a la producción de leche. (ESPAC, 2015).

Microrganismos contagiosos y ambientales de mastitis bovina	
M. contagiosos	Referencia bibliográfica
Staphylococcus aureus	Zadoks 2002, Aguilar et al., 2014
Streptococcus agalactiae	Rossitto et al., 2002
Mycoplasma spp.	Zadoks et al., 2011
M. ambientales	Referencia bibliográfica
Escherichia coli	Rossitto et al., 2002
Klebsiella spp.	Bedolla et al., 2007
Streptococcus dysgalactiae	Bolaños et al., 2012
Streptococcus uberis	Raspanti et al., 2016
Enterococcus spp.	Castañeda et al., 2013

Cuadro 1.-Fuente propia

Mastitis en la leche.- El cuadro 1 indica algunas bacterias causantes de mastitis bovina que están presente en leches que alteran su calidad y propiedades por la presencia de estos microorganismos, como Mycoplasma spp. que carecen de pared celular y son muy resistente a las condiciones ambientales, y caracterizan por ser organismos ultra microscópicos y tener una membrana trilaminar lo cual dificulta su detección y su posible tratamiento (García C. et all, 2006). E. coli, bacteria ambiental causante de mastitis subclínica y clínica produce manifestaciones sistémicas, leves, moderadas o severas en vacas en periodo seco o en producción (Cely, M.; Meneses, s., 2004). El control de esto, microorganismos cuando son detectados es el uso de antibacterianos con sus consecuentes

secuelas generando problemas en salud pública, porque dichos microorganismos pueden ser transmitidos al ser humano a través de la leche (Costa, D.A.; Relinemann, D.J., 2012), así mismo resistencias por sus mutaciones conduciendo a ineficacias en el tratamiento, las penicilinas son bactericidas, sin embargo son susceptibles de ser destruidos por la acción de enzimas producidas por las bacterias, las b-lactamasas (Wright AJ., Penicillin-Mechanism, 2003).

En este contexto resulta indispensable que se minimice los riesgos de toxicidad del uso y abuso de productos para el control de microorganismos en el entorno, creándose la necesidad de potenciar el efecto del extracto de orégano, aceite esencial natural con propiedades antibacterianas obtenidas de vegetales que crecen de manera silvestre en esta región, emulsionándolo. La finalidad de una emulsión es lograr que los compuestos de naturaleza hidrofílica e hidrofóbica puedan coexistir de manera más estable (W. C. Hsieh et, all 2006), esto se logra con la disminución de la tensión superficial entre dos líquidos inmiscibles y la disminución del tamaño de gota mediante la utilización de emulgentes. La reducción en el tamaño de partícula no sólo mejora el transporte de moléculas activas a través de las membranas biológicas, sino que además aumenta la relación de superficie área/volumen, lo que conduce a una funcionalidad mejorada (Salvia-Trujillo *et al.*, 2015).

MATERIALES Y METODOS.-

Unidad de Análisis.- La unidad de análisis es el extracto de aceite de orégano (*organum vulgare*) emulsionado.

Población de Estudio.- Concentración del extracto de orégano 12%, y 14% de compuestos fenólicos, y métodos de elaboración de la emulsión: ultrasonido y agitación magnética.

Tamaño de muestra.- El tamaño de muestra se efectuara un análisis de la varianza según método factorial de ANOVA.

Selección de la muestra.- La muestra se seleccionara completamente al azar con arreglo bifactorial entre la totalidad de ensayos.

Muestra: Cuarterones infectados, previa identificación en leche de bacterias *S. aureus*, y *E.coli*, elevado conteo de células somáticas

Técnicas de recolección de datos.- Para la identificación y comportamiento de las variables se consideraran los procedimientos de recolección de muestras en los hatos ganaderos, y las técnicas y ensayos de laboratorios de química y microbiología.

Análisis e interpolación de la información.- Se analizaron 44 muestras de leche de leche diagnosticadas con mastitis bovina en medios de cultivo agar Mackonkey y manitol para *Stphilococcus aureus*, y *Escherichia coli*, y 44 muestras para conteo de células somáticas.

Procedimiento.- Las muestras desecadas de hojas y tallos del "orégano" fueron molidas y trasladadas a un balón de fondo plano, acoplada a un equipo de destilación con arrastre de vapor para su destilación y extracción. El extracto de orégano obtenido se separó de la capa acuosa por diferencia de densidad en un embudo de separación. Se le determinó densidad específica, índice de refracción, acidez, y por espectrofotometría UV visible formando un cromóforo se cuantifico % de compuestos fenólicos. Se efectuaron los ensayos correspondientes en el laboratorio de química para emulsionar el aceite de orégano obtenido mediante los métodos mecánicos: agitación magnética 3500 rpp, y aplicando cavitación por medio de un equipo de ultrasonido. La actividad antibacteriana del extracto se determinó por el método semicuantitativo de incorporación en placa de cultivo y sembrado en agar por estrías. El medio de cultivo empleado fue agar Macconkey y manitol, esterilizados en autoclave a 121°C x 15 min. Se realizaron las pruebas confirmativas de los microorganismos antes de cada aplicación intramamaria del extracto emulsionado de *origanum vulgare*, las muestras de leche se inocularon en medio agarizado, previamente fundido y enfriado a 45°C. Luego los medios de cultivo se incubaron a 37°C durante 24 horas, transcurrido el periodo de incubación se efectuó la lectura de las unidades formadoras de colonia por mililitro mediante un contador digital. Para los ensayos de conteo de células somáticas se recabaron las muestras en viales que contenían el conservante bromopol y enviadas al laboratorio de la UPS en la provincia del Pichincha, y por medio de citometría fija efectuar el conteo.

Resultados y discusión.- Los resultados de los ensayos de 44 muestras presentaron diferencias estadísticas solo para las UFC/ml de *Stphilococcus*

aureus por el método de ultrasonido, de igual forma se presentó diferencias estadísticas para el CCSS por el mismo método, no así para el de agitación magnética. Se muestran los resultados para el CCSS.

REP	METODO	CONCENTRA	RCS	TRATAMIEN
1	1	1	4841000	1
2	1	1	4430000	1
3	1	1	2238000	1
4	1	1	1276000	1
5	1	1	2251000	1
6	1	1	916000	1
7	1	1	460594	1
8	1	1	5728000	1
9	1	1	1045000	1
10	1	1	2024000	1
11	1	1	2305000	1
1	1	2	3000000	2
2	1	2	1325000	2
3	1	2	306000	2
4	1	2	384000	2
5	1	2	4516000	2
6	1	2	9472921	2
7	1	2	7357000	2
8	1	2	3791000	2
9	1	2	3668000	2
10	1	2	2237000	2
11	1	2	3537000	2
1	2	1	1031000	3
2	2	1	276000	3

3	2	1	2500000	3
4	2	1	5528000	3
5	2	1	2228000	3
6	2	1	976000	3
7	2	1	1538000	3
8	2	1	460000	3
9	2	1	1525000	3
10	2	1	1110000	3
11	2	1	1148000	3
1	2	2	1081000	4
2	2	2	1616000	4
3	2	2	1697000	4
4	2	2	3945000	4
5	2	2	1667000	4
6	2	2	2100000	4

El método utilizado para tabular estos resultados fue por Anova, con un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial.

Statistix 8.0
11:13:27

28/09/2018,

Analysis of Variance Table for RCS

Source	DF	SS	MS	F	P
CONCENTRA	1	5.420E+12	5.420E+12	1.36	0.2497
METODO	1	1.659E+13	1.659E+13	4.18	0.0476
CONCENTRA*METODO	1	1.700E+11	1.700E+11	0.04	0.8372
Error	40	1.589E+14	3.973E+12		
Total	43				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 2.57E+06 CV 77.55

Statistix 8.0
11:16:39

28/09/2018,

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of RCS for METODO

METODO	Mean	Homogeneous Groups
1	3.19E+06	A
2	1.95E+06	B

Alpha 0.05
 Critical Q Value 2.856
 Error term used: Error, 40 DF
 All 2 means are significantly different from one another.

Prueba de homogeneidad de varianza (Homocedasticidad)

	Chi-Sq	DF	P
Bartlett's Test of Equal Variances	4.99	3	0.1722
Cochran's Q	0.4867		
Largest Var / Smallest Var	3.7526		

Estadística Descriptiva

Statistix 8.0
 11:22:45

28/09/2018,

Descriptive Statistics for CONCENTRA = 1

	RCS
N	23
Mean	2.243E+06
SD	1.755E+06
SE Mean	365950
C.V.	78.262
Minimum	276000
Maximum	5.743E+06

Descriptive Statistics for CONCENTRA = 2

	RCS
N	21
Mean	2.954E+06
SD	2.322E+06
SE Mean	506633
C.V.	78.591
Minimum	306000
Maximum	9.473E+06

Statistix 8.0
 11:24:00

28/09/2018,

Descriptive Statistics for METODO = 1

	RCS
N	23
Mean	3.167E+06
SD	2.354E+06

SE Mean	490921
C.V.	74.330
Minimum	306000
Maximum	9.473E+06

Descriptive Statistics for METODO = 2

	RCS
N	21
Mean	1.941E+06
SD	1.461E+06
SE Mean	318737
C.V.	75.248
Minimum	276000
Maximum	5.826E+06

Statistix 8.0
11:25:14

28/09/2018,

Descriptive Statistics for TRATAMIEN = 1

	RCS
N	11
Mean	2.501E+06
SD	1.741E+06
SE Mean	524871
C.V.	69.595
Minimum	460594
Maximum	5.728E+06

Descriptive Statistics for TRATAMIEN = 2

	RCS
N	11
Mean	3.599E+06
SD	2.794E+06
SE Mean	842490
C.V.	77.629
Minimum	306000
Maximum	9.473E+06

Descriptive Statistics for TRATAMIEN = 3

	RCS
N	11
Mean	1.665E+06
SD	1.442E+06
SE Mean	434909
C.V.	86.609
Minimum	276000
Maximum	5.528E+06

Descriptive Statistics for TRATAMIEN = 4

	RCS
N	11
Mean	2.562E+06

SD	1.767E+06
SE Mean	532883
C.V.	68.974
Minimum	1.047E+06
Maximum	5.826E+06

Conclusión.- El resultado muestra que se presentó diferencias estadísticas para el CCS entre las concentraciones, y diferencias significativas en las UFC del medio de agar manitol para colonias de staphylococcus aureus menor al 6% mostrando efecto inhibitorio sobre esta bacteria en la mastitis bovina, y el conteo de células somáticas.

BIBLIOGRAFIA.-

Ceron-Muñoz M, H Tonhati, J Duarte, J Oliveira, M Muñoz-Berrocal, HJurado-Gámez. 2002. Factors affecting somatic cell counts and their relations with milk and milk constituent yield in buffaloes. J. Dairy Sci.85, 2885-2889.

ESPAC. Obtenido de http://www.ecuadorencifras.gob.ec//documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2014_2015/2014/Presentacion%20de%20resultados%20ESPAC_2014.pdf.

Aguilar, A.A., Bañuelos, P.J, Pimienta, B.E, Aguilar, F.A, Torres, M.P. 2014. Prevalencia de mastitis subclínica en la Región Ciénega del Estado de Jalisco. Abanico Veterinario, 4(1) 24-31.

Zadoks, R.N. 2002. Molecular and mathematical epidemiology of Staphylococcus aureus and Streptococcus uberis mastitis in dairy herds. Dissertation Utrecht University Medicine: 2-3, 239.

Rossitto, P.V., Ruiz, L., Kikuchi, Y., Glenn, K., Ruiz, K., Watts, J.L., Cullor, J.S. 2002. Antibiotic susceptibility patterns for environmental streptococcus isolated from bovine mastitis in central California dairies. J. Dairy Sci. 85: 132-138.

Bedolla, C., Castañeda, V., Wolter, W. 2007. Métodos de detección de la mastitis bovina, Revista electrónica de veterinaria REDVET, 8(9).

Bolaños, F.O. 2012. Mastitis bovina: generalidades y métodos de diagnóstico. REDVET; 13(11).

Raspanti, CG, Bonetto, C.C., Vissio, C., Pellegrino, M.S., Reinoso, E.B., Dieser, S.A., Bogni, C.I., Larriestra, A.J., Odierno, L.M. 2016. Prevalencia y susceptibilidad a los antibióticos de coagulasa negativa Staphylococcus

especies de mastitis subclínica bovina en ganado vacuno lechero en la región central de Argentina. Revista argentina de microbiología, 48(1), 50-56

[Concepción García Luján](#), [Fernando Castro Barraza](#), [Aurora Martínez Romero](#)

Mastitis y otras enfermedades causadas por Mycoplasma spp.

[Agrofaz: publicación semestral de investigación científica](#), ISSN 1665-8892, [Vol. 6, Nº. 2, 2006](#), págs. 153-162

Penicillin-Mechanism. Chemical Society. HTML (Online) URL. http://www.Chemsoc.org/exemplarchem/entries/2002/stanley/06_Mechanism/Mechanism.htm Consultado noviembre de 2003

Wright AJ. Mayo Clin Proc. (1999) Division of infections diseases and internal Medicine, Review. Mayo Clinical Rochester. Minnesota 55905. USA. Mar; 74(3) 290-307

COSTA, D.A.; REINEMANN, D.J. El propósito de la rutina de ordeño. 2004. Instituto Babcock, Universidad de Wisconsin. Ordeño y Calidad de Leche No. 407. En Línea:http://babcock.wisc.edu/sites/default/files/documents/productdownload/du_407.es.pdf. 26/03/2012.

CELY, M.; MENESES, R. Aislamiento e identificación de bacterias presentes en caso de mastitis subclínica en hatos lecheros en el municipio de Belén. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Tunja, Boyacá. Trabajo de Grado. Pp 68. 2004.

SALVIA-TRUJILLO, L.; ROJAS-GRAÜ, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. (2015). Physicochemical characterization and antimicrobial activity of foodgrade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. Food Hydrocolloids, 43: 547 – 556.

W. C. Hsieh, C. P. Chang, and Y. L. Gao, "Controlled release properties of chitosan encapsulated volatile citronella oil microcapsules by thermal treatments" Colloid. Surface. B., 53, 209-214, 2006.