



UNIVERSIDAD NACIONAL  
**"PEDRO RUIZ GALLO"**  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA  
Y PARASITOLOGÍA**

Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico de  
*Eucalyptus globulus* L. "eucalipto" a diferentes  
concentraciones, en *Staphylococcus aureus* aislados  
de vacas con mastitis.

# TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN:  
**BIOLOGÍA - MICROBIOLOGIA - PARASITOLOGIA**

PRESENTADA POR:

Bach. Judith Elisabeth Alvarado Aguilar  
Bach. Victor Hugo Vásquez Montenegro

**LAMBAYEQUE PERÚ  
2014**



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L.  
"eucalipto" a diferentes concentraciones, en *Staphylococcus aureus* aislados de  
vacas con mastitis.**

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. Judith Elisabeth Alvarado Aguilar

Bach. Víctor Hugo Vásquez Montenegro

Para Optar el Título Profesional de:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Lambayeque – Perú

2014

**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L.  
“eucalipto” a diferentes concentraciones, en *Staphylococcus aureus* aislados de  
vacas con mastitis.**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**Bach. Judith Elisabeth Alvarado Aguilar**

**Bach. Víctor Hugo Vásquez Montenegro**

**APROBADO POR:**



**Dra. Graciela Albino Cornejo**

**PRESIDENTE**



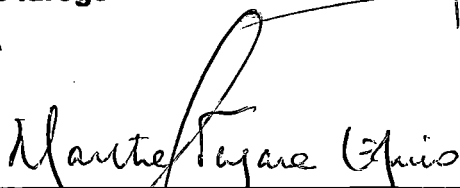
**M.Sc. Consuelo Rojas Idrogo**

**SECRETARIA**



**M.V. Zully Montenegro Esquivel**

**VOCAL**



**Dra. Martha Vergara Espinoza**

**PATROCINADORA**

**Lambayeque – Perú**

**2014**

# DEDICATORIA

Con todo mi cariño y mi amor para mis padres, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos difíciles de mi carrera, gracias por todo papá y mamá por darme una carrera para mi futuro.

A mis hermanos **Thalía y Adrián**, gracias por estar conmigo, compartir los momentos tristes y sobre todo alegres de nuestras vidas, me siento afortunada de ser su hermana, los quiero mucho.

A toda mi familia, porque me han brindado su apoyo incondicional, sus buenos deseos, consejos y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

A todos mis amigos, gracias por esa linda amistad, entre risas, bromas y enojos hemos culminado con éxito nuestra carrera.

A mi compañero de tesis, por su paciencia y su gran apoyo en la realización de este proyecto, fue un gusto trabajar contigo **Víctor Hugo**.

**ALVARADO, JUDITH**

# DEDICATORIA

A **Dora y Manuel**; también a **Sarita**: mi familia. Su fe, su cariño y amor han hecho que cada uno de mis sueños sea una realidad.

A **Martha**; cómplice en este proyecto llamado “biología”, sin tu consejo esto no sería lo que es.

Y a ti: mi fuerza, mi razón. Mi regazo que cuidó y forjó lo que ahora soy:  
**Matilde.**

**VÁSQUEZ, VICTOR**

# AGRADECIMIENTO

Sobre todo a Dios por habernos brindado todo lo necesario, por bendecirnos para llegar hasta donde hemos llegado, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

Asimismo, de manera especial y sincera a la **Dra. Martha Vergara Espinoza** por aceptarnos para realizar esta investigación bajo su asesoramiento. Su conocimiento, experiencia y motivación ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en nuestra formación como investigadores. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos.

También a todos los docentes que durante la carrera profesional han aportado con un granito de arena a nuestra formación, y en especial a la **M.V. Zully Montenegro Esquivel, Dra. Graciela Albino Cornejo y Msc. Consuelo Rojas Idrogo** por sus oportunas correcciones en la revisión y evaluación los que han enriquecido la presente investigación.

A nuestros amigos, que dieron un toque muy especial a esta travesía; y destacando por su disponibilidad y paciencia a **Karina Vega Mendoza** por habernos facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis.

A la **Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo**, por ser nuestra casa durante este tiempo y darnos todas las facilidades para crecer.

Por último, son muchas las personas que han formado parte de nuestra vida profesional a las que nos encantaría agradecerles su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles.

A todos, **MUCHAS GRACIAS**

# INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE ANEXOS

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS .....	3
III.	MATERIALES Y METODOLOGIA .....	9
3.1.	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	9
3.2.	MATERIAL BIOLÓGICO.....	9
A.	Hojas de <i>Eucalyptus globulus</i> L. "eucalipto" .....	9
B.	Cepas bacterianas .....	10
3.3.	METODOLOGIA.....	10
A.	Obtención del Material Biológico .....	10
B.	Obtención del Extracto Hidroalcohólico(Fig. 2) .....	10
C.	Preparación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> L. "eucalipto" .....	12
D.	Efecto inhibitorio in vitro del extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> L. "eucalipto" en <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de vacas con mastitis (Fig.3). ....	12
1.	Estandarización del inóculo bacteriano .....	12
2.	Preparación de discos de sensibilidad .....	12
3.	Prueba de sensibilidad bacteriana según el método modificado de difusión de Kirby Bauer (Kinsbruy, 1991). ....	13
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS .....	15
IV.	RESULTADOS .....	16
4.1.	Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> L., a diferentes concentraciones, frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de vacas con mastitis. ....	16
4.2.	Análisis de Varianza (ANAVA) del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico, de <i>Eucalyptus globulus</i> L. frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , en relación a las concentraciones, tipo de cepa y sus interacciones.....	18
V.	DISCUSIÓN .....	21
VI.	CONCLUSIONES .....	24
VII.	RECOMENDACIONES .....	25
VIII.	RESUMEN .....	26
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	27

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Promedios de los halos de inhibición (en mm) de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> por efecto de extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> L. "eucalipto"...	16
<b>Tabla 2.</b> Análisis de varianza del efecto inhibitorio in vitro del extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> L. frente a <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de vacas lecheras con mastitis.....	18
<b>Tabla 3.</b> Prueba de significancia de Tukey, de los promedios de halos de inhibición por efecto del extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> L. a diferentes concentraciones.....	19
<b>Tabla 4.</b> Prueba de significancia de Tukey, de los promedios de halos de inhibición por efecto del extracto hidroalcohólico sobre cepas bacterianas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	20

## INDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1:</b> Diseño de la investigación experimental .....	9
<b>Fig. 2:</b> Flujograma para la obtención del extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> L. "eucalipto".....	11
<b>Fig.3:</b> Flujograma del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> L. "eucalipto" sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
<b>Fig.4</b> Halos de inhibición del extracto hidroalcioholico de <i>Eucalyptus globulus</i> L. a sus distintas concentraciones frente <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	17



## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 01.</b> Hojas secas de <i>Eucalyptus globulus</i> L.....	33
<b>ANEXO 02.</b> Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de lecheras con mastitis.....	33
<b>ANEXO03.</b> Polvo fino obtenido del triturado de hojas secas de <i>Eucalyptus globulus</i> L. .....	34
<b>ANEXO 04.</b> Extracto líquido de <i>Eucalyptus globulus</i> L. en placas esterilizadas para facilitar la evaporación total del alcohol.....	34
<b>ANEXO 05.</b> Concentraciones del extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> L. “eucalipto” .....	35
<b>ANEXO 06.</b> Gráfica de Análisis de Varianza del efecto del extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> L. a diferentes concentraciones. ....	35
<b>ANEXO 07.</b> Gráfica de Análisis de Varianza del efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico sobre cepas bacterianas de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	36
<b>ANEXO 08.</b> Flavonoides de <i>Eucalyptus globulus</i> L.: A) 8-desmetil-eucalyptin B) Eucalyptin y C) 2',6'-dihidroxi-3'-metil-4'-metoxi-dihidrocalcona .....	37
<b>ANEXO 09.</b> Descripción de Propóleos.....	38
<b>ANEXO10.</b> Halos de inhibición de la prueba piloto del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> L. en <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de vacas con mastitis.....	39

## I. INTRODUCCIÓN

La mastitis bovina es el principal problema de la ganadería lechera a nivel mundial y se considera el mayor problema del sector lácteo (López, 2009). Es la enfermedad bovina de mayor relevancia por la reducción en la producción de la leche, pérdidas por descarte y muerte de animales, elevados gastos en tratamientos, más allá de las consecuencias económicas para la industria de la leche por su cualidad alterada (Quin *et al.*, 2002; Voigth *et al.*, 2011). En el ámbito local, existen referencias que permiten reconocer la participación de diversos microorganismos como causantes de mastitis; las investigaciones realizadas datan de 1981 y se extienden hasta 1996 (Vergara *et al.*, 2005) revelando incidencias de mastitis subclínica que oscilan entre 29,49% y 63,78%.

Los agentes microbianos involucrados en la mastitis son *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y algunos gérmenes gramnegativos, los cuales son responsables de más del 90 % de los casos clínicos y subclínicos; la mastitis por *Staphylococcus aureus*, es una forma común de mastitis bovina en todo el mundo, debido a que los estafilococos son comensales en la piel y mucosas de ahí que colonizan la piel y el canal del pezón, predisponiendo a la infección intramamaria, siendo en su mayoría infecciones subclínica (Elera y Guerra, 2007)

El tratamiento de la mastitis con antibióticos ocasiona altos costos en el pequeño productor; además, esto se complica con la resistencia que adquieren los agentes etiológicos a los fármacos de mayor uso y con el poder residual de algunos fármacos en la leche y sus derivados (Barreto *et al.*, 2006). Toda esta situación muestra la necesidad de iniciar la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que resulten ser eficaces, de bajo costo y fácil aplicación para el tratamiento de la mastitis (López, 2009).

El uso de los extractos naturales provenientes de plantas ha sido sugerido tanto para el tratamiento de mastitis como para la desinfección de las tetas (Voigt *et al.*, 2011); es así, que se ha evaluado la actividad antibacteriana de ciertas especies vegetales como: *Anacardium occidentale* L. (Fonseca *et al.*, 2009) *Lippia graveolens*, *Piper jacquemontienum* y *Psidium guajava* (López, 2009), propoleos (Pinto *et al.*, 2001; Rodríguez, 2012) y especies de eucalipto (Barreto *et al.*, 2006), en microorganismos causantes de mastitis en vacas lecheras. Frecuentemente especies de eucalipto han sido usados en el tratamiento de afecciones respiratorias; sin embargo, *Eucalyptus globulus* L. es usado en el campo, preparado y aplicado en compresas para el tratamiento de la mastitis bovina.

En el departamento de Lambayeque no se han ejecutado estudios que revelen la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* causante de mastitis bovina por productos vegetales, lo que conllevó a formular la interrogante ¿Tiene efecto inhibitorio *in vitro* el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto”, a diferentes concentraciones, en *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis?. Frente a esto y con el fin de contribuir con el conocimiento del control de la mastitis con productos extraídos de plantas e incentivar investigaciones futuras que permitan conocer el efecto del producto en el ganado bovino, surgió el objetivo de estudio:

- Determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto”, a diferentes concentraciones, en *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis.

## II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

La mastitis es la inflamación de la glándula mamaria en respuesta a un daño local que puede ser de origen infeccioso, traumático o tóxico. Se estima que un tercio de las vacas lecheras están afectadas por cualquier forma de mastitis en uno o más cuartos. Se considera como una enfermedad compleja y es producto de la interacción de varios factores resumidos en el animal, el medio ambiente y los microorganismos, jugando el hombre un papel decisivo (Soca *et al.* 2005; Bray y Broadus 2006).

La gran mayoría de los casos de mastitis son de origen microbiano, dentro de los cuales encontramos a los patógenos contagiosos y los ambientales. Los principales agentes patógenos causales de la mastitis contagiosa son: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, mientras que las infecciones por patógenos ambientales están dadas fundamentalmente por *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* y *Pseudomonas*. También se encuentra una flora oportunistas o patógenos menores como los *Staphylococcus coagulasa negativa* (Porporato y Felipe, 2011). La mastitis causada por *Staphylococcus aureus*, es una forma común de mastitis bovina en todo el mundo que puede ser subclínica, aguda o crónica. La mayoría de infecciones son subclínica. Las formas sobreaguda y gangrenosa se asocia a reacciones sistémicas severas y pueden ser mortales (Quin *et al.*, 2002).

Elera y Guerra (2007) encontraron en vacas lecheras del centro productivo de la Universidad Nacional de Piura a *Staphylococcus aureus* (65% de cuartos mamarios), *Streptococcus agalactiae* (35%) y *Streptococcus dysgalactiae* (35%) antes del tratamiento con yodo y *Staphylococcus aureus* (61.9%), *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus dysgalactiae* (35.7%) y *Escherichia coli* (2,4%) después del tratamiento con yodo. Así mismo determinaron 90,9% de vacas positivas al crecimiento bacteriano antes del tratamiento y 68,2% después del tratamiento.

En todas las provincias del departamento de Lambayeque, Guevara (1997) identificó como bacterias grampositivas productoras de mastitis bovina subclínica a: *Staphylococcus aureus* (39,04%), *Staphylococcus epidermidis* (33,47%), *Staphylococcus spp.*(7,17%), *Streptococcus agalactiae* (6,37%) y *Streptococcus dysgalactiae* (2,79%), y entre las gramnegativas, la más frecuente fue *Escherichia coli* (2,79%). Además reportó que la mastitis bovina subclínica fue mayor en vacas que cursaban el tercer periodo de lactación (95%) y que los porcentajes de positividad fueron 80% y 20% en las vacas con ordeño manual y mecánico respectivamente.

En Lambayeque, Delgado y Vergara (2000) y Vergara *et al.*, (2005) afirmaron que entre 1981 y 1996 la incidencia de mastitis subclínica bovina tuvo un rango entre 29,49% y 83,33% y que en el año de 1966 alcanzó un porcentaje del 63,78%; así mismo informaron que en la provincia de Ferreñafe la incidencia fue 88,89% a diferencia de Lambayeque y Chiclayo que tuvieron 53,33% y 68,35% respectivamente. También encontraron que los agentes microbianos más implicados en dicha infección fueron *Staphylococcus aureus* (39,04%), *Staphylococcus epidermidis* (33,47%), *Staphylococcus spp.* (7,17%), *Streptococcus agalactiae* (6,37%) y *Escherichia coli* (2,79%).

En este contexto, el tratamiento antimicrobiano es la forma más común de combatir la mastitis, sin embargo presenta ciertos inconvenientes: ocasiona residuos en la leche que constituyen riesgos para la salud humana, afecta las producciones de diversos derivados lácteos y genera la aparición, cada vez más frecuente, de cepas antibiorresistentes (Barreto *et al.*, 2006). Debido a estas limitantes, se realizan investigaciones para la obtención de antisépticos mamarios a partir de fuentes naturales que sean seguros para los animales y el hombre (National Center of Animal and PlantHealth, 1996).

Así, la fitoterapia se convierte en una práctica terapéutica alternativa que se basa en el uso de plantas medicinales y de sus extractos y entra en el gran grupo de las medicinas alternativas o complementarias (Pignatelli, 2009). Es así que su progreso en los últimos años se ha debido al conocimiento de los principios activos; ciertas especies vegetales han sido abundantemente utilizadas en el pasado para el tratamiento de numerosas patologías de los animales criados (Bullitta *et al.*, 2007) y aun representa hoy en día una herramienta indispensable en el manejo de crías extensivas en los países en desarrollo. Las aplicaciones en zootecnia y en medicina veterinaria de las plantas medicinales y sus derivados, son múltiples y atadas a la actividad específica (antiinflamatoria, antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, diurética, colagoga, etc.) de los numerosos principios activos en ellas contenidos (fitocomplejo) y del sinergismo entre los mismos (fitopreparaciones) (Grosso, 2010)

Para conocer los compuestos o sustancias químicas de una planta es necesario un método de extracción en el cual se requiera de alguna sustancia apropiada. Voight (1982), demostró que el alcohol no produce gelificación de las membranas celulares de las plantas y que por el contrario favorece la estabilidad de las sustancias medicamentosas disueltas; también mencionó que el agua posee notable fuerza de extracción de numerosas sustancias de interés terapéutico. La mezcla de disolventes

polares y apolares ofrece además, ventajas para extraer diversos compuestos como flavonoides, taninos, fenoles y otros metabolitos secundarios de las plantas. (García, 2001 y Martínez, 2005).

De este modo, López en el 2009 evaluó el efecto antibacteriano *in vitro* de seis especies de plantas de uso medicinal sobre bacterias causantes de mastitis en vacas lecheras empleando el método de dilución en tubo. Determinó que extractos etanólicos de *Lippia graveolens*, *Psidium guajava* y *Smilax domingensis* y los extractos diclorometánico y metanólico de *Piper jacquemontianum* presentaron actividad inhibitoria sobre todas las bacterias probadas (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysagalactiae* y *Staphylococcus intermedius*); los extractos etanólicos de *Alcalypha guatemalensis* y de *Solanum americanum* no inhibieron a *Streptococcus dysagalactiae*, así mismo no tuvieron efecto inhibitorio sobre *Streptococcus agalactiae* sobre *Staphylococcus intermedius* respectivamente.

En estudios realizados por Fonseca *et al.*, en el 2009 determinó que decocciones de *Pseudobombax margintum* y *Luffa operculata* Cogn no tuvieron acción antibiótica sobre bacterias aisladas de leche de vacas con mastitis. En tanto, *Caesalpinia pyramidalis* presentó acción bacteriostática mas no combatió totalmente a los patógenos y solo con *Anacardium occidentale* L. se observó la mayor actividad antimicrobiana.

Así también en la investigación de Da Silva, *et al* (2011) los extractos hidroalcoholicos de hojas secas de *Piper regnelli* Miq. con etanol al 96% y hojas frescas de *Rosmarinus officinalis* L. con etanol al 70% sobre *Staphylococcus spp.*, separados como Coagulasa positivo y Coagulasa negativo aisladas de leche de vacas mastíticas, utilizando la técnica de microdilución, encontraron que ambos extractos son eficaces en las 10 cepas utilizadas.

Otras investigaciones destacan el uso de propóleos contra agentes bacterianos productores de mastitis así, en Pinto *et al.* (2001) evaluaron el efecto de extractos de propóleo verde a base de agua, etanol, metanol, acetato de etilo y cloroformo, a una concentración de 100 mg/ml. sobre bacterias patógenas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus sp.* coagulasa negativos y *Streptococcus agalactiae* aisladas de leche de vacas con mastitis. En *Staphylococcus aureus* se logró diámetros entre 8,66 y 11,16 mm con el extracto a base de etanol y; 8,16 y 9,33 mm de diámetros con el extracto a base de metanol. Los extractos acuosos, acetato de etilo y cloroformo no presentaron efecto antibacteriano sobre las bacterias estudiadas. De igual manera Rodríguez, (2012), evaluó el efecto antibacteriano de propóleos en extracto etanólico al 7%, miel en solución acuoso al 20% y una mezcla entre ellos a proporción 1:1, sobre cepas nativas

de *Staphylococcus coagulasa* negativo aisladas de vacas con mastitis, concluyendo que solo el extracto etanólico de propóleos resultó ser efectivo sobre la totalidad de las cepas utilizadas a volúmenes de 5, 10 y 25 µl con un promedio de halo de inhibición de 10,6; 12,4 y 16,2mm respectivamente.

De otro lado, un aceite esencial está constituido por un número amplio de compuestos químicos, lo más probable es que su acción antibacteriana no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a una sinergia entre todos los componentes. Una característica importante que presentan los aceites esenciales es su hidrofobicidad, lo que les permite adherirse a la membrana de la célula bacteriana, afectando su presión y por consiguiente la hace más permeable ocasionando la fuga de iones presentes al interior de la célula. Básicamente el efecto antimicrobiano que ejerce un aceite esencial se debe a su efecto a nivel de la perturbación de la membrana citoplasmática, la alteración de la fuerza motriz de protones y el flujo de electrones. Los daños a la pared y membrana de la célula ocasionan la fuga de macromoléculas y por consiguiente la lisis. En general, el efecto antimicrobiano se debe principalmente a la presencia de fenoles, aldehídos y alcoholes (Yañez y Cuadro, 2012).

*Eucalyptus globulus* L., “eucalipto” pertenece a la familia Myrtaceae, que comprende árboles gigantes y perennes de hasta 60 m de altura, de copa alta, piramidal, con corteza blanquecina, las hojas jóvenes son sésiles, ovaladas y grisáceas, alargándose y tornándose coriáceas y de un color verde azulado brillante de adultas; están difundidos por todo el planeta y, desde hace muchos años, se les considera útiles en todos los conceptos. Sus hojas están inundadas de numerosos espacios lisígenos repletos de diversas sustancias a lo cual se debe el aroma característico, entre estas sustancias se encuentran los taninos, resinas, ácidos grasos, aceites esenciales compuestos por pineno o eucaliptol en un 80 %, d-pineno, canfeno, los aldehídos: valerianico, butílico, caproico, los alcoholes: etílico y amílico, los ácidos fórmico y acético esterificados; que lo hacen un poderoso desinfectante natural (Barreto *et. al*; 2006; Llatas, 2008; InBUy, 2011).

Muchas investigaciones han demostrado que los extractos de hojas exhiben diversos efectos biológicos, tales como antibacteriano, antihiper glucémico y actividad antioxidante. También se utilizan en infusión contra la bronquitis y los catarros de las vías respiratorias, friccionadas en las articulaciones para aliviar del reumatismo; además de “pastas de eucalipto” envasadas con fines medicinales (Takahashi *et al.*, 2004; Llatas, 2008).

Es así que, en estudios efectuados por Liu *et al.* (2002) donde evaluaron la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus sp.* "eucalipto" en cepas bacterianas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp.* y *Shigella flexneri*), utilizando como solvente de extracción una mezcla de alcohol-acetona (1:1) y la actividad biológica de los extractos obtenidos se evaluaron mediante la técnica de difusión en disco; donde se logró el efecto inhibitorio de *Caesalpinia spinosa* y *Eucalyptus ssp.* solo en bacterias Gram positivas

Mediante el ensayo de microdilución en placa Salazar *et al.* (2009) determinó la actividad antimicrobiana de 10 productos herbolarios que contenían *Allium sativum*, *Peumus boldus*, *Eucalyptus globulus* L., *Mentha piperita* y *Salvia officinalis*. Ninguno de ellos presentó actividad contra *Escherichia coli* con la máxima concentración analizada (1000 ug/mL), sin embargo seis productos que contenían *P. boldus*, *E. globulus* y *S. officinalis* fueron los más activos contra *Staphylococcus aureus* (MIC 500 a 62.5 mg/mL).

Asimismo, con el objetivo de obtener antisépticos mamarios se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de tinturas de cortezas de *Eucalyptus citriodora* Hook y *Eucalyptus saligna* Sm. sobre 2 cepas de *Staphylococcus aureus* (referente y salvaje). La cepa autóctona era resistente a penicilina y gentamicina e intermedia a estreptomina. Los extractos de *Eucalyptus citriodora* Hook (20 y 83% de alcohol) resultaron más eficaces que sus similares de *E. saligna* Sm. y ambos superiores a los antibióticos penicilina y gentamicina, además no hubo diferencia significativa en la sensibilidad de ambas cepas hacia los extractos evaluados. (Barreto *et al.*, 2006).

En *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* se evaluaron extractos hidroalcohólicos de *Baccharis trimera* (Less) DC, *Bidens pilosa* L., *Eucalyptus sp.* Y *Tagetes minuta* L. Se obtuvieron extractos de hojas frescas con alcohol a 92,8° y de hojas secas con alcohol a 70 y 50°. La actividad antibacteriana de cada extracto se midió por la capacidad de inactivación de  $10^5$  -  $10^6$  UFC/mL de cada bacteria, en 3 tiempos de contacto, 30 s, 5 y 20 min. En relación a *Eucalyptus sp.* Todos los extractos inactivaron a *S. aureus* a los 20 min. Sin embargo, el extracto obtenido de las hojas frescas resultó el único capaz de inactivar del todo a *S. aureus* a los 5 min (Voigt, *et al.* 2011).

En un estudio de cinética de la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos naturales de las hojas y tallos de *Baccharis trimera* DC, *Eucalyptus sp* L., y *Tagetes minuta*, contra microorganismos aislados de vacas con mastitis *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Pseudomonas aeruginosa*, empleando como control positivo a la clorhexidina al 0,18 %. Obtuvieron que los extractos naturales mostraron mayor



actividad antibacteriana contra microorganismos Gram positivos, además *Baccharis trimera* DC, *Eucalyptus* sp L., tiene efecto estadísticamente similar a la clorhexidina al 0,18 % ( $p > 0,05$ ) (Dame *et al.* 2008).

Otros investigadores como Yáñez y Cuadro (2012) ampliaron los estudios en *Eucalyptus globulus* L. y *E. camaldulensis* evaluando actividad antimicrobiana de sus aceites esenciales frente a cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*. Por medio de las técnicas de difusión en disco y microdilución en caldo se pudo evidenciar que el aceite esencial extraído a partir de hojas secas, de *Eucalyptus globulus* L. es el que tuvo mayor efecto antibacterial, obteniéndose menores CMI frente a las bacterias grampositivas, tales como: *E. faecalis*, *B. subtilis* y *S. aureus* con valores de 23.4 µg/mL, 16.5 µg/mL, 12.4 µg/mL respectivamente.

### III. MATERIALES Y METODOLOGIA

#### 3.1. POBLACIÓN Y MUESTRA

La muestra fue cuantificada por el resultado de la interacción de 10 cepas de *Staphylococcus aureus*, sometida a 5 concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/ml de extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto", cada experiencia fue sometida a tres repeticiones constituyendo así 150 unidades experimentales (Fig.1).

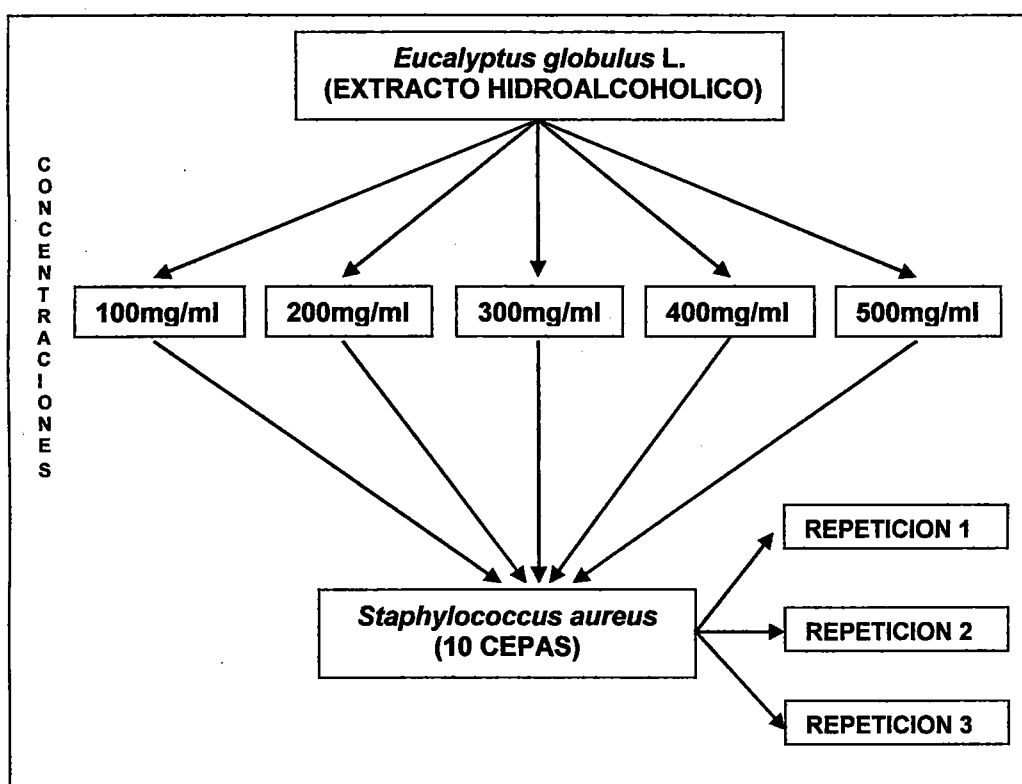


Fig.1: Diseño de la investigación experimental

#### 3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

##### A. Hojas de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto"

Hojas de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto" (ANEXO 01) colectadas de árboles del Distrito de Niepos - Cajamarca, el cual está situado 2 446 metros sobre el nivel del mar (msnm).

## **B. Cepas bacterianas**

10 cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis (ANEXO 02).

### **3.3. METODOLOGIA**

#### **A. Obtención del Material Biológico**

##### **1. Hojas de *Eucaliptus globulus* L. “eucalipto”**

Las ramas fueron recolectadas a una altura de 1 m con respecto al suelo. En todos los casos poseían un color uniforme y estuvieron libres de presencia de musgos, se identificó la planta en el Departamento Académico de Botánica, Facultad Ciencias Biológicas – UNPRG, por el Dr. Santos Regulo LLatas Quiroz. De las ramas se aislaron hojas, para su posterior tratamiento en la obtención del extracto hidroalcohólico.

##### **2. Cepas Bacterianas**

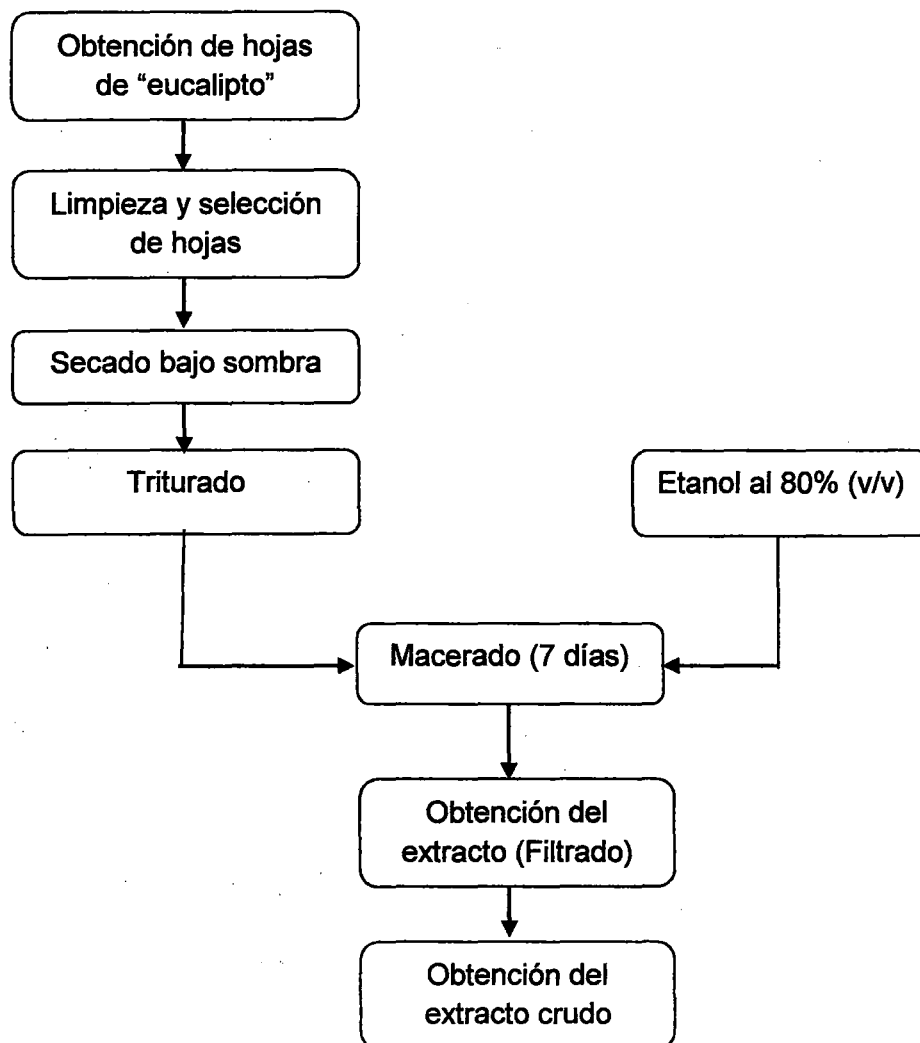
Las 10 cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNPRG.

#### **B. Obtención del Extracto Hidroalcohólico(Fig. 2)**

Se utilizó la metodología descrita por Barreto y Campal, (2001) y De Paula y Martins, (2000)

- Se recolectaron 3Kg. de hojas de *Eucaliptus globulus* L. “eucalipto”.
- La materia vegetal fue limpiada manualmente con agua destilada para la liberación de sustancias extrañas.
- Posteriormente se secaron a temperatura ambiente bajo sombra por un periodo no menor a 7 días.
- Las hojas se trituraron en un mortero hasta obtener un polvo fino de masa seca (ANEXO 03).
- 50g de masa seca fue macerada en 500mL de etanol al 80 % (v/v) durante 7 días a temperatura ambiente.
- Transcurrido el tiempo de maceración se realizó el filtrando del macerado en tocuyo fino esterilizado.
- El filtrado se distribuyó en placas esterilizadas para facilitar la evaporación total del alcohol (ANEXO 04).

- El extracto crudo obtenido fue transferido a un frasco esterilizado y se guardó en refrigeración, protegiéndolo de la luz solar, hasta su utilización.



**Fig.2:** Flujograma para la obtención del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto".

**C. Preparación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucaliptus globulus* L. “eucalipto”**

- Tal como se muestra en la tabla, para obtener la concentración de 100mg/mL se pesó 1g del extracto seco en un recipiente esterilizado y se enrazó a 10mL con etanol al 40% (v/v) como solvente.
- De igual modo se procedió para obtener las concentraciones de 200, 300, 400 y 500 mg/mL agregando 2, 3, 4 y 5 g del extracto seco en 10mL de etanol al 40% respectivamente (ANEXO 05).

Peso de masa cruda (g)	Vol. Solvente (ml)	Concentración (mg/ml)
1,00	10,00	100
2,00	10,00	200
3,00	10,00	300
4,00	10,00	400
5,00	10,00	500

**D. Efecto inhibitorio in vitro del extracto hidroalcohólico de *Eucaliptus globulus* L. “eucalipto” en *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis (Fig.3).**

**1. Estandarización del inóculo bacteriano**

Consistió en la reactivación de las cepas en estudio (*Staphylococcus aureus*) en 5mL de caldo nutritivo, incubado a 37°C de 4-6 horas, con la finalidad de alcanzar una turbidez igual al tubo N° 0.5 del nefelómetro de Mc Farland, para obtener una concentración equivalente a  $1.5 \times 10^8$  ufc/ml de modo que se trabajó con una biomasa estándar en todos los ensayos.

**2. Preparación de discos de sensibilidad**

- Se utilizó papel Whatman N°01 del cual se obtuvo discos de 5 mm de diámetro con ayuda de un perforador.
- Los discos se colocaron dentro de viales y fueron esterilizados en autoclave (15 Lb. de presión a 121°C por 15 minutos)
- Se dejó secar en horno a 60°C por 24 horas.

- Posteriormente los discos se embebieron en las diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400 y 500 mg/ml) del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto" y se dejó en reposo por 5 minutos para luego realizar la prueba de susceptibilidad.

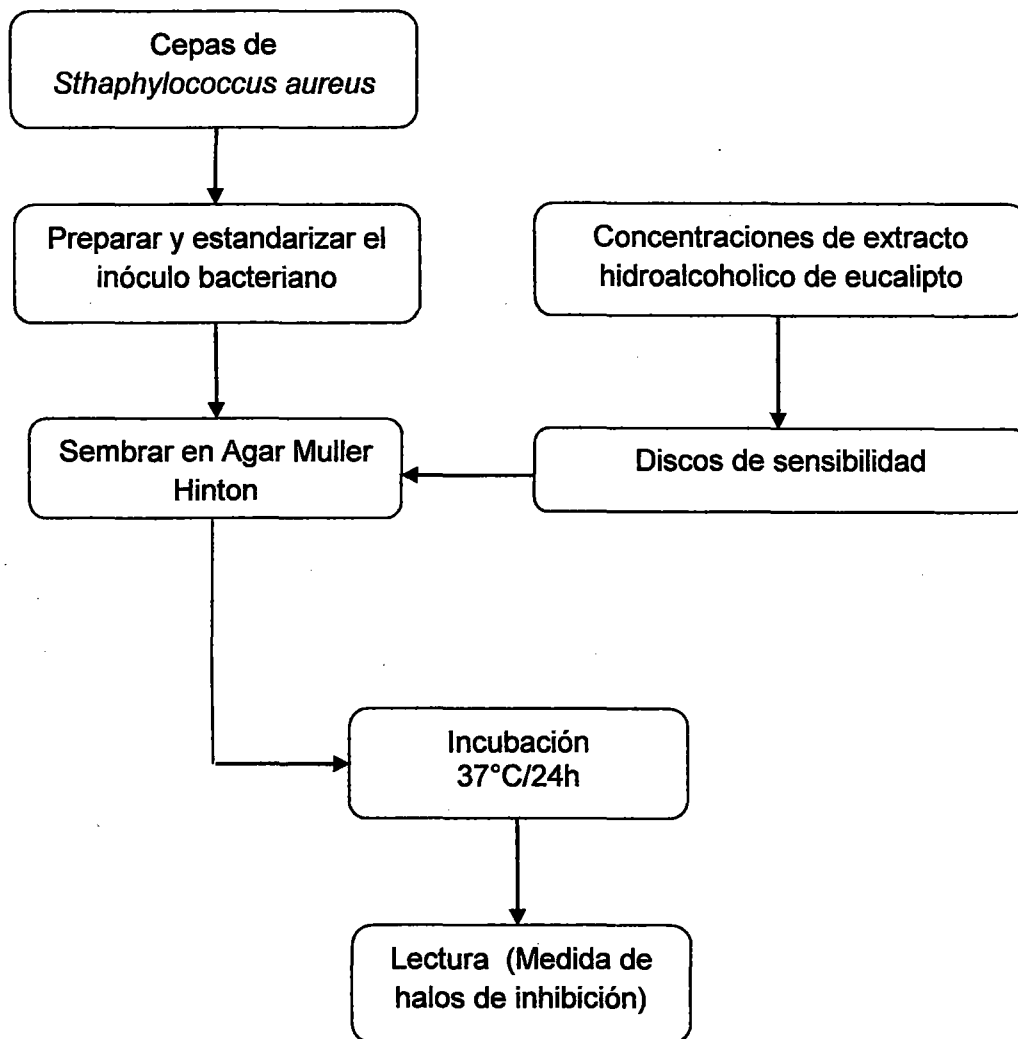
**3. Prueba de sensibilidad bacteriana según el método modificado de difusión de Kirby Bauer (Kinsbruy, 1991).**

**A. Siembra del inóculo:**

- En placas servidas con 10 mL. aproximadamente de agar Müller Hinton y puestas a control de esterilidad por 24 horas, se procedió a sembrar superficialmente el inóculo bacteriano estandarizado embebido en un hisopo estéril.
- La placa con el agar ya sembrado se dejó secar por espacio de 5 minutos

**B. Exposición del inóculo al extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto"**

- Los discos impregnados en las cinco concentraciones del extracto hidroalcohólico de eucalipto, fueron colocados en la placa con el agar ya sembrado a una distancia de 15-20mm. También se colocó un disco control embebido en etanol al 40% (solvente empleado).
- Posteriormente las placas se llevaron a incubación a 37°C/24 horas.
- Transcurrido el tiempo se midieron los halos de inhibición (mm), registrando la medida para cada una de las cepas.



**Fig.3:** Flujograma del efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. “eucalipto” sobre *Staphylococcus aureus*.

### 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

La presente investigación fue de tipo experimental, ajustada a un diseño de estímulo creciente (Alvitres, 2000); en el que *Eucaliptus globulus* L. en extracto hidroalcohólico se empleó en concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/ml para evaluar el efecto inhibitorio.

De acuerdo con este diseño la variable independiente estuvo constituida por las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucaliptus globulus* L., mientras que la variable dependiente estuvo constituida por la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Los datos obtenidos fueron tratados estadísticamente mediante el Análisis de Varianza (ANAVA) del factorial 10x5, donde 10 fueron las cepas bacterianas; 5 las concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucaliptus globulus* L. El ANAVA se realizó con la finalidad de determinar si la inhibición bacteriana fue por efecto de la concentración del extracto hidroalcohólico del eucalipto o del tipo de cepa empleado.

El análisis se complementó con la Prueba de Tukey para definir el efecto por concentración específica 100, 200, 300, 400 y 500 mg/ml o tipo cepa SA1, SA2, SA3, SA4, SA5, SA6, SA7, SA8, SA9 y SA10 de *Staphylococcus aureus*.



# IV. RESULTADOS

## 4.1. Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L., a diferentes concentraciones, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis.

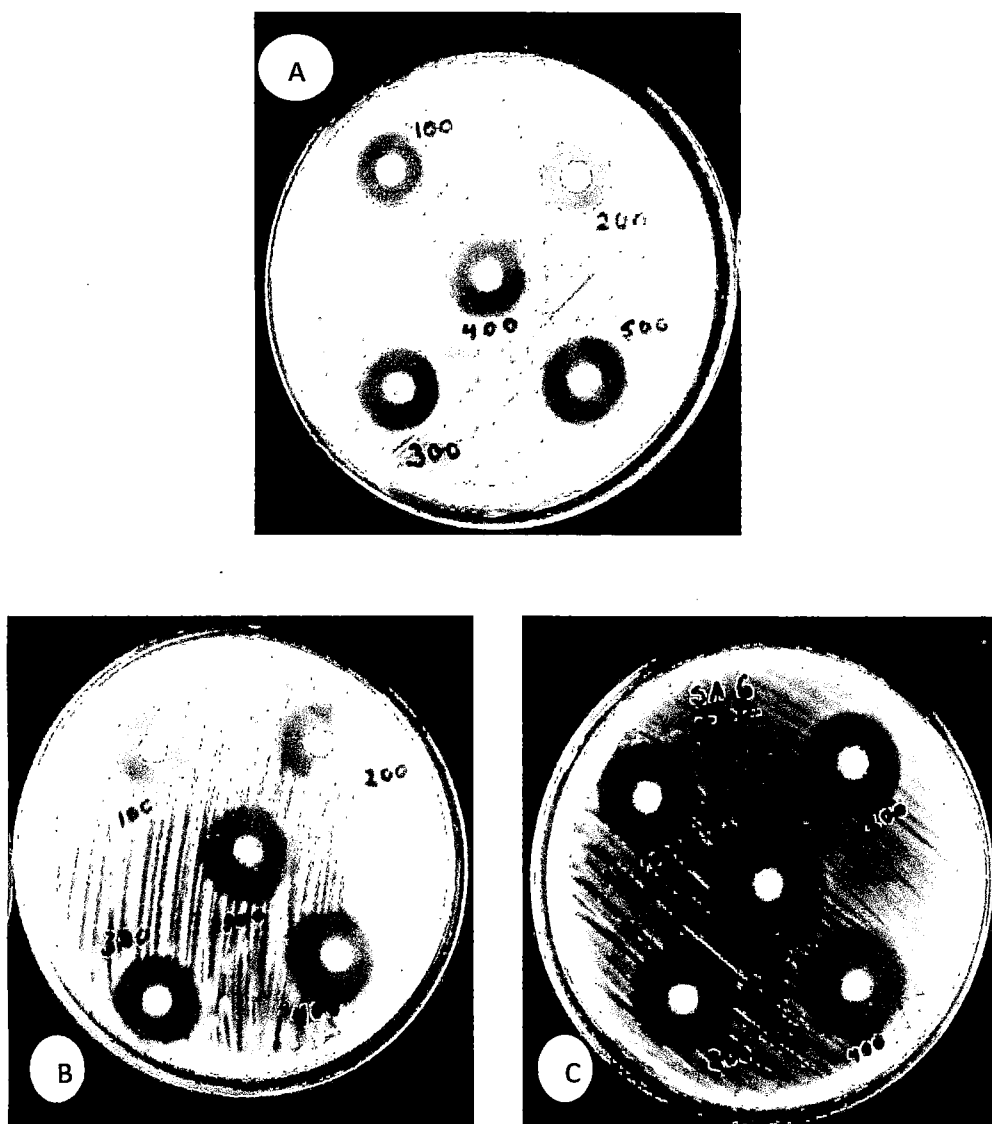
Se muestra en la Tabla 1 que la sensibilidad de las cepas aumentó en relación directa a la concentración (mg/ml) del extracto de eucalipto; donde la menor concentración (100mg/ml) alcanzó un halo de inhibición 14.00 mm en las cepas SA10 (Fig. 4 A), en tanto que la mayor concentración (500mg/ml) logró un halo de inhibición de 23.33 mm en las cepas SA4 y SA6. (Fig. 4 B y C)

Además se aprecia que de todas las cepas de *Staphylococcus aureus* la cepa SA10 fue la que mostró mayor resistencia frente a todas las concentraciones del extracto, mientras que la cepa que mostro mayor sensibilidad en la mayoría de las concentraciones fue SA2.

**Tabla 1.** Promedios de los halos de inhibición (en mm) de cepas de *Staphylococcus aureus* por efecto de extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto"

Concentración del extracto (mg/ml)	Promedios de halos de inhibición (mm) Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>									
	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6	SA7	SA8	SA9	SA10
100	15,67	16,67	15,00	16,33	14,33	15,67	15,00	14,67	14,67	14,00
200	17,00	18,33	17,61	17,67	16,00	16,67	16,00	15,67	15,67	15,00
300	17,67	18,67	17,61	18,67	17,00	17,67	17,00	16,33	16,67	15,67
400	18,33	19,67	19,00	19,00	18,00	18,67	18,00	18,00	17,67	16,67
500	20,00	19,33	19,33	20,33	20,00	20,33	19,67	18,67	18,67	17,67

**Leyenda:** SA1, SA2, SA3, SA4, SA5, SA6, SA7, SA8, SA9 y SA10: cepas de *Staphylococcus aureus*



**Fig.4:** Halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. en cinco concentraciones frente *Staphylococcus aureus*.

A) Cepa SA10    B) Cepa SA4    C) Cepa SA6

**4.2. Análisis de Varianza (ANAVA) del efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico, de *Eucaliptus globulus* L. frente a *Staphylococcus aureus*, en relación a las concentraciones, tipo de cepa y sus interacciones.**

Según el análisis de varianza realizado a los resultados, en la Tabla 2 puede observarse la existencia de diferencias significativas entre los promedios de los halos de inhibición del crecimiento de las cepas, en la variación del efecto producido por las concentraciones y el tipo de cepa; sin embargo, la interacción de dichos factores no presenta diferencias significativas.

**Tabla 2.** Análisis de Varianza de los promedios de halos de inhibición (mm) de cepas de *Staphylococcus aureus* por efecto de extracto hidroalcohólico de *Eucaliptus globulus* L. "eucalipto".

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrados medios	Fc	Ft ( $\alpha=0.05$ )	Decisión
Concentración	305,589	4	76,397	36,250	2,463	Rechazar Ho <sub>1</sub>
Cepas	102,188	9	11,354	5,388	1,975	Rechazar Ho <sub>2</sub>
Concentración*Cepa	19,573	36	0,544	0,258	1,535	Aceptar Ho <sub>3</sub>
Error	210,750	100	2,108			

- Diferencia significativa:  $F_c > F_t$ ; donde: Fc: factor calculado y Ft: fac. tabulado.
- Dif. No Significativa:  $F_c < F_t$ ; Gl: Grados de libertad

**Hipótesis:**

**Ho<sub>1</sub>:**  $C_{100}=C_{200}=C_{300}=C_{400}=C_{500}$

**Ho<sub>2</sub>:**  $SA1=SA2=SA3=SA4=SA5=SA6=SA7=SA8=SA9=SA10$

**Ho<sub>3</sub>:** Todas las interacciones cepa x concentración tienen el mismo efecto sobre el halo de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*

De manera complementaria la prueba de significancia realizada determinó la dependencia de los promedios de los halos de inhibición de acuerdo a las fuentes de variación del análisis. Así se demuestra en la Tabla 3 y ANEXO 06 la diferencia significativa entre las concentraciones del extracto hidroalcohólico, siendo estas directamente proporcional al promedio de halo de inhibición, por lo cual la concentración 500mg/ml produjo en mayor halo de inhibición con el promedio 19.29mm.

**Tabla 3.** Prueba de significancia de Tukey, de los promedios de halos de inhibición por efecto del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. a diferentes concentraciones.

<b>Concentración (mg/ml)</b>	<b>Promedio de halo (mm)</b>	<b>Nivel de significancia</b>	
<b>100</b>	15,20	a	
<b>200</b>	16,62	b	
<b>300</b>	17,30	b	c
<b>400</b>	18,27		c
<b>500</b>	19,29		d

- Letras iguales: No hay diferencia significancia
- Letras diferentes: Hay diferencia significancia

En la Tabla 4 y ANEXO 07, se muestra las diferencias entre cada una de las cepas bacterianas de acuerdo al halo producido por las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico, siendo la cepa SA10 la menos sensible y la cepa SA2 la de mayor sensibilidad obteniendo mayor promedio de halo de inhibición (18.53 mm)

**Tabla 4.** Prueba de significancia de Tukey, de los promedios de halos de inhibición por efecto del extracto hidroalcohólico sobre cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*.

<i>Cepas</i>	<i>Promedio de halos (mm)</i>	<i>Nivel de significancia</i>		
<b>SA10</b>	15,80	a		
<b>SA9</b>	16,67	a	b	
<b>SA8</b>	16,67	a	b	
<b>SA5</b>	17,07	a	b	c
<b>SA7</b>	17,13	a	b	c
<b>SA1</b>	17,73		b	c
<b>SA3</b>	17,73		b	c
<b>SA6</b>	17,80		b	c
<b>SA4</b>	18,40			c
<b>SA2</b>	18,53			c

- Letras iguales: No hay diferencia significancia
- Letras diferentes: Hay diferencia significancia

## V. DISCUSIÓN

El presente estudio experimental demostró que el extracto hidroalcohólico de *Eucaliptus globulus* L., a diferentes concentraciones, tiene efecto inhibitorio *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis. Dicho efecto es directamente proporcional a la concentración del extracto, variando ligeramente entre las cepas, siendo los resultados estadísticamente significativos.

Esta acción bactericida se debe a que *Eucaliptus globulus* L. contiene sustancias como taninos, resinas, ácidos grasos, fenoles, los alcoholes: etílico y amílico, flavonoides, los ácidos fórmico y acético esterificados (Barreto *et al.* 2006; InBUy, 2011; Rendon, S y Torres, N. 2012) los que dañan la pared y membrana celular alterando su permeabilidad y ocasionando su lisis (Yañez y Cuadro, 2012). Así mismo los solventes polares (como el etanol, el agua) extraen flavonoides hidroxilados (García, 2001) como, 2',6'-dihidroxi-3'-metil-4'-metoxi-dihidrocalcona; eucalyptin y 8-desmetil-eucalyptin (ANEXO 8), que se difunden fácilmente a través de paredes celulares con bajo contenido de lipopolisacarido como el de las bacterias grampositivas, que son tóxicos para la célula. (Takahashi *et al.*, 2004; y Domingo y López, 2003).

Los resultados del presente estudio concuerdan con el trabajo de Liu, *et al.* 2002 que concluyeron que el extracto a base de alcohol-acetona (1:1) de *Eucaliptus sp.* tiene efecto inhibitorio frente a bacterias Grampositivas. De igual manera, la investigación de Dame *et al.* 2008 mostró que los extractos naturales de hojas y tallos de *Eucalyptus sp.*, *Baccharis trimera* DC, y *Tagetes minuta* tienen mayor actividad antibacteriana contra microorganismos Gram positivos. También en resultados obtenidos por Salazar *et al.* 2009 determinó que extractos acuosos de productos que contenían *Eucaliptus globulus* L., *Peumus boldus* o *Salvia officinalis* fueron los más activos contra *Staphylococcus aureus* (MIC: 500 a 62.5 mg/mL).

De otro lado, el comportamiento independiente que muestran las cepas frente al extracto hidroalcohólico, donde la cepa SA2, la de mayor sensibilidad (18.53mm de halo) comparada con SA10 que alcanzó un halo de inhibición de 15.80mm (mayor resistencia), posiblemente se justifica en que algunas cepas producen un exopolisacárido (cápsula) que actúa como barrera evitando el paso de compuestos dañinos a las células, como compuestos hidrofóbicos tóxicos (Koneman *et al.* 2006;

Pahissa, A. 2009); además, tal como lo establecieron Echevarría y Zarate (2003) las pequeñas o grandes mutaciones del material genético bacteriano le confiere a estas, cambios en su estructura o en el modo de reaccionar a diversos compuestos químicos.

Según los valores obtenidos, el efecto del extracto hidroalcohólico de *Eucaliptus globulus* L. tiene relación directa con la concentración; esto se debe a que aumentando la concentración habrá mayor cantidad de compuestos activos. La misma tendencia se observa en lo reportado por Rodríguez (2012) para el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de propóleos sobre cepas nativas de *Staphylococcus coagulasa negativo* aisladas de vacas con mastitis.

En la presente investigación, con el extracto hidroalcohólico a 100mg/ml se obtuvieron halos de inhibición en un promedio de 15.2mm mayor que con los extractos etanólicos y metanólicos a la misma concentración utilizados por Pinto, *et al.* (2001) frente a *Staphylococcus aureus*. Esto se explicaría en que tanto el *Eucaliptus globulus* L. como los propóleos poseen compuesto como resinas, flavonoides, alcoholes, aceites volátiles, fenoles (ANEXO 9). Dichos compuestos, probablemente se encuentran en mayor cantidad en los extractos hidroalcohólicos, ya que según lo planteado por Voigth (1982) el agua incrementa la fuerza de extracción de numerosas sustancias de interés terapéutico. Por otro lado es posible que los mencionados compuestos se encuentren en menor cantidad en los propóleos que de acuerdo con Bankova *et al.* (2000), la composición de este producto es altamente variable y dependiente de la flora local en el sitio de recolección.

Así mismo se demuestra el efecto del extracto de hojas secas de *Eucaliptus globulus* L., sin embargo se estima en concordancia con Voigt *et al.* 2011 que existe una diferencia del efecto inhibitorio de extractos obtenidos de hojas secas y hojas frescas siendo más eficaces obtenidos los de hojas frescas. No obstante, según Yañez y Cuadro (2012) con los aceites esenciales obtenidos de hojas secas de *Eucaliptus globulus* L. se obtuvo mayor eficiencia en cuanto a la actividad antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* en comparación con aceites esenciales de hojas frescas.

Esta diferencia en resultados se explicaría, que la acción bactericida del eucalipto también, depende del tipo de especie, los porcentajes de los componentes químicos, las condiciones del suelo, la edad de la planta, así como por cambios de

tipo genético (Barreto *et al.*, 2006; Yañes y Cuadro, 2012), aunque, las diferencias entre especies son mínimas si se analiza cualitativamente los metabolitos; mas, es prudente destacar que se trata de grupos de metabolitos que son útiles para la acción bactericida, como se ha reportado en el caso de los taninos y flavonoides (Gómez *et al.*, 1994).

Entre tanto, el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* L., también ha sido sometido a diversos estudios para establecer su actividad antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria, antiviral e insecticida (Alzamora *et al.*, 2001), pero ninguno de ellos orientado en afecciones de animales domésticos o de cría. No obstante, se ha reportado actividad bacteriana frente a *Staphylococcus aureus*—de fuente ajena a bovinos—tal como lo señala Alzamora *et al.* (2001) y Yañes y Cuadro (2012).

Los resultados obtenidos apoyados por los reportes científicos reafirman la eficacia de *Eucalyptus globulus* L., y su uso popular permiten perfilar su empleo en el campo en el tratamiento de afecciones causadas por *Staphylococcus aureus* como es la mastitis bovina; aun así se hace necesario realizar bioensayos prospectivos, ya que las plantas y sus metabolitos secundarios se presentan como prometedores medicamentos alternativos.



## VI. CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto" tiene efecto inhibitorio en cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas lecheras con mastitis siendo directamente proporcional a la concentración del extracto y con medidas de halos de inhibición ligeramente diferentes entre cepas.
2. El extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto" a una concentración de 500mg/ml tuvo mayor efecto inhibitorio con un halo promedio de inhibición de 19.29 mm en la totalidad de las cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas lecheras con mastitis.

## VII. RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones del efecto antibacteriano *in vivo* del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto" en hatos lecheros.
- Investigar el efecto de productos como aceites esenciales de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto" en agentes bacterianos aislados de vacas lecheras con mastitis.
- Evaluar el efecto inhibitorio de extractos de otras especies de plantas en microorganismos causantes de mastitis bovina.

## VIII. RESUMEN

En este estudio, fue evaluado el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. en cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas con mastitis. El extracto se obtuvo de hojas secas de *Eucalyptus globulus* L. con etanol al 80% (v/v). Las concentraciones empleadas fueron 100, 200, 300, 400 y 500mg/ml usadas en 10 cepas de *Staphylococcus aureus*. El efecto inhibitorio se evaluó por el método de difusión de KIRBY BAUER (Kinsbruy, 1991). La cepa más sensible fue SA2, mientras que SA10 mostro mayor resistencia al extracto. Ambas variables en estudio mostraron diferencias significativas. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. "eucalipto" tiene efecto inhibitorio en cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas lecheras con mastitis siendo directamente proporcional a la concentración del extracto variando ligeramente entre cepas; donde la concentración que tuvo mayor efecto inhibitorio fue 500mg/ml con halo promedio de 19.29 mm en la totalidad de las cepas.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALVITRES, C. 2000. Planificación de la Investigación. Método Científico. Ed. Ciencia. Chiclayo. 205 pp.
- ALZAMORA, L.; MORALES, L.; ARMAS, L. Y FERNÁNDEZ, G. 2001. Medicina Tradicional en el Perú: Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina. 2(62):156-161. Universidad Nacional Mayor de San Marcos
- AZOCAR, J. 2001. Prevalencia, incidencia y etiología de mastitis en un centro de acopio lechero, comuna de María Pinto, Región Metropolitana. Tesis Médico Veterinario. Facultad Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 92 pp.
- BANKOVA, V., DE CASTRO, S. Y MARCUCCI, M. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 31, 3–15.
- BARRETO, G. Y CAMPAL, A. 2001. Efectos de extractos de *Eucalyptus saligna* y *Eucalyptus citriodora* sobre la viabilidad y expresión fimbrial (K88 y CFA/I) de *E. coli* enterotoxigénica. Rev. prod. anim. Vol 13. No. 2. Pág. 67 – 75.
- BOOKS, G.; CARROLL, K.; BUTEL, J. Y MORSE, S. 2008. Microbiología Médica de Jawwetz, Melnick y Adelberg. *Manual Moderno*. 19° Ed. Mexico
- BARRETO G., VELÁSQUEZ, B. Y RODRÍGUEZ, H. 2006. Evaluación in vitro de los extractos de *Eucalyptus citriodora* Hook y *Eucalyptus saligna* Sm. como posibles antisépticos mamarios. Rev. Prod. Animal 18 (2). Pág. 135 – 140
- BRAY, J. Y W. BROADBUSH. 2006. Prevención de la mastitis bovina: La desinfección de los pezones post-ordeño (en línea). Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos36/prevencion-mastitis/prevencionmastitis>. [Noviembre, 24 del 2013]

- BULLITTA S., PILUZZA G., VIEGI L. 2007. Plant resources used for traditional ethnoveterinary phytotherapy in Sardinia (Italy). *GenetResourCropEvol*: 54. Pp.1447-1464.
- CUÉLLAR, A.1983. Química de los fármacos naturales, Facultad de Biología, < Universidad de la Habana, Cuba.
- DAME, L.; WIEST, J.; SILVEIRA, H.; SOUZA, L.; DE TONI, L. Y DOS SANTOS J. 2008. Cinética da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos naturais frente a microorganismos relacionados à mastite bovina. *Ciência Animal Brasileira*: 1 (9). Pp. 161-169.
- DA SILVA, M.; FACCIN, A.; SCHIAVON, D.; GONÇALVES, C.; GUIMARÃES, T. Y DAMÉ, L. 2011. Ação antimicrobiana de extractos de plantas frente a bacterias isoladas do leite bovino com mastite. Brazil.
- DE PAULA J. Y MARTINS, A. 2000. Acción antibacteriana de extractos hidroalcoholicos de *Rubus urticaefolius*. *Rev. Cubana. Plantmed*.5 (1). Pag 26 - 29.
- DELGADO, N. Y VERGARA, M. 2000. Mastitis subclínica bovina en el departamento de Lambayeque. *Veterinaria Lambayeque*. Año I – Número 3. Enero – Marzo. Pág. 8 – 9.
- DELGADO, N. Y VERGARA, M. 2006. Toma de muestras para el análisis microbiológico. Guía de Prácticas. Microbiología Veterinaria. Facultad Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. 6pp. 34
- ECHEVARRIA, J. Y IGLESIAS, D. 2003. Estafilococo meticilinoresistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre las grampositivas. *Rev. Med.Hered* 14(4)2003.
- ELERA, R. Y GUERRA, M. 2007. Identificación de agentes etiológicos de mastitis en vacas lecheras del Centro Productivo de la UNP. *Veterinaria Lambayeque*. Año V – Número 18. Mayo – Octubre. Pág. 6 – 8.

- FONSECA, S., TORQUATO, L., ALVES, D., TEIXEIRA, F. Y SOARES, A. 2009. Avaliação de plantas medicinais no combate a mastite bovina. *Holos* ano 25 vol. 4. Pág. 96 – 102.
- GARCIA, M. 2001. Cuantificación de fenoles y flavonoids totales en extractos naturales. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO.
- GHALEM, B. YMOHAMED, B. 2008. Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. 2, 211-215
- GOMEZ, Y.; VIAMONTES, A. J. Y VELÁSQUEZ, B. 1994. Estudio comparativo de la composición química de dos especies de *Eucalyptus* sp. Evaluación de la actividad farmacológica. Trabajo de diploma. Universidad de Camagüey, Cuba.
- GROSSO, L. 2010. El uso popular de las plantas medicinales en Uruguay. IQuaderni ZooBioDi-Associazione Italiana di Zootecnia BiologicaeBiodinamica: 6.
- GUEVARA, J. 1997. Bacterias que producen mastitis subclínica bovina. Departamento de Lambayeque. Tesis. Facultad Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque. 62 pp.
- INBUY. 2011. *Eucalyptus globulus* Labill. Montevideo, Uruguay.
- KINSBRUY D., WARNER, G. Y SEAGEL, G. 1991. Manual de Microbiología Médica. Edit. Orientación S.A. España. 222pp
- KONEMAN, E., WINN, W., ALLEN, S., JANDA, W., PROCOP, G., WOODS, G. Y SCHRECKENBERGER, P. 2006. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Sixth Edition. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA. 1535 pp.
- Kuelh, R. 2001. Diseño de Experimentos. 2da Ed. Thomson Editores. México. Pp: 175-217

- LIU H.; LENGUA, L.; LEÓN, G.; LA TORRE, C.; HUAPAYA, J. Y CHAUCA, J. 2002. Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y *Eucalyptus sp.* "eucalipto". 2(1-2)
- LLATAS, S. 2008. Botánica Fanerogámica. Lambayeque, Perú.
- LÓPEZ, V. 2009. Evaluación del efecto antibacteriano in vitro de seis especies de plantas de uso medicinal sobre bacterias causantes de mastitis en vacas lecheras. Tesis Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad San Carlos. Guatemala. 44pp 35
- LOPEZ-BREA, M. Y DOMINGO, D. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia. 4(16):385-393
- NATIONAL CENTER OF ANIMAL AND PLANT HEALTH. 1996. Natural Drug for Veterinary Use UDERTAN as Mammary Disinfectant, Technical Review, Pp.:1-57.
- MARTÍNEZ, A. (2005). Flavonoides [en línea]. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia. Disponible en: [farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001](http://farmacia.udea.edu.co/~ff/flavonoides2001). [Diciembre, 12 del 2013]
- MORENO, G. 2006. Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* "Romero", frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Tesis para optar el grado de licenciado en Biología. FCCBB, Lambayeque.
- PAHISSA, A. 2009. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. ICG Marge, SL. Barcelona, España.
- RODRÍGUEZ, M.; PAREDES, D.; L. PARKER Y MARTÍNEZ, H. 2012. Tratamientos alternativos en el control de la mastitis clínica bovina; plasma marino, propóleos y chichipince (*Hameliapatsens*). Universidad Austral de Chile. Valdivia-Chile.
- PIGNATELLI P. 2009. L'usodelle piante medicinali in zootecnia, una realtà in crescita. I Quaderni ZooBioDi: 2. Pp. 2-7.

- PINTO, M.; DE FARIA, J.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.; PEREIRA, C. Y GIOSO, M. 2001. Efeito de extratos de própolis verde sobre bacterias patogénicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 6(48).
- PORPORATO, C. Y FELIPE V. 2011. Mastitis, confort animal y calidad de leche. Ed. Eduvim, España.
- QUINN, P.; MARKEY, B.; CARTER, M.; DONNELLY, W. Y LEONARD, F. 2002. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp.59
- SALAZAR, R.; DE LA TORRE, B.; ALANÍS, L.; PÉREZ Y N. WAKSMAN. 2009. Evaluación de la actividad biológica de productos herbolarios comerciales. *Medicina Universitaria*; 11(44):156-164.
- SOCA, M; Y. SUÁREZ; M. PESTANO Y C. PURON. 2005. Evaluación epizootiológica de la mastitis bovina en dos unidades ganaderas de la Empresa Pecuaria "El Cangre" *REDVET*. 6(2)
- RENDON, S Y TORRES, N. 2012. Determinación De La Actividad Antimicótica De Las Fracciones Obtenidas De La Cromatografía De Columna Procedentes Del Extracto Diclorometánico De La Goma- Resina De *Eucalyptus citriodora* (EUCALIPTO). Universidad de El Salvador. Tesis para optar al grado de LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA.
- RODRÍGUEZ, Í. 2012. Evaluación de actividad antibacteriana de propóleos y miel sobre cepas nativas de *Staphylococcus coagulasa* negativo aisladas de mastitis bovina. Universidad Austral de Chile.
- ROIG, J. 1974. Plantas aromáticas venenosas de Cuba, Ed. Científico-Técnica, La Habana, Cuba.
- TAKAHASHI, T.; R. KOKUBO Y M. SAKAINO. 2004. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 60–64



TIRADO, C. 2005. Inmunización del ganado vacuno como alternativa para el control de la mastitis. Mundo Veterinario. Año 3/número 8/enero 2005. Pág. 48 – 50.

VERGARA, M., DELGADO, N., ALBINO, G. Y MONTENEGRO, Z. 2005. Mastitis. Perspectiva de una infección. Centro de Investigación Facultad Ciencias Biológicas. Centro de Investigación Facultad Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Lambayeque. 38 pp.

VOIGHT, R. 1982. Tratado de tecnología farmacéutica. Ed. Acribia. España.

VOIGT, F., LAMBRECHT, C., DAMÉ, L., SILVEIRA, H. Y HARTWIG, C. 2011. Comparación de distintas extracciones hidroalcohólicas de plantas con indicativo etnográfico antiséptico/desinfectante. Rev Cubana PlantMed [En línea] 16 (3). Cuba. Pag. 236-246.

YÁÑEZ, X. Y CUADRO, O. 2012. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de las especies *Eucalyptus globulus* y *E. camaldulensis* de tres zonas de Pamplona (Colombia). Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas, 1(10), pp. 52-61. Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia.

## X. ANEXOS

ANEXO 01. Hojas secas de *Eucalyptus globulus* L.



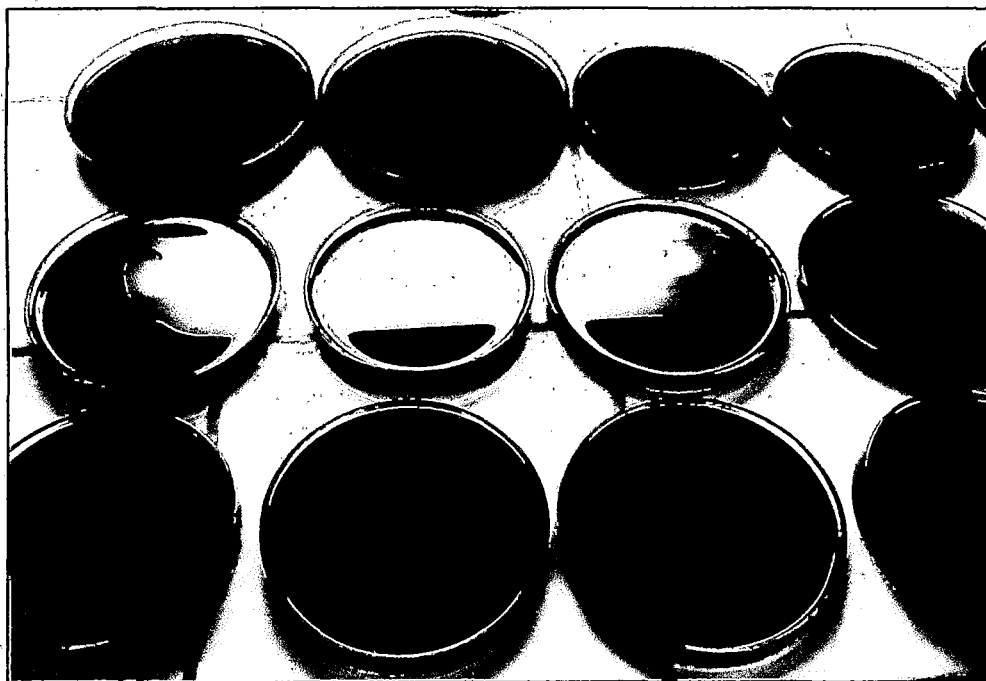
ANEXO 02. Cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de vacas lecheras con mastitis



**ANEXO 03.** Polvo fino obtenido del triturado de hojas secas de *Eucalyptus globulus* L.



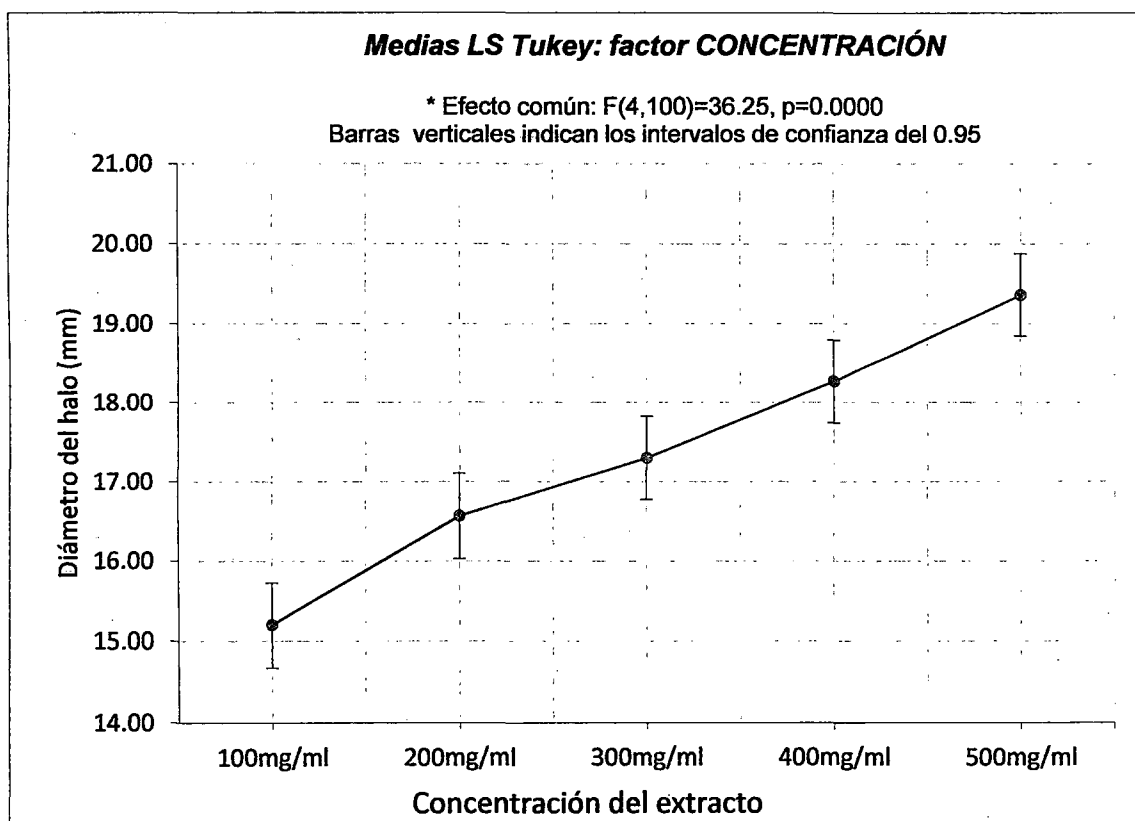
**ANEXO 04.** Extracto líquido de *Eucalyptus globulus* L. en placas esterilizadas para facilitar la evaporación total del alcohol.



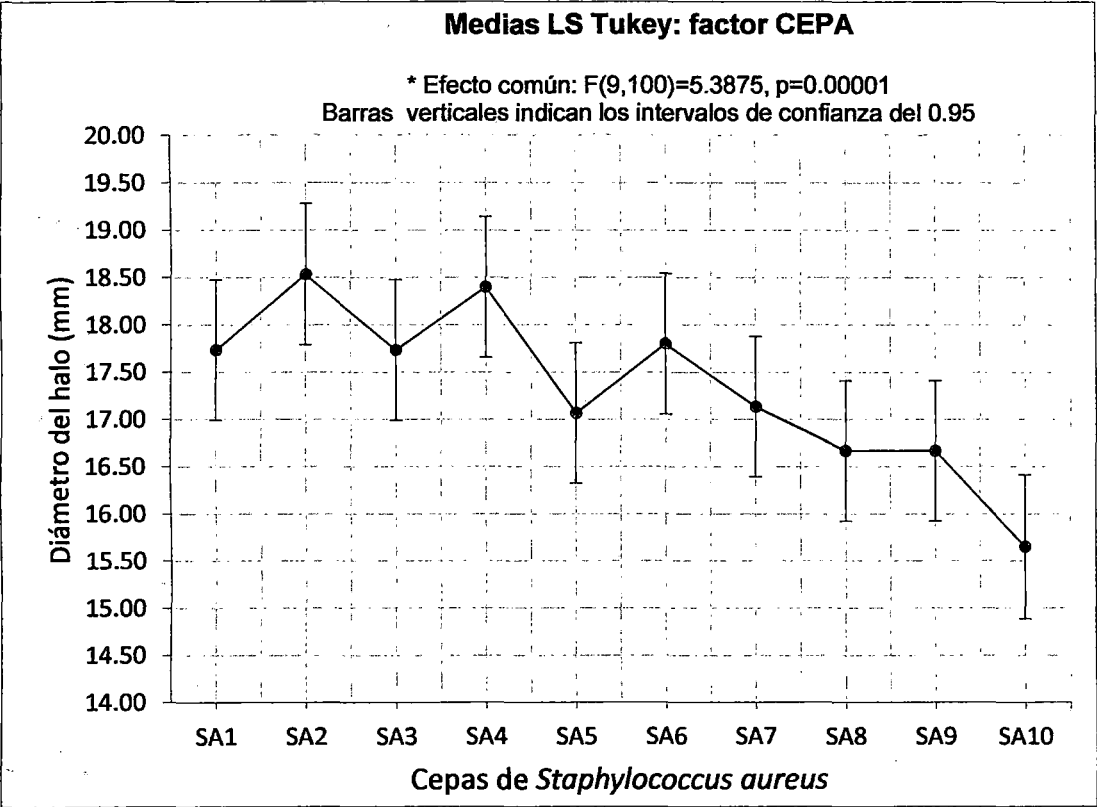
**ANEXO 05.** Concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Eucaliptus globulus* L.  
"eucalipto"



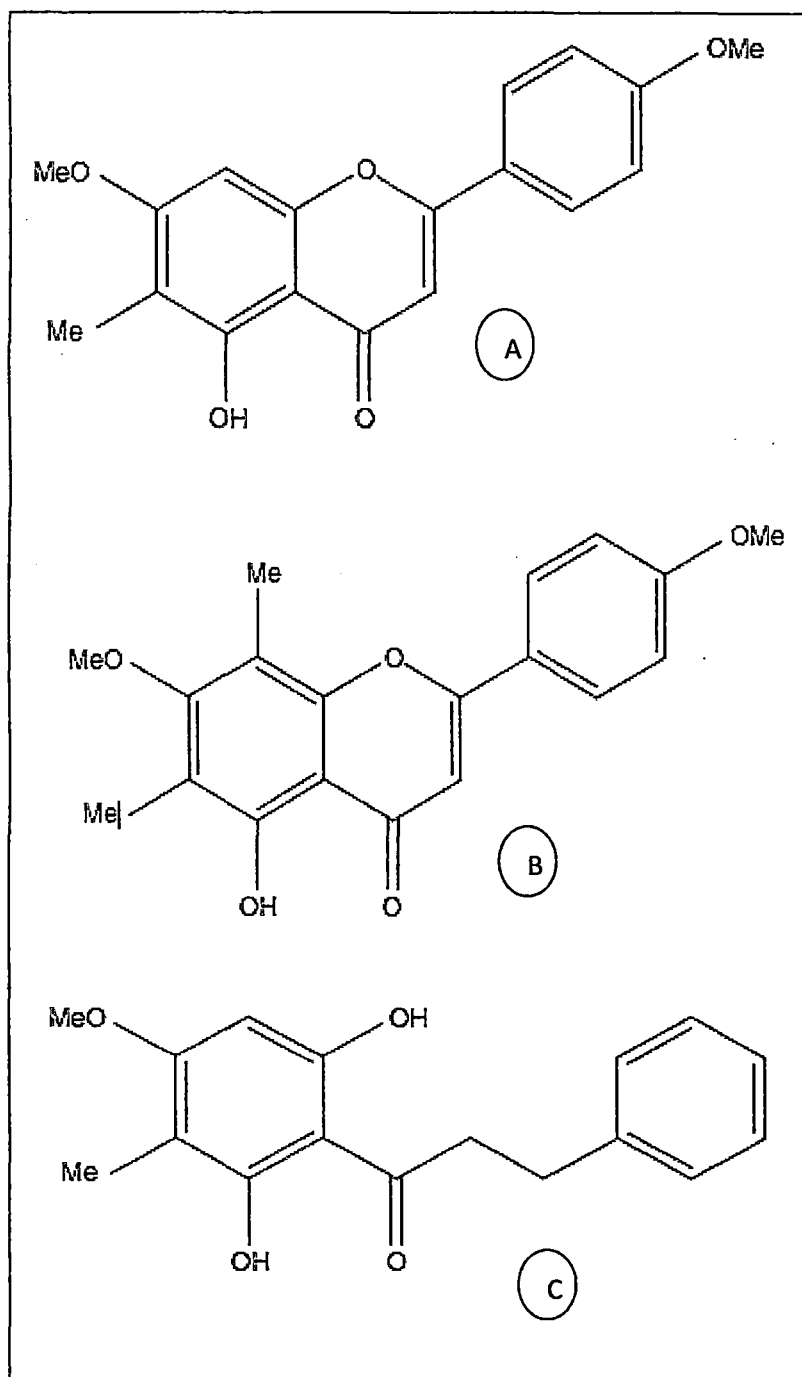
**ANEXO 06.** Gráfica de Análisis de Varianza del efecto del extracto hidroalcohólico de *Eucaliptus globulus* L. a diferentes concentraciones.



**ANEXO 07.** Gráfica de Análisis de Varianza del efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico sobre cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*.



**ANEXO8.** Flavonoides de *Eucalyptus globulus* L.: A) 8-desmetil-eucalyptin B) Eucalyptin y C) 2',6'-dihidroxi-3'-metil-4'-metoxi-dihidrocalcona



## **ANEXO 09. Descripción de Propóleos.**

Constituyen una serie de sustancias resinosas, balsámicas y gomosas, de consistencia viscosa, tomadas de brotes, cortezas y otros tejidos de la planta por las abejas; las que agregan y modifican su composición, a través de sus propias secreciones como la cera y las salivales, o incluso podría ser el resultado de proceso de la digestión del polen por las abejas.

Puede tener un sabor balsámico suave fuerte, amargo y picante; su consistencia varía de suave a ligeramente duro a temperatura ambiente. Contiene en promedio 55 % de resinas y bálsamos, 30 % de cera, 10 % de aceites volátiles y 5 % de polen.

Tiene una composición química compleja que contiene más de 300 compuestos químicos, y entre los productos químicos identificados , se pueden citar los flavonoides (flavonas, flavononas y flavolonas), chalconas , ácido benzoico y derivados, benzaldehídos, alcoholes, cetonas, fenoles, alcohol heteroaromático y derivados de ácido cinámico , ácido cafeico y derivados, triterpenos y diterpenos, y otros ácidos minerales. Predominando los flavonoides que son los responsables de la actividad antiviral, antiparasitario, antibacterial, antioxidante y otras propiedades más.

Además posee vitaminas B, B, B6, C, E; minerales tales como manganeso, hierro, calcio, aluminio y; los azúcares de arabinosa, fructosa, glucosa, sacarosa y maltosa.

**ANEXO 10.** Halos de inhibición de la prueba piloto del efecto inhibitorio *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* L. en *Staphylococcus aureus* aislado de vacas con mastitis.

Concentración del extracto (mg/ml)	Halos de inhibición (mm) de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>		
	SA1	SA4	SA5
50	0.0	0.0	0.0
100	14	14,8	13,5
150	15,3	15,5	14
200	16,2	16	15
250	16,5	16,6	15,54

